

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE



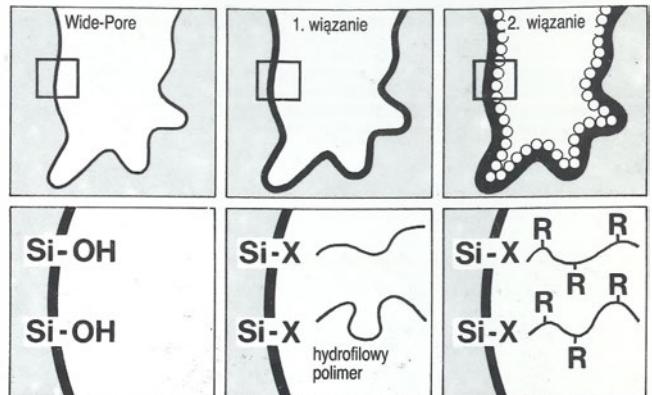
PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 39, NR 4, 1993

| | |
|--|------------|
| W 75-tą rocznicę utworzenia Instytutu im. M. Nenckiego . . . | 206 |
| Cykliczna ADP-ryboza | 210 |
| Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek | 212 |
| Oligodezoksynukleotydy jako regulatory transkrypcji | 221 |
| Mutacje dynamiczne | 228 |
| Polimorfizm <i>locus</i> Pi | 236 |
| Transport białek przez błony . . . | 242 |
| Rola systemu kalpainowego . . . | 251 |
| Wielofunkcyjne białko RecA <i>Escherichia Coli</i> | 259 |
| Lipidy rezorcynolowe | 264 |

Oczyszczanie białek bez rozpuszczalników do HPLC.

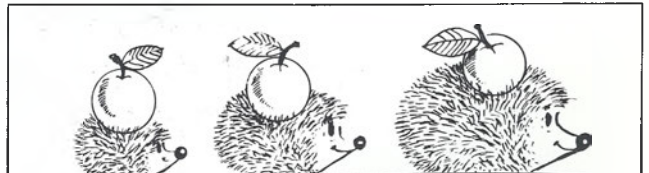
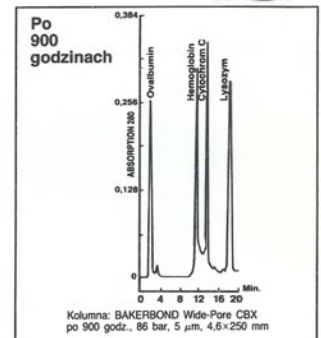
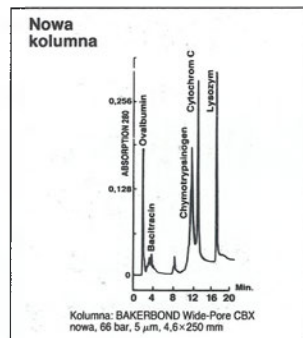


Przy użyciu faz BAKERBOND Wide-Pore.

Dla białek o punkcie izoelektrycznym (p.i.) pomiędzy 6 i 12 właściwym adsorbentem jest faza karboksylowa (WCX). Fazę PEI (WAX) wybiera się wówczas gdy p.i. białek leży pomiędzy 7 i 3. Uniwersalnym sorbentem dla białek jest faza Hi-Propyl. Wszystkie klasy przeciwciał, ich fragmenty i koniugaty oczyszcza z wysoką powtarzalnością faza BAKERBOND ABx. Do wszystkich faz stosuje się jedynie słabe roztwory soli. Można zapamiętać o kłopotach związanych z odczynnikami do HPLC. Dostępny jest nr wzorcowego rejestru FDA oraz bezpłatna broszura.

Dalsze informacje: EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, tel. (042) 813140, 844614

1000 aktywnych godzin i nadal sprawna BAKERBOND Wide-Pore



Stabilność kolumn HPLC

Kolumny BAKERBOND Wide-Pore rozdzielają biopolimery niezwykle ostro, specyficznie i czysto. Po 1000 godzinach pracy rozdzielają się nadal bardzo dobrze i wysoce powtarzalnie zarówno pod względem masy jak i aktywności substancji. Wypełnienia o charakterze hydrofobowym, jonowymiennym lub faz odwróconych mogą być dostarczone w postaci gotowych kolumn lub materiału do napełniania. Nośnikiem jest szerokoporowaty żel krzemionkowy modyfikowany powierzchniowo. Jest on odporny na wysokie ciśnienie i wartości pH 2-12. Można go łatwo oczyszczać i sterylizować. Szczegóły w broszurze.

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

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
3 Pasteur Street
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
659-70-72 w. 1217
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
JERZY BAL
(Warszawa)
TADEUSZ CHOJNACKI
(Warszawa)
CELINA JANION
(Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
LESZEK KACZMAREK
(Warszawa)
IRENA KĄKOL
(Warszawa)
JOANNA RYTKA
(Warszawa)
JANUSZ SIEDLECKI
(Warszawa)
RYSZARD SŁOMSKI
(Poznań)

ADRES REDAKCJI

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

W siedemdziesiątą piątą rocznicę utworzenia w Warszawie Instytutu Biologii Doświadczalnej imienia Marcelego Nenckiego

On the seventy fifth Anniversary of the Marcelego Nencki Institute of Experimental Biology in Warsaw
STELLA NIEMIĘRKO, ZOFIA ZIELIŃSKA 206

Cykliczna ADP-ryboza — modulator uwalniania Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych
Cyclic ADP-ribose — modulator of Ca^{2+} release from intracellular stores
JAN PAWEŁ WORONCZAK, JOLANTA BARAŃSKA 210

Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórki
Immortality, cellular aging and death
EWA SIKORA 212

Oligodezoksorybonukleotydy jako narzędzie specyficznej regulacji transkrypcji genów
Oligodeoxyribonucleotides as a tool for specific transcriptional gene regulation
ARKADIUSZ SZKLARCZYK 221

Mutacje dynamiczne. Rola niestabilnych sekwencji DNA w niektórych chorobach genetycznych człowieka
Dynamic mutations. The role of unstable DNA sequences in human genetic disease
MICHAŁ MILEWSKI, JERZY BAL 228

Polimorfizm genu alfa₁-antytrypsyny (*locus* Pi: alpha₁—inhibitor proteazy)
Polymorphism of alpha₁-antitrypsin gene (*Pi locus*: alpha₁ — protease inhibitor)
ANNA KOWALSKA 236

Transport białek przez błony biologiczne
Protein transport across biological membranes
KATARZYNA NAŁĘCZ 242

Rola proteolitycznego systemu kalpainowego w komórkach zwierzęcych
Role of the proteolytic calpain system in animal cells
ANNA PUKA 251

Wielofunkcyjne białko RecA *Escherichia Coli* — budowa i funkcje
Multifunctional *Escherichia Coli* RecA protein — structure and functions
HANNA SZPILEWSKA, DOROTA KUCZYŃSKA-WIŚNIK . . . 259

Aktywność biologiczna lipidów rezorcynolowych
Biological activity of resorcinolic lipids
ARKADIUSZ KOZUBEK 264

W siedemdziesiątą piątą rocznicę utworzenia w Warszawie Instytutu Biologii Doświadczalnej imienia Marcelego Nenckiego

On the seventy fifth Anniversary of the Marcelli Nencki Institute of Experimental Biology in Warsaw

STELLA NIEMIERKO¹,
ZOFIA ZIELIŃSKA¹

W grudniu 1993 roku Instytut im. Nenckiego świętuje 75-lecie swego istnienia. Okrągłe rocznice skłaniają zazwyczaj do refleksji nad osiągnięciami Jubilata. Także, gdy jest nim placówka naukowa. Trudno wówczas odciąć się od przedstawienia jej rozwoju, w dużej mierze zależnego — nie tylko w Polsce — od warunków politycznych i ekonomicznych kraju. Wiek naszego Jubilata sprzyjał obchodzeniu niejednej rocznicy, oraz wydaniu związanych z tym publikacji. Nie chcemy powtarzać tego, co o organizacji i działalności Instytutu w latach 1918-1993 Czytelnik łatwo znajdzie w dostępnym piśmiennictwie [1-5]. Skoncentrujemy się natomiast na zobrazowaniu sylwetek naukowych patrona Instytutu, wielkiego biochemika końca XIX wieku, **Marcelego Nenckiego** (1847-1901) oraz założyciela Instytutu, wybitnego fizjologa z lat międzywojennych, **Kazimierza Białaszewicza** (1882-1943).

Marceli Nencki kształcił się i pracował poza krajem. Jako szesnastoletni uczeń gimnazjum w Piotrkowie wziął udział w Powstaniu Styczniowym, co zaważyło na jego przyszłości. Aby uniknąć zesłania na Syberię musiał opuścić zabór rosyjski. W Krakowie zatem, w Uniwersytecie Jagiellońskim, podjął studia filozofii i filologii klasycznej. Lecz i tu, w Krakowie, nie czuł się bezpieczny, przeniósł się przeto do Niemiec, gdzie na początku w Jenie, a potem w Berlinie kontynuował studia humanistyczne. Fascynacja jednak odkryciami w różnych dziedzinach nauk przyrodniczych — oraz zapewne wpływ przyjaciół lekarzy — spowodowały, że

zmienił kierunek zainteresowań i wstąpił na wydział lekarski Uniwersytetu Berlińskiego. Już jako początkujący medyk postanowił poświęcić się badaniu przemian chemicznych w ustroju żywym. Aby poznać nowoczesny naówczas chemiczny warsztat badawczy pracuje jednocześnie przez parę lat pod kierunkiem słynnego chemika Adolfa Baeyera. W wieku 23 lat, w 1870 roku, uzyskuje Nencki doktorat z medycyny na podstawie rozprawy: „O utlenianiu związków aromatycznych w organizmie zwierzęcym”. Wcześniej, jeszcze jako student, publikuje wraz z Ottonem Schultzenem pracę „O pochodzeniu mocznika w organizmie”; rok później pracę na temat budowy kwasu moczowego. Zagadnienia te były przedmiotem jego szczegółowych badań przez dalsze lata.

Osiągnięcia młodego Nenckiego wzbudziły zainteresowanie jego osobą. W 1872 roku zaproponowano mu stanowisko asystenta chemii w Zakładzie Patologii Uniwersytetu w Bernie. W 1877 zostaje już profesorem zwyczajnym z misją zorganizowania pierwszej w Szwajcarii katedry Chemii Fizjologicznej w Bernie, którą tworzy od podstaw i kieruje nią przez kilkanaście lat. W okresie tym Nencki wraz z coraz liczniejszymi uczniami prowadzi wielokierunkowe badania o pierwszorzędym znaczeniu dla rozwoju biochemii. Są to prace nad barwnikiem krwi — hemoglobina, a także m.in. barwnikami żółciowymi. Badania nad budową białek dotyczą produktów ich rozkładu, zarówno pod wpływem środków chemicznych, jak i soku trawienego oraz bakterii gnilnych. Wykryto przy tym powstawanie skatolu i indolu. Wykazano, że wartość biologiczna niektórych białek zależy od obecności w nich określonych aminokwasów. Wiele prac doty-

¹ Prof. dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

czyło działania enzymów. Nencki przypisywał im już budowę białkową. Zajmował się też przemianą pośrednią w organizmie zwierzęcym, na przykład przekształcaniem węglowodanów w tłuszcz. Osiągnięcia Nenckiego w zakresie bakteriologii spowodowały powierzenie mu w 1888 roku dodatkowo Katedry Bakteriologii w Uniwersytecie Berneńskim.

Szerokie zainteresowania Nenckiego, talent eksperymentatorski, intuicja naukowa i dociekliwość oraz umiejętność współpracy z naukowcami różnych specjalności owocowały ogromną liczbą publikacji i wykształceniem wielu uczniów, także z Polski. Otrzymuje członkostwa honorowe kilku europejskich towarzystw naukowych oraz doktoraty honoris causa kilku uniwersytetów [6, 9].

W 1891 roku Nencki otrzymał zaproszenie do Petersburga z propozycją objęcia kierownictwa Działu Chemii w nowopowstającym Instytucie Medycyny Doświadczalnej. Warunki jakie mu dawano były wspaniałe. Budowa dużego zakładu według własnego projektu, fundusze gwarantujące dobre jego wyposażenie. Współpraca ze słynnym fizjologiem Iwanem Piotrowiczem Pawłowem. Zwolnienie od pracy dydaktycznej i możliwość zabrania ze sobą kilku asystentów. Jak wynika z korespondencji Nenckiego z rodziną i przyjaciółmi miał on duże opory przed wyjazdem do Petersburga. Zdecydował się jednak, być może pod naciskiem kolegów z Kraju, którzy sądzili, że objęcie przez Nenckiego w Rosji poważnego stanowiska naukowego może ułatwić bardzo trudną wówczas sytuację nauki polskiej. W 1891 roku z kilku współpracownikami, a także z Nadieżdą Sieber i Martinem Hahnem, przenosi się Nencki do Petersburga.

Okres petersburski Nenckiego, choć trwał tylko dziesięć lat, był bardzo płodny w osiągnięcia naukowe [6-10]. W dużej mierze były to wyniki rozwijanej już w Bernie tematyki badawczej. A więc badania związków organicznych występujących w organizmach żywych, dalsze prace dotyczące powstawania mocznika i utleniania związków aromatycznych, badania właściwości białek, metodyka analityczna, synteza środków farmaceutycznych (w tym do dziś stosowanego w lecznictwie salolu). Zajął się też wraz z współpracownikami metabolizmem bakterii i metodyką uodporniania zwierząt przeciw chorobom zakaźnym. Dzięki zaproponowanej technice szczepień udało się na wielkich terenach Rosji zwalczyć silnie infekcyjną, dziesiątkującą bydło rogatą epidemię księgosuszu. Było to wielkie osiągnięcie Nenckiego i wielki dar nauki dla praktyki (szczegółowo na ten temat pisze M. H. Bickel) [9]. W tym czasie także rozwinęła się sławna współpraca Marcelego Nenckiego z młodym biochemikiem z Krakowa, Leonem Marchlewskim, nad pokrewieństwem chemicznym barwników krwi i liści. Historia badań nad hemoglobina, prowadzonych przez Nenckiego w Petersburgu i nad chlorofilem przez Marchlewskiego i Schuncka w Manchesterze, a później kontynuowanych przez Marchlewskiego w Krakowie,

jest rzadkim przykładem międzynarodowej współpracy naukowej na odległość w końcu XIX wieku [10, 11]. Jak wiadomo, badania te pozwoliły Nenckiemu na daleko idące uogólnienia. „Wyniki prac Schuncka i Marchlewskiego mają dla chemii biologicznej wielkie znaczenie, rzucają bowiem światło na najdawniejsze okresy historii rozwoju świata ustrojowego, a zarazem wskazują na wspólność pochodzenia państwa zwierzęcego i roślinnego” [12].

Jednakże, pomimo osobistej satysfakcji i uznania miejscowych władz, Nencki nie czuł się dobrze w Rosji. W listach wspominał o zaproszeniu przez Uniwersytet Lwowski na tamtejszą Katedrę Higieny. Wyrażał chęć zamieszkania w rodzinnym majątku Boczkach koło Sieradza. Zastanawiał się także czy nie wrócić do Szwajcarii i tam pracować w prywatnym laboratorium. Zamierzenie to uniemożliwiła przedwczesna śmierć w 1901 roku.

Kontakt Nenckiego z Polską był bliski. Często przyjeżdżał do Krakowa, Warszawy i Lwowa, biorąc czynny udział w życiu naukowo-organizacyjnym. Często publikował wyniki swych badań w języku polskim: w Kosmosie, wydawnictwach PAU, w wielu innych czasopismach naukowych i lekarskich [6]. Jak bardzo był ceniony w polskim środowisku naukowym świadczą nadane mu godności. Członkostwo Polskiej Akademii Umiejętności, doktorat honoris causa Uniwersytetu Jagiellońskiego, członkostwa honorowe licznych towarzystw lekarskich i naukowych, także towarzystw działających w miastach prowincjonalnych [6]. W 1900 roku na IX Zjeździe Przyrodników i Lekarzy w Krakowie Nencki omówił osiągnięcia chemii biologicznej w końcowym trzydziestoleciu XIX wieku — to jest w okresie swej własnej twórczości naukowej — oraz nakreślił kierunki dalszego jej rozwoju [13]. Trzydzieści kilka lat później, w wykładzie inauguracyjnym działalności Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, Jakub Karol Parnas powiedział: „Nencki należy do tych, którzy kierują się zupełnie pewnym przekonaniem, że głównym zagadnieniem chemii fizjologicznej jest zagadnienie mechanizmu reakcji ustrojowych”. Warto zauważyć, że mówiąc o zmarłym w 1901 roku Nenckim mówca użył czasu terażniejszego wyrażając tym najwyższe uznanie dla umysłowości, twórczości i osiągnięć Nenckiego.

Zgodnie ze swą wolą, Nencki został pochowany w Warszawie na cmentarzu ewangelicko-reformowanym. Najbliżsi jego współpracownicy uporządkowali spuściznę naukową Nenckiego i wydali łącznie publikacje, rozproszone w różnych wydawnictwach. Tak powstały słynne „Opera Omnia” wydane w 1905 roku [14]. Osoba Nenckiego i jego działalność naukowa są przedmiotem publikacji źródłowych oraz popularnonaukowych w języku polskim, niemieckim i rosyjskim [6, 9].

Inicjatywy powołania towarzystwa naukowego imienia Nenckiego lub instytutu badawczego jego imienia, podejmowane już od 1902 roku, spotykały się

z odmowami władz carskich. Po wielu staraniach udało się w 1907 roku zarejestrować Towarzystwo Naukowe Warszawskie, TNW, którego zadaniem było tworzenie placówek naukowych w Warszawie. W dwa lata później do Towarzystwa Lekarskiego Warszawskiego wpłynęła znaczna prywatna dotacja z przeznaczeniem na potrzeby przyszłego Instytutu Biologicznego im. Marcelego Nenckiego [2, 6]. Przy TNW stopniowo powstawały pracownie badawcze, które z czasem miały utworzyć instytut, ale zwyczajowo nosiły już imię Nenckiego. Formalne utworzenie Instytutu Biologii Doświadczalnej imienia Marcelego Nenckiego stało się prawnie możliwe dopiero po odzyskaniu przez Polskę niepodległości w 1918 roku. Tradycja Instytutu przyjmuje zatem rok 1918 jako datę jego powstania oraz stosuje zwyczajowo skrót: Instytut im. Nenckiego, jako jego nazwę potoczną. Zadaniem Instytutu, jak odnotowano to w Roczniku Kasy imienia J. Mianowskiego (tom 2, str. 579, Warszawa, 1919) była: „badawcza praca naukowa w zakresie tych gałęzi doświadczalnych nauk biologicznych, które znajdują się w okresie intensywnego rozwoju”.

Zadania te, w swych działaniach dla dobra i rozwoju biologicznych nauk doświadczalnych, konsekwentnie realizował profesor Kazimierz Białaszewicz, założyciel i główny organizator Instytutu, jego pierwszy dyrektor, a także członek jego kierownictwa w całym okresie międzywojennym. Już od 1913 roku asystent i kierownik Pracowni Fizjologii, od 1920 roku członek Polskiej Akademii Umiejętności i profesor zwyczajny Uniwersytetu Warszawskiego stał się twórcą i kierownikiem pierwszej w Polsce uniwersyteckiej Katedry Fizjologii Zwierząt. Do roku 1934, jednakże, Katedra nie miała swego lokalu. Profesor wykładał w gmachu Szkoły Głównej, a studentom umożliwiał pracę doświadczalną w Zakładzie Fizjologii Instytutu im. Nenckiego przy ul. Śniadeckich 8, w budynku należącym do TNW. Przetrwiał on okres wojny i mieści się w nim obecnie Instytut Matematyki PAN. Profesor umiejętnie łączył obowiązki kierownika obu zakładów, oczywiście korzystając jedynie z uposażenia uniwersyteckiego. *Nota bene*, ze względu na ograniczone fundusze jakimi dysponował Instytut, większość ówczesnych pracowników traktowało swą pracę badawczą jako pasję życiową utrzymując się najczęściej z pensji nauczycielskiej.

Profesor był całkowicie oddany nauce. Był wymagający, lecz umiał budzić entuzjazm w młodych współpracownikach, świetnie wykładał. Zawsze skupiony, z każdym omawiał jego doświadczenia, stosowaną metodykę, wyniki — budził krytycyzm, doradzał. Zainteresowania profesora były szerokie: fizjologia porównawcza i biochemia rozwoju organizmu zwierzęcego, zależność składu mineralnego cieczy ciała od składu środowiska zewnętrznego, fizjologia wchłaniania jelitowego, przemiana materii i energii w mięśniu i organizmie zwierzęcym podczas głodu, zapotrzebo-

wanie człowieka na składniki mineralne, fizjologia pracy człowieka. W swych badaniach i badaniach uczniów bardzo dbał o poprawność metodyczną eksperymentów, często sam proponował lub adaptował stosowne metody. Otwarty na nowe problemy i techniki badawcze popierał inicjatywy naukowe współpracowników.

W skład Instytutu wchodziły w międzywojniu oprócz Zakładu Fizjologii także, działające trwale lub okresowo, Zakłady: Biologii Ogólnej, Neurobiologii, Embriologii Doświadczalnej, Morfologii Doświadczalnej oraz Biometrii [1-3]. Szczególną uwagę kierował Profesor na potrzebę badań środowiskowych. Znalazło to swą realizację w powołaniu przez Instytut trzech stacji terenowych: Stacji Hydrobiologicznej na Wigrach, Stacji Morskiej na Helu i Stacji Rzecznej w Pińsku. W poszczególnych pracowniach Instytutu w różnych okresach dwudziestolecia pracowało także wielu badaczy z innych placówek naukowych Warszawy.

Ważną aktywnością Instytutu im. Nenckiego były wydawnictwa. Profesor właśnie był inicjatorem i redaktorem zeszytów pod nazwą „Prace Instytutu im. Nenckiego”, a później aż do wybuchu wojny czasopisma „Acta Biologiae Experimentalis”, w których publikowali swe prace i artykuły także badacze spoza Instytutu.

Uznając spotkania dyskusyjne specjalistów z różnych dziedzin fizjologii za konieczny element rozwoju nauki profesor Białaszewicz zorganizował w 1937 roku Polskie Towarzystwo Fizjologiczne i został jego pierwszym prezesem. Towarzystwo skupiło oprócz fizjologów *sensu stricto*, także biochemików i farmakologów.

Jako biochemik, Kazimierz Białaszewicz był właściwie samoukiem. Studia swe rozpoczął w roku 1900 w Warszawie w Uniwersytecie, wówczas carskim, podejmując specjalizację w zakresie zoologii. Za pracę na temat histogenezy u hydry uzyskał złoty medal w 1904 roku. Niedługo po tym został z Uniwersytetu relegowany za udział, czy sprzyjanie ruchom niepodległościowym 1905 roku. Dalsze studia odbył w Uniwersytecie Jagiellońskim w Zakładzie Embriologii kierowanym przez znanego biologa i embriologa, Emila Godlewskiego, juniora. Tam w 1909 roku otrzymał tytuł doktora na podstawie dysertacji n.t. wzrostu zarodków płazów. By zapoznać się ze stosowanymi wtedy metodami biochemicznymi udał się do Laboratorium Chemii Fizjologicznej profesora F. Tangla w Uniwersytecie Budapeszteńskim. Był to właściwie jedyny staż naukowy Białaszewicza w tym zakresie. Podstawowe kierunki rozwijającej się fizjologii i biochemii poznawał z piśmiennictwa. Techniki i metody adaptował według potrzeb i skromnych możliwości laboratoryjnych. Był to przecież czas tworzenia się zrębów państwowości polskiej, okres po straszliwych zniszczeniach, przechodzących przez nasz Kraj frontów, oraz wielkiego światowego kryzysu gospodarczego lat trzydziestych [15-17].

Podczas okupacji Profesor prowadził seminaria dla zaufanych magistrantów oraz pisał monografię o przemianie pośredniej u zwierząt. Zmarł, nie dokończywszy swej książki na początku 1943 roku i pochowany jest na warszawskich Powązkach. Wkrótce po wojnie monografia ta ukazała się pod tytułem: „Przemiany chemiczne w organizmie żywym” w opracowaniu profesora Włodzimierza Niemierki [18].

Profesor Białaszewicz wykształcił duże grono uczniów zdolnych do samodzielnych badań w zakresie fizjologii i biochemii. Niektórzy objęli kierownicze stanowiska jeszcze przed wojną. Znaczna część tych, którym udało się przeżyć okupację bądź w Kraju, bądź zagranicą, wzięła czynny udział w organizacji życia naukowego w Polsce. Zasilili oni zmniejszone wskutek działań wojennych kadry pracowników naukowych różnych szczebli, zarówno na uniwersytetach jak i instytutach badawczych.

Dzięki wysiłkom bliskich współpracowników i uczniów profesora Białaszewicza reaktywowano już w 1945 roku Instytut im. M. Nenckiego, z siedzibą początkowo w Łodzi, a od 1953 roku w Warszawie, we własnym nowowynbudowanym gmachu przy ul. Pasteura 3. W odczuciu żyjących jeszcze uczniów Profesora jego indywidualność wpłynęła na zachowanie, także po wojnie — zwłaszcza w Łodzi — dobrych tradycji panujących za jego życia w Instytucie. Mimo niezwykle trudnych warunków udało się w Instytucie odtworzyć dawną atmosferę, która sprzyjała pracy naukowej i poczuciu każdego z pracowników, że jest on ważnym ogniwem w ogólnych osiągnięciach.

Piśmiennictwo

1. Instytut imienia Nenckiego przy Towarzystwie Naukowym Warszawskim 1920-1927. Organizacja — Działalność — Środki. (1928) Warszawa, Nakładem Instytutu, 76
2. Zieliński K (1978) 60 lat Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN (1918-1978). *Nauka Polska* 10: 33-79
3. Zieliński K (1991) Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN. Działalność badawcza i organizacyjna. *Nauka Polska* 5-6: 101-117
4. Grzelakowska-Sztabert B (1972) Biochemistry at the Nencki Institute of Experimental Biology Warsaw, Poland. *Int J Biochem* 3: 125-137
5. Niemierko S (1989) Z historii siedemdziesięcioletniej działalności Instytutu Biologii Doświadczalnej imienia Marcelego Nenckiego. *Post Biochem* 35: 3-14
6. Szejczerowa A, Groszyńska J (1956) Marceli Nencki — Materiały biograficzne i bibliograficzne, PWN, Warszawa, 263
7. Szejczerowa A (1977) Marceli Nencki, Interpress, Warszawa, 137
8. Niemierko W (1952) Marceli Nencki. W: Marceli Nencki — Materiały biograficzne i bibliograficzne, Szejczerowa A, Groszyńska J, PWN, Warszawa, 7-30
9. Bickel M H (1972) Marceli Nencki 1847-1901. H. Huber Bern, Stuttgart, Wien, 102
10. Niemierko W, Niemierko S (1987) Marceli Nencki. *Acta Physiol Polon* 38: 149-157
11. Skarżyński B (1951) Marceli Nencki i Leon Marchlewski. Karta z dziejów współpracy naukowej. *Życie Nauki* 6: 252-263
12. Nencki M (1896) O stosunku biologicznym barwnika liści do barwnika krwi. W: Marceli Nencki — Materiały biograficzne i bibliograficzne, Szejczerowa A, Groszyńska J, PWN, Warszawa, 116
13. Nencki M (1900) O zadaniach biologicznej chemii. W: Marceli Nencki — Materiały biograficzne i bibliograficzne, Szejczerowa A, Groszyńska J, PWN, Warszawa, 122-131
14. Marceli Nencki (1904) Opera Omnia T. 1 (1869-1886): 840; T. 2 (1886-1901): 893, Red N Sieber, J Zaleski, F Vieweg und Sohn, Braunschweig
15. Niemierko W (1947) Prof. dr Kazimierz Białaszewicz. *Acta Biol Exper* 14: 9-17
16. Bogucki M (1954) Kazimierz Białaszewicz (1882-1943). *Roczniki Tow Nauk Warsz* 1938-1945: 171-172
17. Niemierko S (1987) Kazimierz Białaszewicz. *Acta Physiol Polon*: 38: 177-185
18. Białaszewicz K (1952) Przemiany chemiczne w organizmie żywym (Opracował i uzupełnił Niemierko W) PWN, 119

FIRST INTERNATIONAL SEMINAR on the NUCLEAR MATRIX

June 21st - 23rd 1994
Wrocław/Łagów

Correspondence to

Dr R. Rzepecki
Secretariat

**1st International Seminar
on the Nuclear Matrix
Institute of Biochemistry
University of Wrocław
Przybyszewskiego Str. 63/77
51-148 Wrocław
Poland**

Tel/Fax : +71-252930

E Mail :

RRBC@PLWRUW11.BITNET

Cykliczna ADP-ryboza — modulator uwalniania Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych

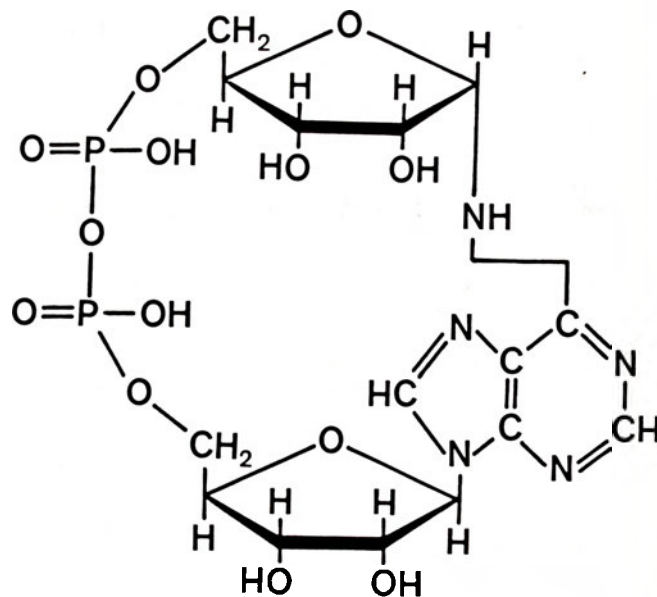
Cyclic ADP-ribose — modulator of Ca^{2+} release from intracellular stores

JAN PAWEŁ WORONCZAK¹
JOLANTA BARAŃSKA²

Wykaz stosowanych skrótów: cADPR—cykliczna ADP-ryboza; InsP_3 —trisfosfoinozytol

Komórki eukariotyczne utrzymują w cytoplazmie niskie (10^{-7}M) stężenie Ca^{2+} , aktywnie usuwając jony wapnia na zewnątrz oraz magazynując je wewnątrz retikulum endoplazmatycznego. Zmagazynowany w retikulum wapń uwalniany jest do cytosolu podczas odpowiedzi komórki na bodźce zewnętrzne. Zwiększone stężenie wapnia wywołuje z kolei właściwą dla danej komórki odpowiedź metaboliczną. W komórkach mięśni szkieletowych uwolnienie Ca^{2+} , powodujące skurcz mięśnia, indukowane jest przez depolaryzację błony plazmatycznej. We wszystkich innych komórkach czynny jest szlak sygnałowy biegnący poprzez hydrolizę fosfolipidów inozytowych. Uwolniony w tej reakcji 1,4,5-trisfosfoinozytol (w skrócie InsP_3) wiąże się ze specyficznym białkiem receptorowym w błonie retikulum endoplazmatycznego, otwierając znajdujący się w nim kanał wapniowy. Przez kanał ten następuje uwalnianie Ca^{2+} do cytosolu. Szlak ten, prowadzący do powstania InsP_3 , będącego wtórnym przekaźnikiem informacji w komórce, jest dość dobrze poznany [1-3].

Stosunkowo niedawno odkryto jednak nową wewnątrzkomórkową substancję sygnałową [4]. Jest to pochodna dinukleotydu nikotynowo-adeninowego (NAD^+), a mianowicie cykliczna ADP-ryboza, w skrócie cADP-ryboza lub cADPR [5]. (Ryc. 1) Substancję tę znaleziono pierwotnie w jajach jeżowca, a później także w różnych komórkach i tkankach innych organizmów [6]. Powstaje ona z NAD^+ w reakcji



Ryc. 1. Wzór strukturalny cyklicznej ADP-rybozy.

¹ mgr inż.; ² doc. dr hab. Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biochemii Komórki. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

katalizowanej przez specyficzny enzym, cyklazę ADP-rybozylową. Określono już sekwencję aminokwasową cyklazy ADP-rybozylowej wyodrębnionej z gruczołu obojnego (łac.: *ovotestis*) mięczaka *Aplysia* [7]. Enzym o takiej samej funkcji, lecz o odmiennych właściwościach występuje w różnych tkankach kręgowców [8,9].

Stwierdzono, że cADPR uwalnia wapń z mikrosomów w homogenatach jaj jeżowca równie silnie jak InsP_3 , działa jednak całkowicie niezależnie [9,10]. Wskazuje na to między innymi fakt, że heparyna, blokująca receptor InsP_3 , nie wpływa na uwalnianie wapnia stymulowane przez cADPR. Uwalnianie to jest natomiast hamowane przez substancje blokujące (rianodina), a zwiększane przez substancje aktywujące (kofeina) inny kanał wapniowy, a mianowicie kanał receptora rianodinowego. Receptor ten uczestniczy w uwalnianiu wapnia z retikulum endoplazmatycznego w procesie indukowanym nie przez InsP_3 , a przez sam wapń (ang. *calcium induced calcium release*). Jony wapnia w stężeniu 10^{-7} - 10^{-6} M powodują otwieranie tego kanału, a w stężeniu 10^{-5} - 10^{-4} M zamykają go. Receptorom rianodinowym przypisuje się istotną rolę w powstawaniu długotrwałej i złożonej odpowiedzi komórki, na przykład następujących po sobie oscylacji stężenia wapnia. Właśnie te receptory biorą zapewne udział w powstawaniu przemieszczających się fal zwiększonego stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie komórki jajowej podczas zapłodnienia. Samo dodanie do homogenatu jaj jeżowca jonów wapnia nie wystarcza do zapoczątkowania procesu uwalniania tych jonów z mikrosomów — niezbędna jest również obecność cADPR [12]. Na podstawie powyższych doniesień przypuszcza się, że cADPR jest naturalnym modulatorem działania receptorów rianodinowych, pełniąc zapewne ważną rolę w regulacji ich funkcji.

Ostatnio wykazano również, że cADPR pośredniczy w uwalnianiu insuliny przez komórki wysepkowe trzustki [13]. Jest to doniesienie o tyle interesujące, że w procesie tym, będącym odpowiedzią na stymulację

komórek glukozą, w ogóle nie bierze udziału InsP_3 — jest to więc przykład innej, niezależnej drogi przekazywania sygnału. Poszczególne etapy tej drogi nie są jeszcze wyjaśnione. Nie wiadomo przede wszystkim, jaki jest mechanizm aktywacji cyklazy ADP-rybozylowej. Ponieważ enzym syntetyzujący cADPRu *Aplysia* i antygen powierzchniowy ludzkich limfocytów CD38 wykazują homologię [14], Galione [15] przypuszcza, że cyklaza ADP-rybozylowa może stanowić integralną część białka receptorowego. Z dotychczasowych badań wynika więc, że cADPR jest nie tylko modulatorem kanału rianodinowego, lecz może być także nowym, równorzędnym z InsP_3 , wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem sygnałów [15].

Artykuł otrzymano 11 maja 1993 r.

Zaakceptowano do druku 27 maja 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Famulski K S (1989) *Post Biochem* 35: 493-511
2. Barańska J (1992) Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce, Polskie Towarzystwo Biochemiczne
3. Berridge M J (1993) *Nature (Lond)* 361: 315-325
4. Clapper D L, Walseth P J, Dargie P J, Lee H C (1987) *J Biol Chem* 262 (20): 9561-9568
5. Walseth T F, Bratt G T, Hayes R N, Clapper D L (1989) *J Biol Chem* 264 (3): 1608-1615
6. Walseth T F, Aarhus R, Zeleznikar R J Jr, Lee H C (1991) *Biochim Biophys Acta* 1094 (1): 113-120
7. Glick D L, Hellmich M R, Beushausen S, Tempst P, Strumwasser F (1991) *Cell Regul* 2 (3): 211-218
8. Rusinko N, Lee H C (1989) *J Biol Chem* 264 (20): 11725-11731
9. Lee H C (1991) *J Biol Chem* 266 (4): 2276-2281
10. Dargie P J, Agre M C, Lee H C (1990) *Cell Regul* 1 (3): 279-290
11. Sorrentino V, Volpe P (1993) *Trends Pharm Sci* 14: 98-103
12. Lee H C (1993) *J Biol Chem* 268 (1): 293-299
13. Takasawa S, Nata K, Yonekura H, Okamoto H (1993) *Science* 259 (5093): 370-373
14. States D J, Walseth T F, Lee H C (1992) *Trends Biochem Sci* 17: 495
15. Galione A (1993) *Science* 259 (5093): 325-326

**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**

Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek Rola protoonkogenów, onkogenów i antyonkogenów

Immortality, cellular aging and death The role of protooncogenes, oncogenes and antioncogenes

EWA SIKORA*

Spis treści:

- I. Limit Hayflicka
- II. Genetyczna natura komórkowego starzenia
- III. Represja genów w starych komórkach
- IV. Komórki nieśmiertelne i antyonkogeny
- V. Dwustopniowy mechanizm komórkowego starzenia
- VI. Telomerowa hipoteza komórkowego starzenia
- VII. Śmierć komórki
- VIII. Geny śmierci i życia

I. Limit Hayflicka

Cechą charakterystyczną komórek prawidłowych, o niezmiennym karyotypie, jest ich ograniczona zdolność do podziałów [1]. Fibroblasty pobrane z ludzkiego płodu dzielą się w hodowli 50-60 razy, po czym żyją do kilkunastu miesięcy nie dzieląc się, aż w końcu umierają [2]. Cała hodowla nie trwa więc dłużej niż dwa lata [3]. Liczbę podziałów, które komórki są w stanie osiągnąć w hodowli nazywa się limitem Hayflicka, a bezpodziałową fazę hodowli III-fazą lub fazą starych komórek. Podobnie zachowują się w hodowli inne komórki ludzkie, takie jak komórki nabłonka i mięśni gładkich, soczewki oka, keratynocyty i limfocyty [4]. Również komórki pobrane z tkanek gryzoni i ptaków, o ile nie mają zmienionego karyotypu, umierają w hodowli po określonej liczbie podziałów. Liczba ta jest wprost proporcjonalna do średniej długości życia osobników danego gatunku, a odwrotnie proporcjonalna do wieku dawcy [5]. Tylko komórki nieśmiertelne i nowotworowe, które mają zmieniony karyotyp dzielą się w sposób nieograniczony i nie wykazują znamion procesu starzenia. Transformację nowotworową nazywa się czasem ucieczką od procesu starzenia. Fibroblasty ludzkie

Contents:

- I. Hayflick's limit
- II. Genetic nature of cellular senescence
- III. Repression of genes in aged cells
- IV. Immortalized cells and antioncogenes
- V. Two-stage mechanism of cellular senescence
- VI. The telomere hypothesis of cellular aging
- VII. Cell death
- VIII. Genes of life and death

stanowią do dzisiaj najwygodniejszy i najlepiej przebadany typ komórek starzejących się w hodowli. Coraz częściej mówi się w odniesieniu do nich o replikacyjnym starzeniu, które działa zgodnie z licznikiem podziałów, a nie według zegara chronologicznego [6, 7]. Komórki w stanie zamrożenia można trzymać przez okres dowolnie długi. Po rozmrożeniu podzielą się tyle razy, ile im jeszcze zostało do osiągnięcia limitu Hayflicka. Dzięki temu w wielu laboratoriach można badać komórki pochodzące z jednego źródła i zaban- kowane we wczesnej fazie podziałów. Są to „linie” WI-38, MRC-5, MRC-90.

II. Genetyczna natura komórkowego starzenia

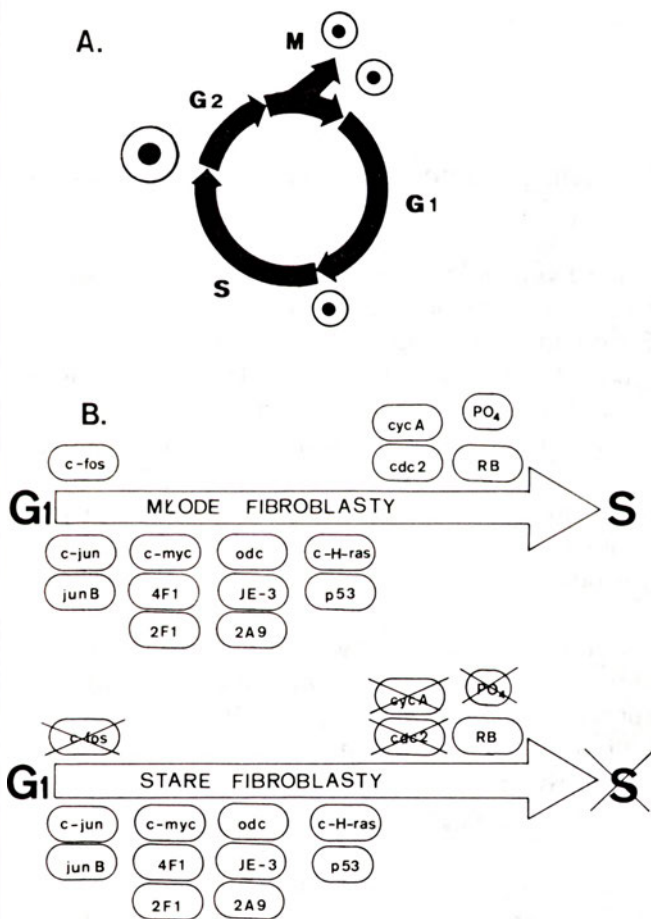
Od lat obserwuje się dwie różne tendencje w interpretacji procesu starzenia komórek. Jedna z nich przyjmuje, że starzenie jest procesem przypadkowym, który charakteryzuje nagromadzanie się w komórce uszkodzonych makrocząsteczek, powstających jako skutek błędnej replikacji, mutacji, czy też działania wolnych rodników tlenowych, co uniemożliwia dalszą replikację [8-11]. Druga zakłada, że komórkowe starzenie jest procesem aktywnym, genetycznie kontrolowanym [6, 7]. Za genetyczną rolę procesu starzenia przemawiają wyniki fuzji komórek nowotworowych, które są nieśmiertelne, z komórkami prawidłowymi

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

lowymi, oraz fuzji komórek prawidłowych z tzw. nieśmiertelnionymi [4, 12]. Wskazują one na dominację fenotypu komórki prawidłowej nad fenotypem komórki nieśmiertelnionej i nowotworowej [13, 14]. Mówiąc o komórkach nieśmiertelnionych trzeba pamiętać, że są one nieśmiertelne jako puła komórek dzielących się bez ograniczeń. Nieśmiertelnej komórki, która — jako niepodzielna jednostka — żyłaby w nieskończoność nie udało się do dzisiaj nikomu zaobserwować.

III. Represja genów w starych komórkach

Pod wpływem różnych czynników mitogennych komórki ze stanu spoczynkowego wchodzi w cykl podziałów zwany cyklem komórkowym (Ryc. 1A).



Ryc. 1. A) Schemat cyklu komórkowego.
B) Różna ekspresja genów na granicy faz G1/S w młodych i starych fibroblastach stymulowanych do wzrostu.

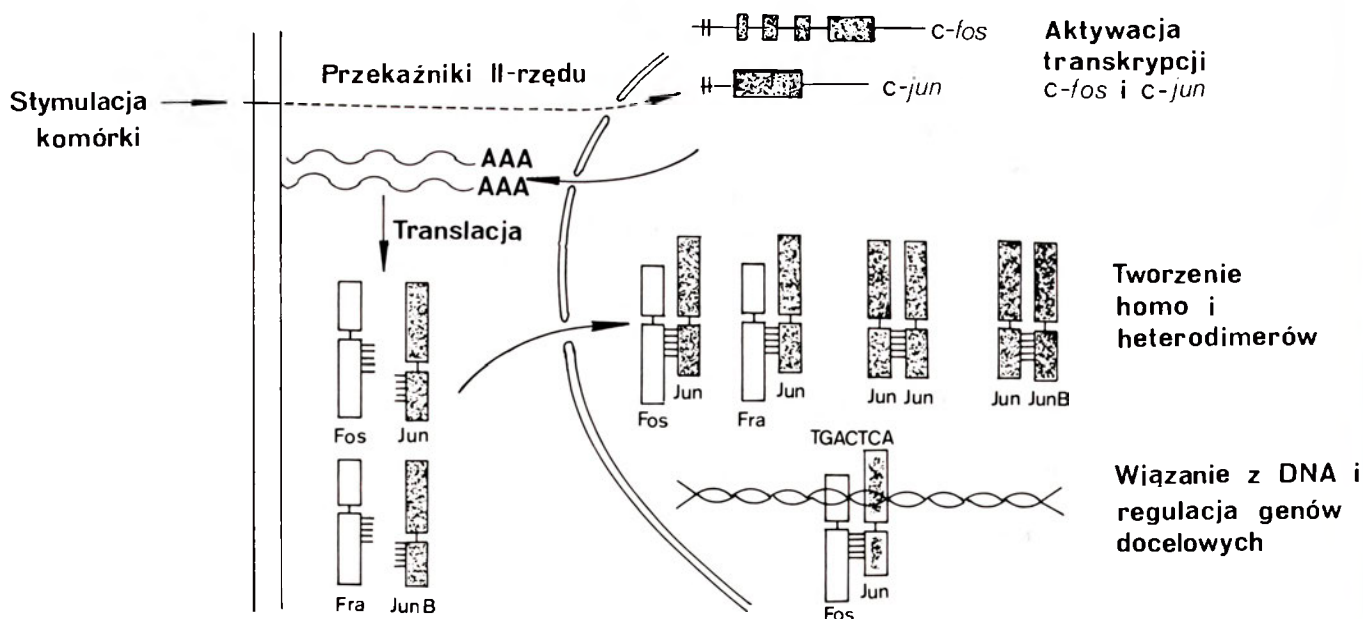
Mitogeny uruchamiają w komórce całą kaskadę zdarzeń regulującą jej podziały. W regulacji podziałów komórkowych bierze udział bardzo wiele protoonkogenów. Produktami białkowymi tych protoonkogenów są czynniki wzrostowe, białkowe kinazy tyrozynowe, białka G, białkowe kinazy serynowe oraz czynniki transkrypcyjne. Pod wpływem bardzo różnorodnych uszkodzeń genetycznych protoonkogeny nabierają właściwości onkogennych [15]. Sumaryczny efekt działania różnych onkogennych stanowi przyczynę wy-

mknięcia się podziałów komórkowych spod kontroli i przekształcenia komórek prawidłowych w nowotworowe [16].

Komórki prawidłowe, które przeszły limit podziałów Hayflicka, nie reagują na żadne czynniki wzrostowe [17]. Wykazano, że mają one tyle samo niezmiennych receptorów takich czynników wzrostowych jak EGF, PDGF, IGF-I co komórki młode, będące w początkowej fazie podziałów [18-20]. Nie wykryto również różnic w fosforylacji katalizowanej przez kinazę tyrozynową i stymulowanej przez EGF i PDGF w komórkach młodych i starych [21]. Także większość z przebadanych genów cyklu komórkowego, które ulegają ekspresji w młodych komórkach wchodzących w cykl podziałowy, była aktywna również w komórkach starych stymulowanych surowicą [22, 23]. Pomimo to stare komórki zatrzymane są w fazie G1 cyklu komórkowego [24] i nie są w stanie syntetyzować DNA [23]. Jednakże w starych ludzkich i chemicznych fibroblastach nie wykazano ekspresji genu *cdc2* [26, 27], a w ludzkich fibroblastach genów cyklin A i B [27] oraz protoonkogenu *c-fos* [25] (Ryc. 1B). Gen *cdc2* koduje białko p34, które jest podjednostką kinazy białkowej katalizującej fosforylację wielu substratów komórkowych, w tym m.in. białka RB [28, 29]. Białko to w starych ludzkich fibroblastach występuje w formie niefosforylowanej [30]. Atrakcyjności temu odkryciu dodaje fakt, że białko RB kodowane jest przez jeden z genów supresji transformacji nowotworowej (patrz niżej).

Cyklina A i cyklina B to białka, które regulują procesy cyklu komórkowego na różnych jego etapach tworząc kompleksy z kinazą p34 [31]. Cyklina A jest aktywna na granicy faz G1/S, podczas gdy cyklina B na granicy faz G2/M cyklu komórkowego [32-34]. Być może, w procesie starzenia gra rolę podwójne zabezpieczenie komórki przed wejściem w fazę podziału. I tak, nie dość, że w starych komórkach nie ma ekspresji genu *cdc2*, a więc nie ma syntezy białka p34, to jeszcze nie zachodzi synteza białek regulujących aktywność tego enzymu. Nie jest wykluczone, że ma tu miejsce blokada wcześniejszego etapu wspólnej regulacji aktywności genu *cdc2* i genów kodujących białka cykliny A i cykliny B.

Protoonkogen *c-fos* jest jednym z genów tzw. wczesnej odpowiedzi [35]. Obserwuje się jego aktywację we wszystkich komórkach prawidłowych stymulowanych do podziałów oraz nowotworowych [36]. Białkowy produkt *c-fos* zlokalizowany jest w jądrze i uważany za jeden ze składników czynników transkrypcyjnych [37]. Czynniki transkrypcyjne są to białka regulujące pierwszy etap ekspresji genów, transkrypcję, poprzez wiązanie się z sekwencją promotorową lub wzmacniającą genu docelowego [38]. Produkty białkowe protoonkogenów, znajdujące się w jądrze oddziałują bezpośrednio z DNA, wykazują więc właściwości czynników transkrypcyjnych [15]. Uważa się, że ich oddziaływanie z DNA stanowi jądrowy etap przekazy-



Ryc. 2. Schemat działania czynnika transkrypcyjnego AP-1.

wania sygnału do stymulacji komórki [39]. Białko Fos oraz inne białka z rodziny genów *fos* tworzą kompleksy z białkowymi produktami drugiego protoonkogeny *c-jun* [40] (Ryc. 2.). Każdy z tych kompleksów nosi nazwę czynnika transkrypcyjnego AP-1 (ang. *activator protein 1*). Każdy czynnik transkrypcyjny AP-1 wiąże się z sekwencją nukleotydów (TGACTCA) zwaną również sekwencją AP-1. Po raz pierwszy sekwencje AP-1 odkryto w promotorze genu małpiego wirusa SV40, ale też opisano bardzo wiele miejsc wiążących AP-1 w genomie ludzkim [36, 41]. Wśród nich są przede wszystkim geny indukowane przez estry forbolu m.in. kodujące metalotioneinę, stromielozynę, kolagenazę oraz interleukinę-2 [41].

Zarówno poziom mRNA genu *c-fos*, jak też zdolność wiązania AP-1 z DNA, są niższe w komórkach starzejących się niż w młodych. Wykazano to w przypadku ludzkich starych fibroblastów hodowanych *in vitro* [23, 42], jak również w przypadku mysich splenocytów pobranych ze starych zwierząt [43]. Niższą zdolność wiązania AP-1 z DNA obserwowano także w limfocytach otrzymanych od pacjentów z zespołem Downa [44]. Zespół Downa, z racji wielu objawów charakterystycznych dla podeszłego wieku, jak osłabiona odpowiedź immunologiczna, zwiększona częstość zapadania na nowotwory i chorobę Alzheimera, ogólna demencja i obniżona długość życia, uważany jest za przykład przedwczesnego starzenia [45]. Obniżona aktywność AP-1 występowała równocześnie ze zmniejszoną zdolnością komórek do proliferacji. Można przypuszczać zatem, że ekspresja protoonkogeny *c-fos* stanowi konieczny warunek do podjęcia przez komórki syntezy DNA [46]. Z pewnością jednak jest to warunek niewystarczający. Ostatnio na przykład wykazano, że transfekcja protoonkogeny *c-fos* do starych fibroblastów nie indukowała w nich syntezy DNA [47-49].

IV. Komórki nieśmiertelnione i antyokogeny

Bardzo przydatne w badaniu procesu starzenia są tzw. komórki nieśmiertelnione (ang. *immortalized*). Fenotypowo komórki nieśmiertelnione różnią się nie tylko od komórek prawidłowych, lecz także od nowotworowych [50] (Tabela 1.). Znacznie częściej też niż prawidłowe, komórki nieśmiertelnione ulegają transformacji nowotworowej. Uważa się, że do transformacji nowotworowej niezbędna jest aktywacja przynajmniej dwóch onkogenów, z których jeden miałby powodować immortalizację [51, 52]. Hodowane *in vitro* komórki gryzoni łatwo ulegają immortalizacji oraz transformacji nowotworowej pod wpływem działania różnych kancerogenów, mutagenów, czy wirusów onkogennych zawierających DNA, a nawet spontanicznie [53]. Natomiast ludzkie fibroblasty są niezwykle odporne na działanie wszelkiego typu kancerogenów oraz promieniowanie jonizujące. Opisano tylko nieliczne przypadki transformacji ludzkich fibroblastów w hodowli pod wpływem długiej ekspozycji na działanie promieniowania jonizującego [54, 55]. Jedynymi czynnikami powodującymi immortalizację, a także transformację nowotworową ludzkich fibroblastów hodowanych *in vitro*, są onkogenne wirusy zawierające DNA, takie jak ludzkie adenowirusy, papilioma oraz małpi wirus SV 40 [56-58]. Ale nawet te wirusy nie powodują immortalizacji z dużą częstością i w sposób bezpośredni [59]. Fibroblasty ludzkie zarażone wirusem SV40, początkowo przyspieszają swój wzrost, zmieniają morfologię i kariotyp. Potem wchodzi w etap nazwany kryzysem, charakteryzujący się dużą śmiertelnością komórek [58]. Czasami jednak pośród umierających komórek pojawia się ognisko, kolonia, komórek intensywnie proliferujących. Są to ludzkie fibroblasty nieśmiertelnione [60]. Pojawiają

Tabela 1.

Niektóre cechy charakteryzujące komórki prawidłowe, unieśmiertelnione i nowotworowe.

| Niektóre cechy fenotypu komórek | Komórki hodowane <i>in vitro</i> | | |
|---|----------------------------------|-------------------|-------------|
| | prawidłowe | unieśmiertelnione | nowotworowe |
| Nieograniczona długość życia | - | + | + |
| Przyczepialność do podłoża | + | + | - |
| Wysoka gęstość w hodowli jednowarstwowej | - | - | + |
| Wzrost w półpłynnych pożywkach | - | - | + |
| Wzrost w postaci nowotworów złośliwych w „nagich” myszach | - | - | + |

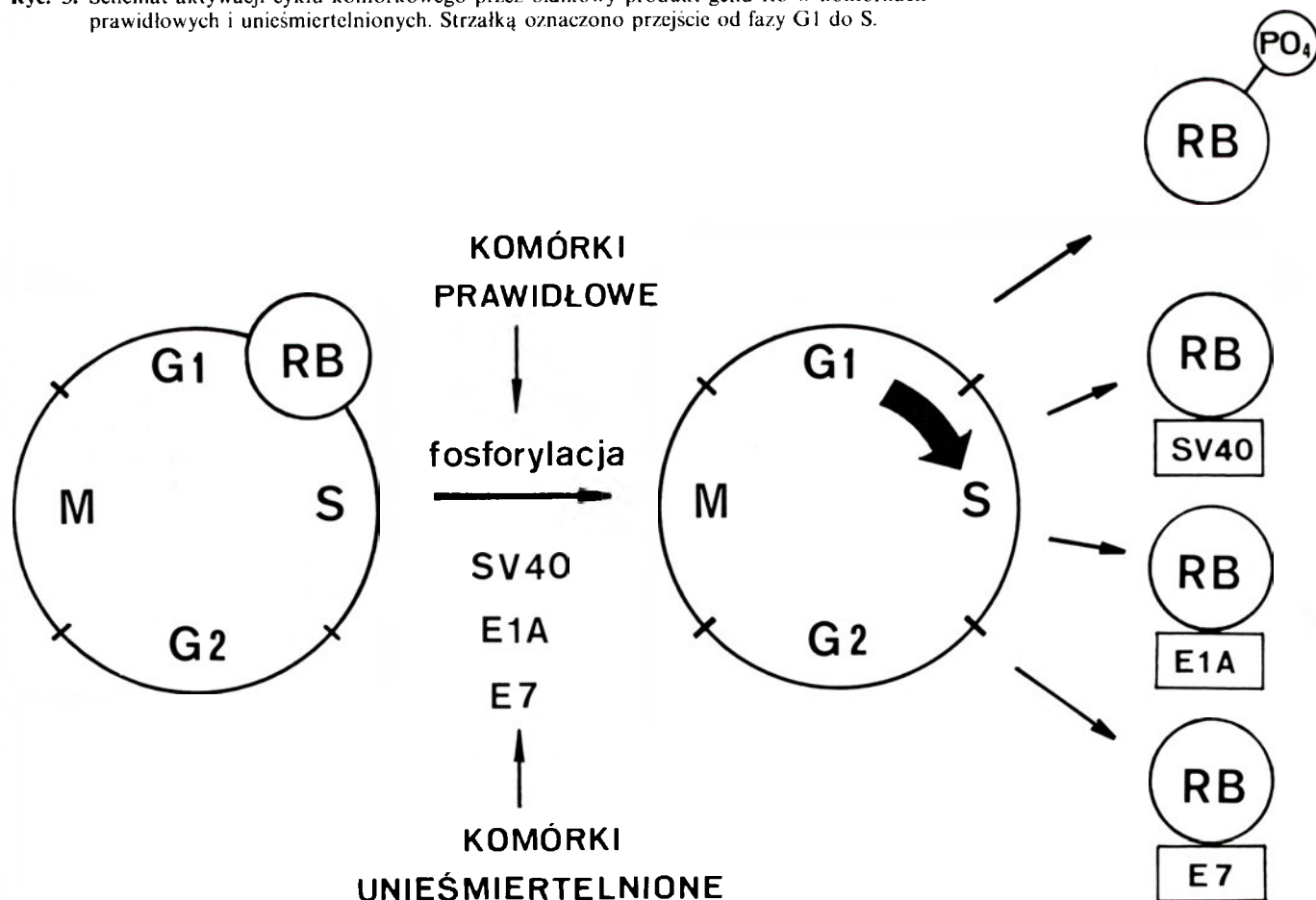
„+” oznacza występowanie jakiejś cechy, a „-” jej brak

się z częstotliwością 3×10^{-7} w hodowli fibroblastów IMR-90 [56] oraz 1×10^{-7} w hodowli fibroblastów MRC-5 [61]. Dlaczego ludzkie fibroblasty w odróżnieniu od fibroblastów gryzoni tak „niechętnie” ulegają unieśmiertelnieniu? Jakie zmiany powodujące wymknięcie się komórki spod kontroli podziałów niesie ze sobą wirus SV40? Białkiem onkogennym wyizolowanym z wirusa SV40 odpowiedzialnym za immortalizację ludzkich fibroblastów, a także transformację nowotworową fibroblastów gryzoni, jak się okazało, jest tzw. duży antygen T (ang. *large T-antigen*). Jak wykazano niedawno, antygen T indukuje w starych komórkach ekspresję genu *c-fos* [62], a także tworzy kompleksy z białkami gospodarza, które są produktami genów supresji transformacji nowotworowej,

zwanych krócej genami supresorowymi lub anty-onkogenami [58].

Geny supresorowe stanowią odkrycie ostatnich lat. Choć nazwa ich sugeruje aktywność przeciwnowotworową, to jednak aktywne są w prawidłowo funkcjonujących komórkach jako negatywne regulatory proliferacji. W komórkach wielu typów komórek nowotworowych występują w formach zmutowanych, lub obserwuje się ich delecję [51]. Do dzisiaj zidentyfikowano kilka genów supresorów transformacji nowotworowej. Z punktu widzenia immortalizacji i starzenia się komórek najciekawsze wydają się być geny *RB* i *p53*. Delecję genu *RB* po raz pierwszy wykazano w przypadku dziecięcego nowotworu siatkówki oka (*siatkówczak*) [52]. W latach późniejszych

Ryc. 3. Schemat aktywacji cyklu komórkowego przez białkowy produkt genu Rb w komórkach prawidłowych i unieśmiertelnionych. Strzałką oznaczono przejście od fazy G1 do S.



wykazano mutacje tego genu występujące w wielu innych nowotworach. Forma niezmutowana genu *RB* niezbędna jest do regulacji prawidłowych podziałów komórkowych [63, 64]. Na granicy faz cyklu komórkowego G1/S następuje fosforylacja białka *RB*, umożliwiającą wejście komórki w fazę syntezy DNA [65, 66]. W starych fibroblastach, nie zdolnych do podziałów, nie znaleziono białka *RB* w formie ufosforylowanej, a więc nieaktywnej [30]. Podobnie jak proces fosforylacji, białka wirusów zawierających DNA poprzez tworzenie kompleksów z *RB*, uniemożliwiają spełnienie jego funkcji inhibitorowej (Ryc. 3). Komórki unieśmiertelnione, odwrotnie niż komórki stare niezdolne do podziałów, dzielą się nieustannie.

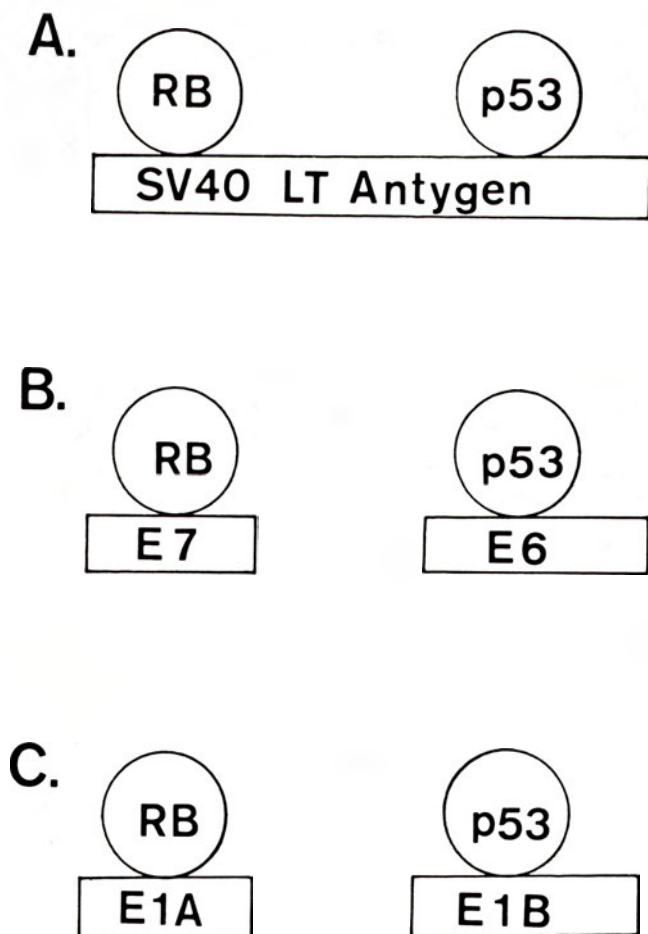
Historia ujawniająca gen *p53* jako gen supresor transformacji nowotworowej jest zupełnie odmienna. Przez długi czas *p53* uważano za typowy onkogen, którego ekspresję wykryto w bardzo wielu nowotworach [67]. Badania ostatnich lat wykazały, że za transformacje nowotworowe odpowiedzialne są zmutowane formy genu *p53* [67]. Mówiąc inaczej ekspresja genu *p53* jest niezbędna do prawidłowej kontroli podziałów komórki, a każda mutacja sprzyja transformacji nowotworowej. Jakie zmiany genu i białka *p53* występują w komórkach starych niezdolnych do podziałów nie wiadomo. Natomiast jasny jest już dzisiaj

związek funkcjonalny pomiędzy immortalizującą aktywnością antygeny T wirusa SV40 oraz białkami *RB* i *p53*. T-antygen ma dwa miejsca wiązania. Do jednego ma powinowactwo białko *RB*, a do drugiego białko *p53* [66]. Tworzenie kompleksu antygeny T z białkami *RB* i *p53* inaktywuje te ostatnie i prowadzi do nieograniczonych podziałów komórkowych. Mutacje punktowe antygeny T w miejscu wiązania jednego albo drugiego białka wykazały, że do zahamowania kontroli podziałów niezbędna jest jednoczesna inaktywacja obydwu białkowych produktów genów supresorowych [68].

Doświadczenia przeprowadzone z innymi wirusami onkogennymi zawierającymi DNA wskazują na występowanie podobnego mechanizmu immortalizacji. Wirus papilioma ma dwa białka onkogenne *E6* i *E7*, a wirus adenoma białka *E1A* i *E1B*. Otóż wykazano, że białko *E7* wirusa papilioma i białko *E1A* wirusa adenoma wiążą komórkowe białko *RB*, natomiast wirusowe białka *E6* i *E1B* wiążą białko *p53* [57] (Ryc. 3 i 4). Białka antyonkogenów *RB* i *p53* działają w komórce jako czynniki transkrypcyjne. Przy czym *p53* może oddziaływać bezpośrednio z DNA [69], a *RB* poprzez wiązanie się z innym czynnikiem transkrypcyjnym zwanym *E2F* [70]. Onkogenne białka wirusów poprzez tworzenie kompleksów z białkami antyonkogenów wpływają na regulację wiązania tych ostatnich z DNA, a tym samym na regulację transkrypcji genów biorących udział w cyklu komórkowym.

V. Dwustopniowy mechanizm komórkowego starzenia

Badania komórek unieśmiertelnionych wirusem SV40 pozwoliły na sformułowanie hipotezy mówiącej o dwustopniowym mechanizmie kontrolującym starzenie komórkowe [71]. Fibroblasty ludzkie otrzymane z płodu dzielą się w hodowli około 50 razy. Fibroblasty transfekowane antygenem T dzielą się dodatkowo 20 razy, po czym większość umiera, a tylko niewielka ich część ulega unieśmiertelnieniu. Twórcy hipotezy dwustopniowego mechanizmu starzenia uważają, że po 50 podziałach następuje włączenie pierwszego mechanizmu starzenia M1 (ang. *mortality stage 1*). Antygen T pozwala komórkom na obejście tego etapu poprzez związanie białka *RB* i białka *p53* i umożliwia im dokonanie dalszych 20 podziałów, po czym mogą wejść w drugi etap starzenia (nazwany tu kryzysem lub (ang. *mortality stage 2*), regulowany w odmienny sposób (nie przez białka *RB* i *p53*). Do wyjścia z kryzysu i unieśmiertelnienia komórek prawdopodobnie dochodzi na skutek nieznanych dzisiaj jeszcze mutacji. Do przeżycia komórek, które wyszły z kryzysu potrzebna jest ekspresja antygeny T w przeciwnym razie uaktywniają się białka kodowane przez antyonkogeny (*RB* i *p53*) i włącza mechanizm pierwszy (M1). Tak więc, zgodnie z tą hipotezą, komórki ludzkie miałyby dwa różne, niezależne od siebie mechanizmy



Ryc. 4. Schemat wiązania genów supresorów nowotworów z białkami onkogennymi wirusów: a) SV 40 b) papilioma i c) adenoma.

prowadzące do starzenia i śmierci, komórki gryzoni zaś tylko mechanizm pierwszy. Hipoteza ta wyjaśnia oporność komórek ludzkich na czynniki kancerogene, istnieje bowiem znacznie mniejsze prawdopodobieństwo jednoczesnego zajścia dwóch niezależnych zdarzeń niż jednego z nich. Bez odpowiedzi pozostaje pytanie, jakie geny odpowiedzialne są za regulację drugiego mechanizmu starzenia. Czy są to inne geny supresorowe? Odpowiedzi, być może już niedługo, dostarczą wyniki badań polegających na transfekcji do komórek unieśmiertnionych i nowotworowych pojedynczych chromosomów wyizolowanych z komórek prawidłowych. Jeśli aberacja chromosomowa w badanych komórkach nowotworowych polega na delecji genów supresorowych, to przy odrobinie szczęścia można natrafić na chromosom, który ma te geny i przywróci komórkom normalny fenotyp i limit podziałów. Do tej pory wykazano, że chromosom 1 — wyizolowany z normalnych starzejących się ludzkich fibroblastów — hamował nieograniczone podziały nowotworowych komórek chemicznych [72]. Pozostaje „tylko” zidentyfikować gen lub geny za to odpowiedzialne. Jednakże wykazano, że transfekcja chromosomu 11, o którym wiadomo, że jest nośnikiem antyjonkogenu WTI nie przywraca komórkom prawidłowego fenotypu [73]. Fakt ten przestaje dziwić, jeśli weźmie się pod uwagę złożoność procesu transformacji nowotworowej. Na przykładzie złośliwego nowotworu jelita grubego wykazano, że w procesie transformacji nowotworowej można wyróżnić kilka etapów pośrednich, morfologicznie zróżnicowanych i charakteryzujących się sekwencyjną ekspresją różnych onkogenów oraz delecją antyjonkogenów [74, 75]. Pamiętać trzeba, że nowotwory różnych typów wykazują swoją własną specyficzność w ekspresji onkogenów i represji antyjonkogenów. Jeśli więc spojrzymy na proces starzenia od strony odwrotnej, a mianowicie powstawania „nieśmiertelnego” nowotworu to poszukiwanie uniwersalnego mechanizmu limitu podziałów komórkowych wydaje się sprawą beznadziejną. Shriber powiedział, „jeśli wydaje ci się, że proces nowotworzenia jest skomplikowany to przyjrzyj się starzeniu!” [76]. Czasami jednak bardzo z pozoru skomplikowane procesy, znajdują nieoczekiwanie proste wyjaśnienia. Do jednej z bardziej przejrzystych hipotez wyjaśniających zasadę limitu podziałów komórkowych należy powstała 20 lat temu [77] odkryta na nowo w ostatnich latach telomerowa hipoteza starzenia [78].

VI. Telomerowa hipoteza starzenia

Autorzy hipotezy telomerowej zakładają, że 1) każdemu podziałowi komórkowemu towarzyszy utrata niewielkiego, zwanego telomerem, końcowego fragmentu każdego chromosomu; 2) skrócenie chromosomów do odpowiedniej długości powoduje włączenie programu starzenia, które prowadzi do zatrzymania podziałów komórkowych; 3) komórki rozrodcze i no-

wotworowe nie starzeją się, gdyż występuje w nich mechanizm chroniący przed utratą telomerów [79]. Wiele danych doświadczalnych potwierdza założenia tej hipotezy [78]. Zaobserwowano występowanie zależności pomiędzy długością telomerów a liczbą podziałów komórkowych [79]. Ponadto wykazano, że ludzkie prawidłowe komórki hodowane *in vitro* nie wykazywały aktywności telomerazy, enzymu katalizującego replikację telomerów na matrycy RNA [80]. Aktywność tego enzymu obserwowano natomiast w nowotworowych komórkach HeLa [81]. Podobnie, w komórkach, którym udało się wyjść z kryzysu (unieśmiertnione) obserwowano pojawianie się aktywnej telomerazy [80]. Postuluje się, że regulacja aktywności telomerazy może stanowić mechanizm drugiego etapu śmiertelności (M2) [81]. Uważa się mianowicie, że niezidentyfikowany jeszcze gen koduje białko hamujące aktywność telomerazy. Mutacje tego genu powodowałyby aktywację telomerazy, i wyjście komórek z kryzysu [81].

VII. Śmierć komórki

Omawiane dotychczas wyniki badań zdecydowanie przemawiają za genetyczną naturą procesu starzenia komórkowego. Czy istnieją jednak geny śmierci? W literaturze dotyczącej śmierci komórek można się spotkać z opisem dwu jej rodzajów: nekrozy i apoptozy. Nekroza stanowi rodzaj śmierci przypadkowej zachodzącej na skutek działania różnych czynników toksycznych. Apoptozę, lub inaczej śmierć programowaną, obserwuje się m.in. w czasie morfogenezy, delecji klonalnej limfocytów w grasicy, cytotoksycznego działania limfocytów CD⁺8, odnowy nabłonka wyściełającego przewód pokarmowy i oddechowy. Mogą ją jednak również wywołać te same czynniki, które wywołują nekrozę [82-84]. Na ogół te dwa procesy są rozróżnialne morfologicznie. Komórki nekrotyczne są powiększone, podobnie jak ich jądra, a błony komórkowe i organelle uszkodzone. W końcowym etapie nekrozy następuje liza komórki, która stanowi przyczynę stanów zapalnych jeśli nekroza zachodzi w organizmie. W odróżnieniu od komórek nekrotycznych, komórki apoptyczne są obkurczone, ich błony jądrowe i komórkowe tworzą uwypuklenia, co prowadzi do powstania tzw. ciałek apoptycznych, które są fagocytowane przez sąsiadujące komórki. Dzięki temu, apoptozie nigdy nie towarzyszy stan zapalny [82]. Ponadto w większości opisanych przypadków apoptozy, obserwowano syntezę RNA i białka [84]. W komórce apoptycznej dochodzi do wzrostu aktywności endonukleaz, zależnych od Ca²⁺ i Mg²⁺, co objawia się fragmentacją DNA (widoczną w żelu agarozowym jako charakterystyczna drabinka) [85], oraz transglutaminaz komórkowych odpowiedzialnych za tworzenie wewnątrzkomórkowych usieciowań niezbędnych do powstawania ciałek apoptycznych [86-88]. Czy stara komórka umiera w sposób, który można

opisać jako nekrozę, czy też apoptozę? Tego tak naprawdę nie wiadomo, gdyż dotychczas nie prowadzono szczegółowych obserwacji śmierci starej komórki.

VIII. Geny śmierci i życia

Śmierci samobójczej, jak czasem również bywa nazywana apoptoza, zapobiega ekspresja protoonkogenu *bcl-2*. Białkowy produkt tego protoonkogenu znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [89]. Po raz pierwszy gen *bcl-2* zidentyfikowano w komórkach ziarnicy złośliwej, nowotworu limfocytów B, w miejscu translokacji chromosomu 14 i 18 [90, 91]. Później niejednokrotnie wykazywano, że fizjologiczna funkcja protoonkogenu *bcl-2* związana jest raczej z przeżywalnością komórek niż stymulowaniem ich do proliferacji. Produkt tego protoonkogenu hamował na przykład śmierć wyselekcjonowanych komórek krwiotwórczych, które pozbawiono limfokin [92, 93]. Limfocyty T, zarówno wyizolowane z grasicy jak też obwodowe otrzymane z myszy transgeniczych, w których dokonano transfekcji genu *bcl-2* przeżywały pomimo traktowania ich w sposób, który normalnie powoduje śmierć komórek (pozbawienie czynników wzrostowych, ekspozycja na promieniowanie jonizujące, glukokortykoidy, estry forbolu, azydek sodu) [94]. W innych doświadczeniach obserwowano hamowanie przez białkowy produkt genu *bcl-2* procesu delecji klonalnej (selekcji niedojrzałych tymocytów), która zachodzi poprzez apoptozę [95]. Wykazano również, że błonowe białko 1 wirusa Epstein-Barra powoduje rozregulowanie ekspresji genu *bcl-2* i zablokowanie apoptozy w komórkach zainfekowanych tym wirusem [96]. Komórki nerwowe szczura, w których dokonano transfekcji ludzkiego genu *bcl-2*, wykazywały w hodowli znacznie wydłużoną przeżywalność (do kilku tygodni) nawet, gdy pozbawiono je czynnika wzrostu nerwu (NGF) [97]. Szczegółowe badania lokalizacji białka BCL-2 wykazały jego obecność w tkankach, w których zachodzą procesy dojrzewania komórek i ich selekcji przez apoptozę. BCL-2 występuje w tkankach zawierających komórki macierzyste, proliferujące, takie jak narządy limfatyczne i nabłonek. Jednakże ekspresja tego genu ogranicza się do komórek, które są już końcowo zróżnicowane i nie podatne na apoptozę [98].

Ostatnio wielokrotnie wykazywano, że protoonkogen *bcl-2* zapobiega apoptozie wywołanej przez protoonkogen *c-myc*. Do komórek chemicznych, w których występowała zwiększona ekspresja genu *c-myc* na skutek szoku cieplnego (gen *c-myc* w tych komórkach znajdował się pod kontrolą promotora białek szoku cieplnego) transfekowano protoonkogen *bcl-2*. Komórki, które wykazywały ekspresję zarówno jednego, jak i drugiego genu, charakteryzowały się znacznie większą przeżywalnością niż komórki, w których indukowano tylko protoonkogen *c-myc* [99]. Podobnie, w szczurzych fibroblastach, w których indukowano estradiolem ekspresję protoonkogenu *c-myc*, znajdującą

cego się pod kontrolą promotora ludzkiego receptora estrogenu obserwowano śmierć morfologicznie scharakteryzowaną jako apoptozę. Jeśli jednak komórki te transfekowano genem *bcl-2* wtedy nie tylko przeżywały, ale również zaczynały się dzielić. Zdaniem autorów tych doświadczeń, ekspresja protoonkogenu *bcl-2* hamowała jedną z funkcji protoonkogenu *c-myc* jaką jest indukcja apoptozy, natomiast nie hamowała funkcji *c-myc* związanej z indukcją komórek do proliferacji [100]. Wyniki tych doświadczeń intrygują już nie tyle ze względu na rolę *bcl-2*, która jest dosyć jednoznaczna i polega na hamowaniu apoptozy, ale ze względu na zdolności protoonkogenu *c-myc* do indukcji śmierci programowanej. Do niedawna aktywność tego protoonkogenu wiązano przede wszystkim z indukcją komórek do proliferacji i różnicowania [101, 102]. Tylko nieliczne badania wskazywały na ekspresję protoonkogenu *c-myc* w umierających komórkach prostaty po podaniu hormonów [103-105] oraz po kastracji szczurów [106]. Zauważono także, że antysensowny w stosunku do mRNA *c-myc* oligonukleotyd hamował apoptozę w komórkach mieszańcowych stymulowanych do śmierci [107]. Natomiast antysensowny w stosunku do mRNA *c-fos* oligonukleotyd nie hamował w tych komórkach apoptozy [107]. Z innych doświadczeń wynikało, że podczas śmierci komórki następuje zarówno indukcja ekspresji protoonkogenu *c-myc* jak i *c-fos* [106, 108, 109] oraz, że w mysich komórkach szpiczaka indukowanych do apoptozy antysensowny w stosunku do *c-fos* oligonukleotyd hamował ten proces [109]. W szczurzych tymocytach indukowanych do apoptozy wykazano wzrost nie tylko ekspresji *c-fos*, lecz także poziomu wiązania czynnika transkrypcyjnego AP-1 z DNA [110].

Jak pogodzić ze sobą udział protoonkogenów *c-fos* oraz *c-myc* w cyklu komórkowym i transformacji nowotworowej z jednej strony a śmiercią komórki z drugiej? Wydaje się prawdopodobnym, że *c-myc*, a w innych przypadkach *c-fos*, mogą nieść ze sobą dwójaki sygnał: do proliferacji i do apoptozy. Dopiero odpowiednie czynniki wzrostowe mogą wprowadzić drugi sygnał, który zahamuje apoptozę i zastymuluje komórki do proliferacji. Dwustopniowy mechanizm transformacji nowotworowej z indukcją apoptozy może reprezentować także onkogeny adenowirusa zawierający DNA. Ma on wspomniane wcześniej dwa onkogeny *E1A* i *E1B*. Każdy z tych onkogenów koduje po dwa białka [111]. Ostatnie doświadczenia wykazały, że białka *E1A* wywołują apoptozę w komórkach nerki szczura, podczas gdy jedno z białek *E1B* (19-kDa) hamuje śmierć komórki, podobnie jak ludzki protoonkogen *bcl-2* [112, 113]. Do pełnej transformacji nowotworowej niezbędna jest kooperacja dwóch onkogenów (*E1A* i *E1B*) przy czym jeden z nich, paradoksalnie, niesie ze sobą sygnał do śmierci, a drugi do nieśmiertelności, która jednakże nie może się ujawnić bez ekspresji genu indukującego śmierć. Czy zasadny zatem byłby podział genów na geny śmierci i geny

życia? Do jakiej kategorii genów zaliczyć protoonkogen *c-myc*? Wykazano, że białkowy produkt genu *c-myc* wiąże się z białkiem RB znosząc jego supresorową funkcję [114]. Wiadomo, że *RB* jest genem supresorowym, ale czy jest on zdolny do indukcji apoptozy? Na razie nie opublikowano wyników doświadczeń przemawiających za tym. Natomiast wiadomo, że ekspresja niezmutowanej formy genu supresorowego *p53* indukowała apoptozę w mysich komórkach białaczkowych [115] oraz w komórkach ludzkiego nowotworu jelita grubego [116]. Uważa się ponadto, że występuje współzależność działania *p53* i *E1A* w indukcji apoptozy [117].

Bardzo jasne zróżnicowanie na geny śmierci i życia wydaje się występować u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Z 1090 komórek somatycznych tego nicienia 131 umiera w czasie rozwoju osobniczego (aż do osiągnięcia formy dojrzałej). Wykazano w nich obecność dwu genów *ced-3* i *ced-4*, które są aktywne w komórkach umierających. Jeśli spowoduje się mutacje tych genów, komórki te przeżywają. Antagonistycznie w stosunku do tych genów działa gen *ced-9*. Ekspresja tego genu zapobiega śmierci komórek, gdyż mutacje hamujące jego aktywność powodują przedwczesną śmierć całego organizmu [118].

Wracając jednak do tkanek kręgowców i rozważań o śmierci komórek młodych i starych można pokusić się o hipotezę zakładającą, że komórki stare niezdolne do ekspresji protoonkogeny *c-fos* — nie będą w stanie uruchomić programu apoptozy, w którym ten protoonkogen ma swój udział. Niewykluczone jednak, że w śmierci starych komórek główną rolę może odgrywać protoonkogen *c-myc*, którego ekspresja nie jest zahamowana w starych komórkach. Jak dotychczas nic nie wiemy na temat ekspresji *bcl-2* w starych komórkach. Czy do apoptozy zdolne są tylko komórki proliferujące, a niedzielnym się komórkom starym można by przypisać całkiem inny rodzaj śmierci? Wydaje się, że odpowiedzi na te pytania, i jeszcze na wiele innych związanych z umieraniem komórek, udzielią nam badania już w ciągu najbliższych lat.

Artykuł otrzymano 11 marca 1993 r.

Zaakceptowano do druku 20 września 1993 r.

Piśmiennictwo

- Hayflick L, Moorehead PS (1961) *Exp Cell Res* **25**: 585-621
- Hayflick L (1965) *Exp Cell Res* **37**: 614-636
- Hayflick L (1992) *Exp Gerontol* **27**: 363-368
- Pereira-Smith OM (1992) *Exp Cell Res* **27**: 441-445
- Hayflick L (1970) *Exp Gerontol* **5**: 291-30
- Goldstain S (1990) *Science* **249**: 1129-1133
- Peacocke M, Campisi J (1991) *J Cell Biochem* **45**: 147-155
- Sikora E (1989) *Post Biochem* **35**: 563-574
- Sikora E (1990) *Zesz Nauk UJ* **13**: 184-192
- Harman D (1984) *Age* **7**: 111-131
- Monti D, Troiano L, Tropea F, Grassilli E, Cossarizza A, Barozzi D, Pelloni MC, Tamassia MG, Bellomo G, Franceschi C (1992) *Am J Clin Nutr* **55**: 1208S-1214S
- Pereira-Smith OM, Smith JR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6042-6046
- Bunn CL, Tarrant GM (1980) *Exp Cell Res* **127**: 385-396
- Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW (1989) *Science* **249**: 666-669
- Hunter T (1991) *Cell* **64**: 249-270
- Bishop JM (1987) *Science* **235**: 305-310
- Cristofalo VJ, Pingolo RJ, Cianciarulo FL, DiPaolo BR, Rotenberg M (1992) *Exp Gerontol* **27**: 429-432
- Paulsson Y, Bywater M, Pfeiffer-Ohlsson S, Ohlsson R, Nilsson S, Heldin CH, Westermark B, Betsholtz C (1986) *EMBO J* **5**: 157-162
- Philips PD, Kaji K, Cristofalo VJ (1984) *J Gerontol* **39**: 11-17
- Plisko SR, Gilhachrest BA (1983) *J Gerontol* **38**: 513-518
- Gerhard GS, Philips PD, Cristofalo VJ (1991) *Exp Cell Res* **193**: 87-92
- Rittling SR, Brooks KM, Cristofalo VJ, Baserga E (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3316-3320
- Seshadri T, Campisi J (1990) *Science* **247**: 205-209
- Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Shimke RT (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9086-9090
- Maciera-Coelho A (1975) *Gerontologia* **22**: 3-8
- Richter KH, Afshari CA, Annab LA, Burkhardt BA, Owen RD, Boyd JB, Barrett JC (1991) *Cancer Res* **51**: 6010-6013
- Stein GH, Drullinger LF, Robertorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11012-11016
- Taya Y, Yasuda H, Kamyo M, Kazuyasu N, Nakamura Y, Ohba Y, Nishimura S (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **164**: 580-586
- Lin BTY, Gruenwald S, Moria AO, Lee WH, Wang JYJ (1991) *EMBO J* **10**: 857-864
- Stein GH, Beeson M, Gordon L (1990) *Science* **249**: 666-669
- Grzelakowska-Sztabert B (1993) *Post Biochem* **39**: 16-24
- Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Brechot C (1990) *Nature (Lond)* **343**: 555-557
- Pines J, Hunter Z (1989) *Cell* **58**: 833-846
- Pines J, Hunter T (1990) *Nature (Lond)* **346**: 760-763
- Lau LF, Nathans D (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1182-1185
- Angel P, Karin M (1991) *Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-157
- Lewin B (1991) *Cell* **64**: 303-312
- Mitchell P, Tijan R (1989) *Science* **245**: 371-378
- Meek DW, Street AJ (1992) *Biochem J* **287**: 1-15
- Curran T, Franza BR (1989) *Cell* **55**: 395-397
- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra JR, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M (1987) *Cell* **49**: 729-739
- Riabowol K, Shiff J, Gilman M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 157-161
- Sikora E, Kamińska B, Radziszewska E, Kaczmarek L (1992) *FEBS Lett* **312**: 179-182
- Sikora E, Radziszewska E, Maślińska D, Kmiec T (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 269-272
- Cossarizza A, Monti D, Montagniani G, Ortolani C, Masi M, Zannotti M, Franceschi C (1990) *Am J Med Genet Suppl* **7**: 213-218
- Irving J, Feng L, Wistrom C, Pikaart M, Villeponteau B (1992) *Exp Cell Res* **202**: 161-166
- Phillips PD, Pignolo RJ (1992) *Exp Gerontol* **27**: 403-407
- Philips PD, Pingolo RJ, Nishikura K, Cristofalo VJ (1992) *J Cell Physiol* **151**: 206-212
- Rose DW, McCabe G, Feramisco RJ, Adler M (1992) *J Cell Biol* **119**: 1405-1411

50. Newbold RF, Overell RW (1983) *Nature (Lond)* **304**: 649-651
51. Weinberg RA (1991) *Science* **254**: 1138-1146
52. Weinberg RA (1989) *Cancer Res* **49**: 3713-3721
53. Rohme D (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 5009-5013
54. Borek C (1980) *Nature (Lond)* **283**: 776-778
55. Milo GE, Noyes I, Donahoe J, Weisbrode S (1981) *Cancer Res* **41**: 5096-5102
56. Strauss M, Griffin BE (1990) *Cancer Cells* **2**: 360-365
57. Linder S, Marshal H (1990) *Exp Cell Res* **191**: 1-7
58. Shy JW, Wright WE, Werbin H (1991) *Biochim Biophys Acta* **1072**: 1-7
59. Shy JW, Wright WE (1989) *Exp Cell Res* **184**: 109-118
60. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shy JW (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 3088-3092
61. Huschtscha LI, Jolliday R (1983) *J Cell Sci* **63**: 77-99
62. Campisi J (1992) *Exp Gerontol* **27**: 397-401
63. Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittnacht S, Weinberg RA (1992) *TIBS* **17**: 312-315
64. Hamel PA, Gallie BL, Philips RA (1992) *TIG* **8**: 180-184
65. Mihara K (1989) *Science* **246**: 1300-1303
66. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E (1989) *Cell* **58**: 1097-1105
67. Vogelstein B, Kinzler KW (1992) *Cell* **70**: 523-526
68. Shy JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991) *Exp Cell Res* **196**: 33-39
69. Oren M (1992) *FASEB J* **6**: 3169-3176
70. Nevins JR (1992) *Science* **258**: 424-429
71. Wright WE, Shay JW (1992) *Exp Gerontol* **27**: 383-389
72. Sugawara O, Oshimura M, Koi M, Annab LA, Barret JC (1990) *Science* **247**: 707-710
73. Ning Y, Shy JW, Lovell M, Taylor L, Ledbetter DH, Pereira-Smith OM (1991) *Exp Cell Res* **192**: 220-226
74. Volgestein B, Fearson ER, Kern SE, Hamilton SR, Presinger AC, Nakamura Y, White E (1989) *Science* **244**: 207-211
75. Fearon ER, Volgestein B (1990) *Cell* **61**: 759-767
76. Gibbons A (1990) *Science* **250**: 622-625
77. Olovnikov AM (1973) *J Theor Biol* **41**: 181-190
78. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) *Nature (Lond)* **345**: 458-460
79. Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC (1992) *Exp Gerontol* **27**: 375-382
80. Counter CM, Awilon AA, Lefevre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S (1992) *EMBO J* **11**: 1921-1929
81. Wright WE, Shy JW, (1992) *TIG* **8**: 193-197
82. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980) *Int Rev Cyt* **68**: 251-306
83. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) *Br J Cancer* **26**: 239-257
84. Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ, Grimes EA (1992) *TICB* **2**: 263-267
85. Arends MJ, Morris RG, Wyllie H (1990) *Am J Path* **136**: 593-608
86. Fesus L, Davies PJ, Piacentini (1991) *Eur J Cell Biol* **56**: 170-177
87. Knight CRL, Rees RC, Griffin M (1991) *Biochim Biophys Acta* **1096**: 312-318
88. Manteuffel-Cymborowska M (1993) *Post Biochim* **39**: 118-126
89. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) *Nature (Lond)* **348**: 334-336
90. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1984) *Science* **226**: 1097-1099
91. Bakhsi A (1985) *Cell* **41**: 899-906
92. Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) *Nature (Lond)* **335**: 440-442
93. Nuez G, London L, Hockebery D (1990) *J Immunol* **144**: 3602-3610
94. Strasser A, Harris A, Cory S (1991) *Cell* **67**: 889-899
95. Siegel RM, Katsumata M, Miyashita T, Louine DC, Greene MI, Reed JC (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7003-7007
96. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A (1991) *Cell* **65**: 1107-1115
97. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC (1992) *Science* **258**: 302-304
98. Hockenbery D, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6961-6965
99. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR (1992) *Nature (Lond)* **359**: 552-556
100. Fanidi A, Harrington EA, Evan GI (1992) *Nature* **369**: 554-556
101. Prochownik EV, Kukowska J, Rogers C (1988) *Molec Cell Biol* **8**: 3683-3695
102. Kaczmarek L, Hyland JK, Watt R, Rosenberg M, Baserga R (1985) *Science* **228**: 1313-1315
103. Rennie PS, Brucovsky N, Buttyan R, Benson M, Cheng H (1988) *Cancer Res* **48**: 6309-6312
104. Kyprianou N, English HF, Davidson NE, Isaacs TJ (1991) *Cancer Res* **51**: 162-166
105. Quarby V, Beekman W, Wilson E, French F (1987) *Mol Endocrinol* **1**: 865-874
106. Buttyan R, Zakeri Z, Lockshin R, Wolgemuth D (1988) *Mol Endocrinol* **2**: 650-657
107. Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ, Cotter TG, Bissonnette RP, Green DR (1992) *Science* **257**: 212-214
108. Grassilli E, Carcereri de Prati A, Monti D, Troiano L, Menegazzi M, Barbieri D, Franceschi C, Suzuki H (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **188**: 1261-1266
109. Colotta F, Polentarutti N, Sironi M, Mantovani A (1992) *J Biol Chem* **267**: 18278-18298
110. Sikora E, Grassilli E, Bellesia E, Troiano L, Franceschi C (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 386-391
111. White E, Cipriani R (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 120-130
112. White E, Sabbatini P, Debbas M, Wold WSM, Kusher DI, Gooding L (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 2570-2580
113. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7742-7746
114. Goodrich DW, Lee WH (1992) *Nature (Lond)* **360**: 177-179
115. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991) *Nature (Lond)* **352**: 345-347
116. Shaw P, Bowey R, Tardy S, Sahal R, Sordat B, Costa J (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4495-4499
117. Debbas M, White E (1993) *Genes & Develop* **7**: 546-554
118. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz R (1992) *Nature (Lond)* **356**: 494-499

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.

Oligodeoksyrybonukleotydy jako narzędzie specyficznej regulacji transkrypcji genów

Oligodeoxyribonucleotides as a tool for specific transcriptional gene regulation

ARKADIUSZ SZKLARCZYK*

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Oligodeoksyrybonukleotydy tworzące z DNA potrójną helisę (THF-ODN) jako związki regulujące transkrypcję
 - II-1. Warunki powstania potrójnej helisy
 - II-2. Specyficzność rozpoznawania sekwencji DNA przez THF-ODN
 - II-3. Efekt biologiczny utworzenia potrójnej helisy
 - II-4. THF-ODN w regulacji transkrypcji *in vivo*
- III. Dwuniciowe oligodeoksyrybonukleotydy (dsODN) wiążące czynniki transkrypcyjne, jako związki regulujące transkrypcję
 - III-1. Dwuniciowe ODN w regulacji transkrypcji *in vitro*
 - III-2. Dwuniciowe ODN w regulacji transkrypcji *in vivo*
 - III-2a. Iniekcje dwuniciowych ODN do jąder komórkowych
 - III-2b. Dwuniciowe ODN w hodowli komórkowej

Contents:

- I. Introduction
- II. Triple helix forming oligodeoxyribonucleotides (THF-ODN) as transcriptional regulators
 - II-1. Requirements for triple helix formation
 - II-2. Specificity of DNA recognition by THF-ODN
 - II-3. Biological effects of triple helix
 - II-4. THF-ODN in transcription regulation *in vivo*
- III. Transcription factors binding double stranded oligodeoxyribonucleotides (dsODN) as transcriptional regulators
 - III-1. Double stranded ODN in transcription regulation *in vitro*
 - III-2. Double stranded ODN in transcription regulation *in vivo*
 - III-2a. Injections of double stranded ODN into the cell nucleus
 - III-2b. Double stranded ODN in cell culture

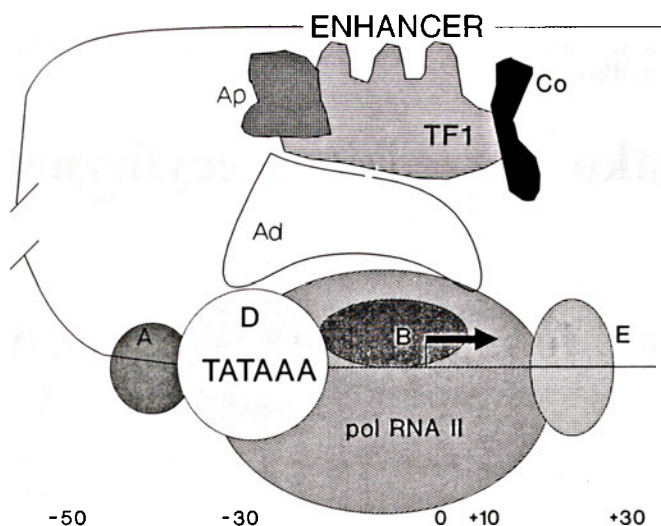
I. Wprowadzenie

Regulacja na poziomie transkrypcji ma największy udział w kontroli ekspresji większości genów eukariotycznych. Na transkrypcję składają się trzy, prawdopodobnie niezależnie regulowane, procesy: inicjacja, elongacja i terminacja. Przyjmuje się, że istota regulacji tych procesów leży w oddziaływaniu pomiędzy różnymi białkowymi czynnikami transkrypcyjnymi (ang. *transcription factors*, *TF*) swoście rozpoznającymi określone sekwencje genu [1-3] (Ryc. 1).

Sztuczny regulator transkrypcji musi spełniać dwa podstawowe warunki: (1) powinien zmieniać kluczowe etapy tego procesu (np. zależne od połączenia białek z określonymi sekwencjami genu) i (2) jego działanie powinno być możliwie specyficzne (tj. nie wpływać na transkrypcję innych genów). Duże nadzieje na uzyskanie sztucznego regulatora transkrypcji wiąże się z oligodeoksyrybonukleotydami (ODN), syntetycznymi fragmentami DNA składającymi się z ok. 10-40 nukleotydów o strukturze jedno- lub dwuniciowej.

Wykaz stosowanych skrótów: A — adenina; C — cytydina; G — guanina; DNaza I — deoksyrybonukleaza I; II-2R β — podjednostka β receptora interleukiny 2; II-R α — podjednostka α receptora interleukiny 2; II-6 — interleukina 6; nt — nukleotydy; ODN — oligodeoksyrybonukleotydy; α -ODN — ODN o konfiguracji α tzn. zasada znajduje się pod płaszczyzną pierścienia cukrowego; dsODN — dwuniciowe ODN; O-ODN — ODN z wiązaniem fosfodwuestrowym (naturalny analog); M-ODN — metylofosforanowy analog ODN; S-ODN — tiofosforanowy analog ODN; ssODN — jednoniciowe ODN; PHA — fitohemaglutynina; PMA — ester forbolowy kwasu mirystylowego i octowego; T — tymidyna; TF — czynnik transkrypcyjny; TH — potrójna helisa; THF-ODN — ODN tworzące potrójną helisę; Tm — temperatura topnienia.

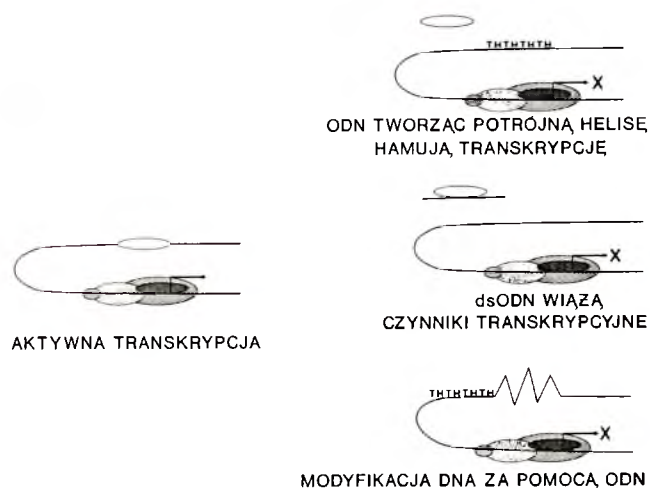
* student V roku I Wydz. Lek. Akademii Medycznej w Warszawie, Pracownia Hodowli Komórek i Tkanek, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



Ryc. 1. Model regulacji inicjacji transkrypcji genów zależnych od polimerazy RNA II; Ap- białko dodatkowe, TF1 — aktywator, Co — białko kofaktorowe, Ad — białko adaptacyjne, A, B, D, E — czynniki podstawowe transkrypcji

Jednoniciowe ODN mogą w odpowiednich warunkach połączyć się specyficznym z docelową sekwencją dwuniciowego DNA tworząc potrójną helisę (ang. *triple helix, TH*). W przypadku, gdy TH powstanie w miejscu ważnym dla transkrypcji, może zmienić jej przebieg. ODN tworzące TH (ang. *triple helix forming ODN, THF-ODN*) mogą być również wykorzystane jako nośniki aktywnych grup, trwale lub czasowo modyfikujących DNA w obrębie sekwencji docelowej. Inną możliwością jest zastosowanie dwuniciowych (ang. *double stranded, ds*) ODN o sekwencji rozpoznawanej przez określony czynnik transkrypcyjny, wiążących kompetencyjnie to białko i zapobiegających jego połączeniu z naturalną sekwencją genu (Ryc. 2).

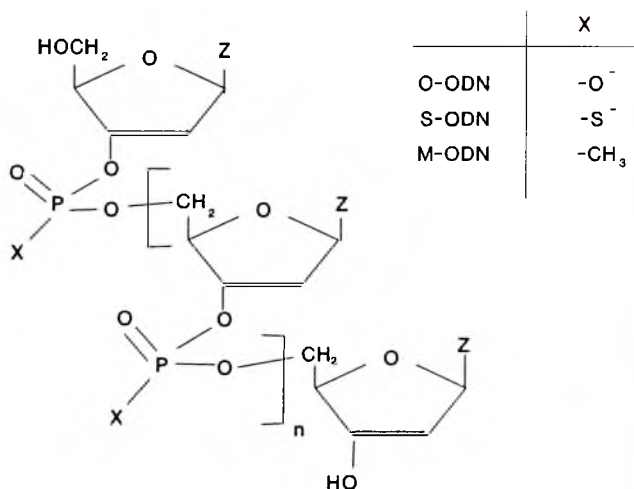
Istnieje wiele różnych ODN (Ryc. 3) uzyskanych w wyniku modyfikacji wiązania fosfordwuestrowego w oligodeoksyrybonukleotydach (obok formy naturalnej O-ODN uzyskano np. S-ODN tiofosforanowy analog ODN i M-ODN metylofosforanowy analog



Ryc. 2. Regulacja transkrypcji za pomocą ODN; TH — potrójna helisa; dsODN — dwuniciowe oligodeoksyrybonukleotydy; x oznacza zahamowanie transkrypcji

ODN. W α -ODN zmieniono konfigurację związku, zasada znajduje się tu pod płaszczyzną pierścienia deoksyrybozy, a nie nad jak w naturalnych β -ODN. Analogi różnią się stabilnością w płynach biologicznych, mechanizmami wnikania do komórki, kinetyką formowania kompleksu z kwasem nukleinowym, efektami niespecyficznymi i innymi cechami. W pracach omawianych poniżej stosowano przeważnie ODN z naturalnym wiązaniem fosfordwuestrowym (O-ODN o konfiguracji β).

Innym rodzajem modyfikacji jest sprzężenie ODN z aktywnymi związkami: — związkami tworzącymi wiązanie krzyżowe pomiędzy DNA i ODN (np. psoralen [4]; — interkalatorami stabilizującymi potrójną helisę (np. akrydyna [5]); — związkami powodującymi przecięcie DNA w miejscu związania ODN np. fenantrolina [6], EDTA-Fe [7]. ODN rozpoznając specyficznym docelowe sekwencje DNA służy tu jako nośnik aktywnych związków.



Ryc. 3. Budowa chemiczna analogów ODN; Z — zasada (T, A, G, C), n — liczba nukleotydów; O-ODN — oligodeoksyrybonukleotydy niemodyfikowane, S-ODN — analog tiofosforanowy ODN; M-ODN — analog metylofosforanowy ODN

II. ODN tworzące potrójną helisę z DNA jako związki regulujące transkrypcję

II-1. Warunki powstawania potrójnej helisy

Podwójna helisa DNA powstaje przez wytworzenie wiązań wodorowych typu Watsona-Cricka pomiędzy odpowiednimi zasadami w parach A-T i G-C. Zawiera ona dwie bruzdy, z których większa jest głównym miejscem oddziaływania białek z sekwencjami genu. Wiązania typu Watsona-Cricka nie wyczerpują jednak wszystkich możliwości oddziaływań wewnątrz podwójnej helisy. Możliwe jest utworzenie dodatkowych wiązań wodorowych pomiędzy jedną z nici istniejącej już podwójnej helisy a pojedynczą nicią kwasu nukleinowego np. oligodeoksyrybonukleotydem [6, 7]. Powoduje to w efekcie powstanie potrójnej helisy (ang. *triple helix, TH*). Warunkiem utworzenia potrójnej

helisy pomiędzy DNA a ODN jest obecność sekwencji polipurynowej (składającej się głównie z nukleotydów A i G), o odpowiedniej długości, jednej z nici DNA. Opisano dwa rodzaje potrójnej helisy tzw. motywy zależne od składu zasad ODN: pirymidynowy (ODN składa się z C i T) oraz purynowy (ODN składa się z G i A (T)).

ODN z motywem pirymidynowym przyłącza się do polipurynowej sekwencji jednej z nici DNA w wielkiej bruzdzie za pomocą wiązań wodorowych typu Hoogsteena (Ryc. 4). Powstają wówczas następujące układy trójek nukleotydów: T^*A-T lub C^*G-C (* oznacza wiązania typu Hoogsteena, — wiązania typu Watsona-Cricka, druk pochyły oznacza nukleotyd ODN). Nić ODN zorientowana jest zgodnie z kierunkiem 5'-3' nici purynowej DNA (przeciwnie do nici pirymidynowej DNA). Stabilność potrójnej helisy z motywem pirymidynowym zależy od uprotonowania cytozyny, jest zatem większa w środowisku kwaśnym (pH 5-6). Podstawienie cytozyny jej analogami umożliwia powstanie potrójnej helisy, która jest trwała w pH fizjologicznym [8].

O powstaniu potrójnej helisy między DNA a ODN z motywem purynowym decydują wiązania: G^*G-C oraz $A(T)^*A-T$ [9-11]. Stabilność TH tego typu nie zależy od pH środowiska, zależy natomiast w dużym stopniu od liczby zasad G w sekwencji polipurynowej DNA (tzw. sekwencje bogate w G). Orientacja nici ODN w stosunku do nici polipurynowej DNA zależy

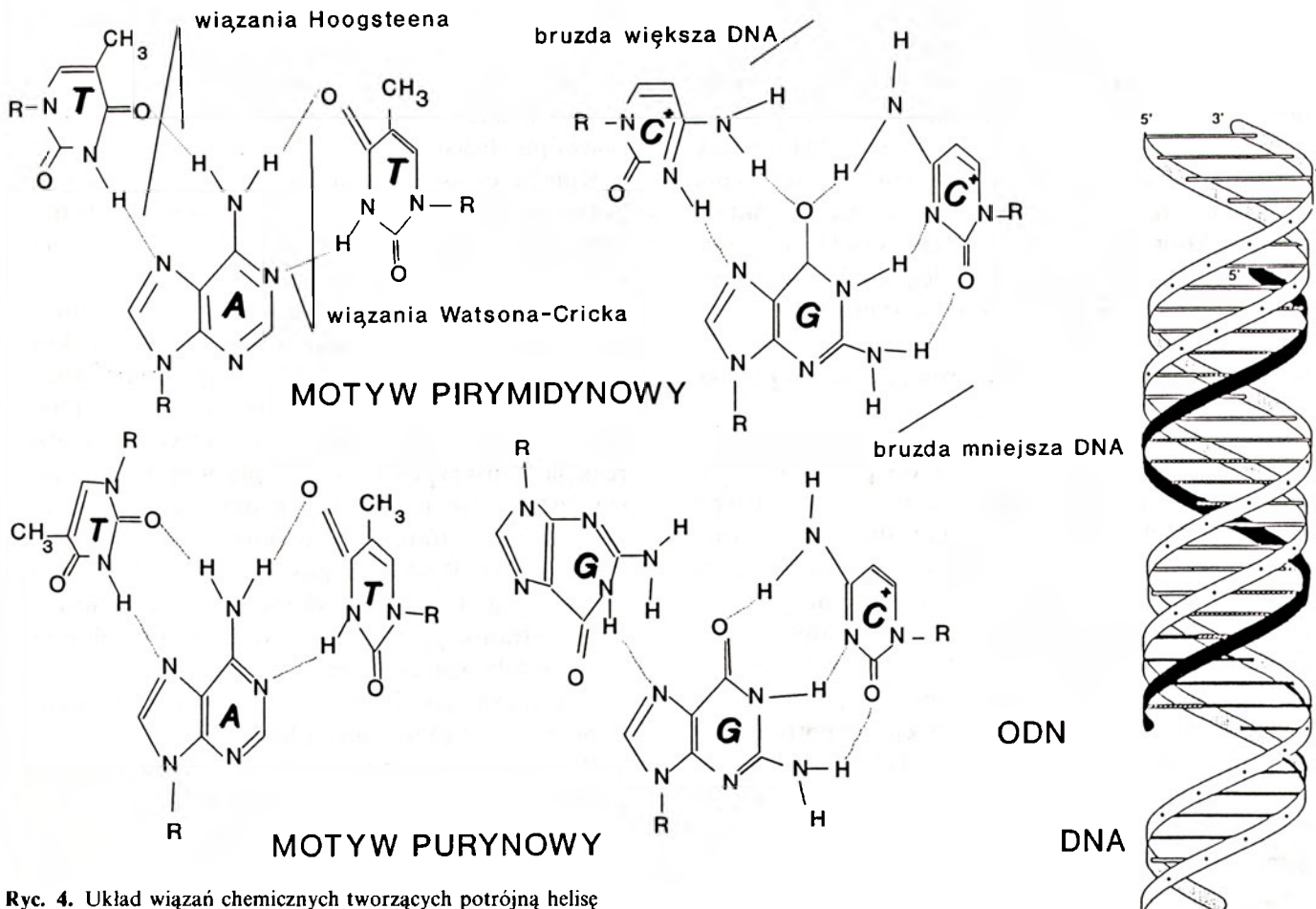
od składu zasad ODN.

Podstawowy problem w powszechnym zastosowaniu ODN stanowi konieczność występowania w obrębie jednej z nici DNA sekwencji polipurynowej. Próby rozszerzenia możliwości rozpoznawczych ODN tworzących potrójną helisę z DNA polegają na projektowaniu struktur złożonych z dwóch ODN połączonych końcami 3', które mogą rozpoznawać odcinki oligopurynowe leżące na przeciwnych niciach DNA [12, 13]. Inną możliwością jest opracowanie takich analogów naturalnych zasad, które umożliwiłyby specyficzne rozpoznawanie dowolnej (nie tylko oligopurynowej) sekwencji DNA.

Podsumowując, potrójna helisa powstaje pomiędzy sekwencją polipurynową DNA i ODN o odpowiednim składzie zasad; za powstanie potrójnej helisy odpowiadają wiązania wodorowe typu Hoogsteena; orientacja ODN w stosunku do jednej z nici DNA zależy od rodzaju potrójnej helisy.

II-2. Specyficzność rozpoznawania sekwencji DNA przez THF-ODN

Krytyczną długością dla ODN, rozpoznającego specyficzną pojedynczą sekwencję ludzkiego genomowego DNA, jest 17 zasad [14]. Prawdopodobieństwo połączenia się ODN z nieodpowiednią sekwencją — i co za tym idzie możliwość nieporządkanych skutków — rośnie wraz ze zmniejszaniem długości ODN.



Ryc. 4. Układ wiązań chemicznych tworzących potrójną helisę

W rzeczywistości, prawdopodobieństwo niespecyficznego działania ODN (nawet tych krótszych niż 17 nukleotydów) *in vivo* nie jest duże. ODN tworzące potrójną helisę z DNA mają oddziaływać głównie z wybranymi sekwencjami regulatorowymi lub kodującymi genów. Spodziewany efekt niespecyficzny pojawi się jedynie wówczas gdy dana sekwencja spełnia taką rolę; połączenie z sekwencją nie będącą częścią genu (np. sekwencje powtarzające się) pozostanie bez wpływu na transkrypcję. Ponadto w komórce jednocześnie transkrybowanych jest tylko ok. 10% genów co również znacznie zmniejsza możliwość niespecyficznych efektów ODN; nawet jeśli potrójna helisa powstanie jednocześnie w obrębie sekwencji kilku genów, efekt zależny od jej powstania dotyczył będzie jedynie genu aktywnego.

Z badań *in vitro* nad motywem pirymidynowym wynika, że zamiana puryny na pirymidynę w obrębie sekwencji docelowej DNA powoduje destabilizację potrójnej helisy, przejawiającą się jako spadek temperatury topnienia (T_m); temperatura topnienia potrójnej helisy oznacza temperaturę w $^{\circ}\text{C}$, w której połowa cząsteczek TH rozpada się do ODN i DNA). Najbardziej destabilizujące są mutacje w środku sekwencji docelowej. Zamiana G na T w środku sekwencji homopurynowej o długości 13 par zasad powoduje obniżenie T_m o 27°C , podczas gdy ta sama mutacja na skraju sekwencji obniża T_m jedynie o 8°C [15].

Potwierdzenie wysokiej specyficzności powstawania potrójnej helisy uzyskano również badając układy bardziej skomplikowane. W jednym z doświadczeń zaobserwowano przecięcie pojedyncze w DNA genomu drożdży (14 000 000 par zasad) powstałe na skutek utworzenia potrójnej helisy między DNA a ODN o długości 24 nt, do którego przyłączony był związek aktywny EDTA-Fe [16]. W innym doświadczeniu THF-ODN (o długości 15 nt) z pojedynczymi mutacjami punktowymi (ODN kontrolne) w układzie *in vivo* nie zaburzały transkrypcji, podczas gdy ODN bez mutacji hamowały znacząco transkrypcję [4].

II-3. Efekt biologiczny utworzenia potrójnej helisy

Pierwsze dane uzyskane w doświadczeniach *in vitro*, które pokazały efekt utworzenia TH pochodzą z doświadczeń przeprowadzonych przez Mahera i w s p. [17]. Badacze ci skonstruowali plazmid zawierający sekwencję homopurynową zachodzącą na sekwencje rozpoznawane przez trzy różne rodzaje białek oddziaływujących specyficznie z DNA: endonukleazy restrykcyjne Ava I i Taq I, metylazę restrykcyjną M. Taq I oraz czynnik transkrypcyjny Sp1. Dodanie homopirymidynowego ODN tworzącego potrójną helisę z sekwencją homopurynową DNA zapobiegało przecięciu DNA przez Ava I i Taq I oraz metylacji przez M. Taq I. Podobnie, powstanie potrójnej helisy w miejscu wiązania Sp1 powodowało zniknięcie charakterystycznego footprintu Sp1 po trawieniu DNazą I.

Footprinting z użyciem DNazy I również potwierdza fakt tworzenia się potrójnej helisy. Zmiany w obrazie trawienia DNA są wynikiem powstania potrójnej helisy. Ponieważ DNaza I oddziałuje z DNA w jego mniejszej bruzdzie, zatem blokowanie dostępu dla enzymu przez ODN, który wiąże się w większej bruzdzie nie może być wytłumaczeniem ochronnego działania tego ostatniego. Zjawisko to polega prawdopodobnie na miejscowej zmianie konformacji DNA (zweźnienie mniejszej bruzdy) wywołanej utworzeniem potrójnej helisy. Zmiana konformacji DNA nie ogranicza się do miejsca wiązania ODN i dotyczy także sekwencji leżących o kilka par zasad od miejsca tworzenia potrójnej helisy [18].

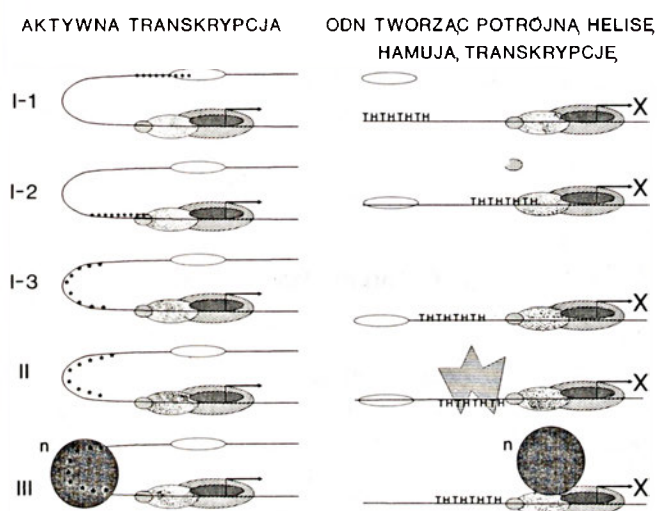
Wydaje się jednak, że zmiana konformacji DNA wywołana powstaniem potrójnej helisy nie wystarcza do zablokowania wiązania białka w wielkiej bruzdzie jeśli związany ODN nie zachodzi (przynajmniej częściowo) na sekwencję rozpoznawaną przez to białko. Taką obserwację poczyniono tworząc potrójną helisę w miejscu przylegającym (ale nie zachodzącym) do sekwencji wiążącej białko UL9 regulujące replikację wirusa HSV-1 [19]. Test opóźnienia migracji w żelu, wykorzystujący różnice w ruchliwości elektroforetycznej dwuniciowego DNA, TH i DNA z przyłączonym białkiem, wykazał jednoczesne istnienie potrójnej helisy i kompleksu UL9-DNA.

Zatem powstanie potrójnej helisy między ODN i dwuniciowym DNA blokuje wiązanie białek (np. czynników transkrypcyjnych, nukleaz i metylaz restrykcyjnych) pod warunkiem, że sekwencja wiążąca białka pokrywa się przynajmniej częściowo z sekwencją biorącą udział w powstaniu potrójnej helisy. Prawdopodobna jest również zmiana budowy przestrzennej podwójnej helisy.

Kolejne doświadczenia potwierdziły, że powstanie potrójnej helisy w określonych miejscach genu może wpływać na proces inicjacji transkrypcji. Cooney i w s p. [11] zastosowali ODN o długości 27 zasad z przewagą G (po raz pierwszy pokazano możliwości tworzenia TH z motywem polipurynowym), który rozpoznawał naturalną sekwencję polipurynową w promotorze ludzkiego protoonkogenu *c-myc*. Dodanie tego ODN do roztworu, w którym zachodziła reakcja transkrypcji *in vitro* (z plazmidem zawierającym gen *c-myc* jako matrycą oraz ekstraktem jądrowym jako źródłem czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA II) spowodowało zahamowanie transkrypcji. Ostatnio wykazano, że zahamowanie inicjacji transkrypcji spowodowane jest prawdopodobnie zablokowaniem przez ODN wiązania czynnika transkrypcyjnego PuF z odpowiednią sekwencją w promotorze genu *c-myc* [20].

W innym eksperymencie [21] próbowano wyjaśnić możliwe mechanizmy zahamowania procesu inicjacji transkrypcji. Do promotora adenowirusa E4, zawierającego sekwencję regulatorową TATA, wprowadzono fragmenty homopurynowe (będące celem dla ODN)

zachodzące na miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1. Fragmenty wprowadzono w pozycji 5' w stosunku do TATA, w różnym oddaleniu od tej sekwencji, w różnej liczbie i w różnych orientacjach. Badano następnie poziom transkrypcji podstawowej i aktywowanej czynnikiem Sp1. Stopień zahamowania transkrypcji podstawowej zależał od oddalenia potrójnej helisy od sekwencji TATA oraz od liczby potrójnych helis utworzonych po stronie 5' od miejsca inicjacji translacji. Sp1 dodany po ODN nie przywracał transkrypcji podstawowej. Autorzy proponują kilka wytłumaczeń obserwowanych efektów ODN w stosunku do inicjacji transkrypcji (Ryc. 5).



Ryc. 5. Modele zahamowania transkrypcji przez ODN tworzące potrójną helisę; TH — potrójna helisa; * — sekwencja docelowa dla ODN; X — oznacza zahamowanie transkrypcji; n — nukleosom

I. Tworzenie potrójnej helisy może: 1. blokować wiązanie aktywatora i w konsekwencji uniemożliwiać aktywację kompleksu inicjującego transkrypcję; 2. blokować wiązanie czynników transkrypcyjnych decydujących o transkrypcji podstawowej; 3. uniemożliwiać wygięcie DNA (*per se* lub poprzez zablokowanie dostępu czynnika wyginającego DNA) i prawidłową interakcję aktywatora z kompleksem transkrypcyjnym;

II. W miejscu powstania potrójnej helisy może wiązać się czynnik lub czynniki hamujące transkrypcję (czynniki rozpoznające potrójną helisę);

III. Powstanie potrójnej helisy zaburza strukturę chromatyny co pociąga za sobą zmianę w poziomie transkrypcji.

Istotnym pytaniem jest, czy utworzenie potrójnej helisy w obrębie sekwencji przepisywanych przez polimerazę RNA spowoduje zablokowanie transkrypcji w tym miejscu i w efekcie powstanie RNA o niepełnej długości. Taka sytuacja (ingerencja w proces elongacji transkryptu) stwarzałaaby możliwość nie tylko blokowania transkrypcji określonego genu, ale również generowania transkryptów o dowolnie zaplanowanej długości. Wyniki dotychczasowych doświadczeń są niejednoznaczne.

W wyniku transkrypcji kierowanej z głównego promotora adenowirusowego powstaje RNA o długości 280 nukleotydów. ODN oddziałujący z odcinkiem homopurynowym (G box) DNA, znajdującym się o 180 par zasad w kierunku 3' od miejsca inicjacji transkrypcji, powodował powstanie RNA o długości 180 nukleotydów. Zastosowanie ODN sprzężonego ze związkami alkilującymi zablokowało w stabilny sposób proces elongacji [22]. W innym doświadczeniu, w którym użyto polimerazę RNA bakteriofaga T7 zahamowanie transkrypcji obserwowano tylko w przypadku gdy potrójna helisa była umiejscowiona w obrębie promotora, natomiast lokalizacja potrójnej helisy w kierunku 3' od miejsca startu transkrypcji nie powodowała zahamowania transkrypcji [23]. Być może jakieś znaczenie ma tu typ polimerazy RNA lub różnice w warunkach doświadczenia.

Podsumowując, utworzenie potrójnej helisy w miejscu wiązania czynników transkrypcyjnych (np. aktywatorów) powoduje zahamowanie inicjacji transkrypcji. Zahamowanie procesu elongacji wymaga potwierdzenia.

II-4. THF-ODN w regulacji transkrypcji *in vivo*

Zastosowanie oligodeoksyrybonukleotydów tworzących potrójną helisę (THF-ODN) *in vivo* przedstawia bez porównania więcej problemów. W jądrze komórkowym DNA docelowe dla ODN jest w formie chromatyny — kompleksu różnych białek i kwasów nukleinowych, o skomplikowanej strukturze przestrzennej. Może się zdarzyć, że sekwencja docelowa będzie niedostępna dla ODN np. z powodu zablokowania przez ściśle połączenie z histonami. Trudno przewidzieć jak warunki fizyczne, szczególnie skład jonowy i pH w jądrze komórkowym wpływać będą na stabilność potrójnej helisy. Istotne jest też to czy ODN będą reagowały specyficznie tj. wyłącznie z sekwencją docelową, nie zaburzając przy tym transkrypcji innych genów. Wreszcie, aby uzyskać zamierzony efekt potrzebna jest dokładna znajomość zarówno kinetyki transkrypcji określonego genu, jak i kinetyki tworzenia potrójnej helisy. Wiele z tych problemów jest nadal nierozwiązanych.

Pomimo tych zastrzeżeń podjęto próby sprawdzenia działania THF-ODN jako regulatorów transkrypcji *in vivo*. W jednym z doświadczeń [24] użyto ODN (28 nukleotydów) rozpoznające sekwencję -273 do -246 promotora ILR α (podjednostki α receptora dla interleukiny 2). Wiadomo, że po stymulacji fitohemaglutyniną (PHA) limfocytów krwi obwodowej następuje ekspresja szeregu genów między innymi genu dla IL2R α . Po dodaniu do pożywki hodowlanej ODN obserwowano 50% obniżenie transkrypcji tego genu w porównaniu z jego transkrypcją w limfocytach traktowanych ODN nie tworzącymi potrójnej helisy z sekwencją docelową. Transkrypcja innych genów aktywowanych po stymulacji PHA: *c-myc*, β -aktyny,

IL2R β (podjednostki β receptora dla interleukiny 2), IL-6 (interleukina 6) była niezaburzona.

W innym doświadczeniu [25] pokazano, że ODN wiążący odpowiednią sekwencję w promotorze P1 genu *c-myc* (ludzki *c-myc* posiada dwa niezależnie regulowane miejsca inicjacji transkrypcji P1 i P2) blokował transkrypcję z tego promotora, podczas gdy transkrypcja z promotora P2 pozostała niezmienną. Powstanie TH potwierdzono przy użyciu footprintingu z użyciem DNazy I. W obu eksperymentach wykazano istnienie niezdegradowanych ODN w ekstraktach z jąder traktowanych komórek po 4 godzinach.

Ostatnio z powodzeniem zastosowano także *in vivo* strategię, w której ODN były nośnikami reaktywnych związków [4]. Plazmidy zawierające gen reporterowy CAT (acetylotransferaza chloramfenikolu) z promotorem IL-2R α zawierającą regulatorową sekwencję homopurynową (sekwencja docelowa dla ODN), rozpoznawaną przez czynnik transkrypcyjny NF- κ B, wprowadzano do komórek linii HSB2 za pomocą transfekcji. Tak przygotowane komórki inkubowano z ODN połączonymi z psoralenem. Zahamowanie ekspresji CAT obserwowano jedynie po naświetleniu komórek UV, czyli po indukcji wiązania krzyżowego między ODN, psoralenem i DNA.

III. Dwuniciowe ODN (dsODN) wiążące czynniki transkrypcyjne jako związki regulujące transkrypcję

III-1 Dwuniciowe ODN w regulacji transkrypcji *in vitro*

Specyficzne wiązanie dwuniciowych ODN (dsODN) z białkami znalazło zastosowanie w badaniach ekspresji czynników transkrypcyjnych, ich izolowaniu, określania powinowactwa do sekwencji regulatorowych. Jedną z technik, w których zasada ta znalazła zastosowanie jest analiza ruchliwości elektroforetycznej w żelu (EMSA). Związanie znakowanej radioaktywnie sondy dsODN przez określony czynnik transkrypcyjny powoduje opóźnienie migracji sondy w czasie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Do izolowania czynników transkrypcyjnych służyć może chromatografia powinowactwa, w której to dsODN o sekwencji rozpoznawanej przez dany czynnik zostają unieruchomione na nośniku kolumny, przez którą przepuszcza się ekstrakt białek. Jedynie właściwy czynnik transkrypcyjny połączy się z dsODN i pozostanie w kolumnie.

Założenie strategii zastosowania dwuniciowych ODN do regulacji transkrypcji jest proste. Obecność w roztworze lub komórce nadmiaru ODN konkurencyjnie wiążących określony czynnik transkrypcyjny uniemożliwiłoby ich naturalne oddziaływanie z DNA i w ten sposób zaburzało proces transkrypcji.

W systemie *in vitro* badano efektywność transkrypcji

genu z promotorem adenowirusa E1b zawierającym jedno miejsce rozpoznawane przez czynnik Sp1 [26]. Delecja w sekwencji rozpoznawanej przez Sp1 powoduje obniżenie transkrypcji do 20% w porównaniu ze szczepem dzikim. Zahamowanie transkrypcji o podobnym stopniu osiągnięto stosując dsODN zawierające miejsce wiązania Sp1. Interesujące było to, że ODN z trzema miejscami wiązania Sp1 już przy stężeniu 7-krotnie niższym wywierał identyczny efekt jak ODN niosący jedno miejsce wiązania Sp1. Identyczny efekt na transkrypcję wywierało jednocześnie podanie ODN z sekwencją TATA (wiązącą czynnik transkrypcji podstawowej TFIID) i ODN o sekwencji rozpoznawanej przez Sp1 w porównaniu z ODN zawierającym obie te sekwencje. Stosując najbardziej efektywny dsODN uzyskano zahamowanie transkrypcji przy stosunku molarnym ODN do DNA 4 do 1.

III-2. Dwuniciowe ODN w regulacji transkrypcji *in vivo*

III-2a. Iniekcje dwuniciowych ODN do jąder komórkowych

Jedną z możliwości wprowadzenia dsODN do komórki jest iniekcja. Przykładem zastosowania takiej techniki jest doświadczenie przeprowadzone przez zespół E. K a n d e l a [27]. Badacze ci pragnęli określić szlak molekularny formowania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego między neuronami ruchowymi i czuciowymi (w hodowli komórkowej) ślimaka morskiego *Aplysia californica*, po stymulacji serotoniną. Zastosowanie dsODN z sekwencją CRE (cAMP responsive element) z genu somatostatyny, służyło sprawdzeniu czy długotrwałe wzmocnienie postsynaptyczne jest zależne od aktywacji transkrypcji genów przez CREBP — białko reagujące z sekwencją CRE. Wstrzyknięcie do jądra komórkowego neuronu czuciowego dsODN o długości 36 par zasad w objętości 10-30 pL (10 mln cząsteczek dsODN/jądro) powodowało brak wzrostu pobudzającego potencjału postsynaptycznego po stymulacji serotoniną, co potwierdziło ważność sekwencji CRE dla tego zjawiska. Kontrolne dsODN z mutacjami punktowymi w obrębie sekwencji wiążących CREBP, oraz inne dsODN zawierające np. HSE (ang. *heat shock element*, sekwencja wiążąca czynnik szoku termicznego HSF) i κ B (sekwencja wiążąca czynnik NF- κ B) nie wywierały takiego efektu.

III-2b. Dwuniciowe ODN w hodowli komórkowej

Szacuje się, że przy stężeniu 10 μ M w pożywece hodowlanej do pojedynczej komórki wnuknie 10⁷-10⁸ cząsteczek dsS-ODN co stanowi duży nadmiar ok. 1000-krotny nad określonym czynnikiem transkrypcyjnym (zwykle 10³-10⁴ cząsteczek białka w jądrze komórkowym) [28].

Pierwszy dowód doświadczalny na to, że dsODN są w stanie specyficznym modyfikować ekspresję genów po podaniu do hodowli komórkowej pochodzący z pracy A. Bielińskiej i wsp. [28]. Badacze ci wprowadzili do limfocytów B reporterowe plazmidy (z sekwencją oct jako sekwencją wzmacniającą i genem reporterowym CAT). Następnie dodano do pożywki hodowlanej dsS-ODN o sekwencji oct i uzyskano zahamowanie ekspresji genu reporterowego o 90%. ODN z mutacją punktową w sekwencji oct nie powodowały zmiany w ekspresji CAT. Aby ocenić wpływ ODN na ekspresję genu endogennego inkubowano komórki linii Jurkat z dsS-ODN o sekwencji oct. Sekwencja oct jest jedną z kilku sekwencji wzmacniających genu Il-2, który ulega ekspresji w tych komórkach po stymulacji estrami forbolu (PMA) lub fitohemaglutyniną (PHA). Uzyskano zahamowanie ekspresji Il-2 o 30%. Zahamowanie ekspresji o podobnym stopniu obserwuje się w przypadku gdy naturalna sekwencja oct zostaje zmieniona przez mutację w pozycji od -75 do -70. Uzyskanie tylko częściowego zahamowania ekspresji Il-2 związane jest, jak przewidywano, z istnieniem kilku sekwencji wzmacniających.

Sumując, dsODN wiążą specyficznymi czynnikami transkrypcyjnymi; wnikają do komórek w hodowli; istnieją przez kilka godzin w formie niezdegradowanej; konkurując o wiązanie czynnika transkrypcyjnego zmieniają ekspresję genów.

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować Panu Docentowi Leszku Kaczmarkowi, kierownikowi Pracowni Hodowli Komórek i Tkanek Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, za konsultacje podczas przygotowywania artykułu oraz współpracownikom z laboratorium za cenne uwagi.

Artykuł otrzymano 10 września 1993 r.

Zaakceptowano do druku 28 września 1993 r.

Piśmiennictwo

- Mitchell PJ, Tjian R (1989) *Science* **245**: 371-378
- Latchman D (1990) *Biochem J* **270**: 281-289

- Martin KJ (1991) *BioEssays* **13**: 499-503
- Grigoriev M, Praseuth D, Guicysse A, Robin P, Thuong NT, Helene C, Harel-Bellan A (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3501-3505
- Sun JS, Francois JC, Montenay-Garesiter T, Saison-Behmoaras T, Roig V, Thuong NT, Helene C (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9198-9204
- Le Doan T, Perrouault L, Praseuth D, Habhouh N, Decout JL, Thuong NT, Lhomme J, Helene C (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 7749-7760
- Moser HE, Dervan PB (1987) *Science* **238**: 645-650
- Krawczyk SH, Milligan JF, Wadwani S, Moulds C, Froehler BC, Matteucci MD (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3761-3764
- Griffin LC, Dervan PB (1989) *Science* **245**: 967-971
- Beal PA, Dervan PB (1991) *Science* **251**: 1360-1363
- Cooney M, Czernuszewicz G, Postel EH, Flint SJ, Hogan ME (1988) *Science* **241**: 456-459
- Jayasena SD, Johnston BH (1992) *Nucleic Acids Research* **20**: 5279-5288
- Ono A, Chen C-N, Kan L (1991) *Biochemistry* **30**: 9914-9921
- Thein SL, Wallace RB (1986) W: Human Genetic Diseases: A Practical Approach (red) Davies KE, str. 33, IRL Press, Oxford
- Mergny J-L, Sun J-S, Rougee M, Montenay-Garestier T, Barcelo F, Chomilier J, Helene C (1991) *Biochemistry* **30**: 9791-9798
- Strobel SA, Dervan PB (1991) *Nature (Lond)* **350**: 172-174
- Maher LJ III, Wold B, Dervan PB (1989) *Science* **245**: 725-730
- Francois J-C, Saison-Behmoaras T, Helene C (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 11431-11440
- Huang C-C, Nguyen D, Martinez R, Edwards CA (1992) *Biochemistry* **31**: 993-998
- Postel EH, Berberich SJ, Flint SJ, Ferrone CA (1993) *Science* **261**: 478-483
- Maher III LJ, Dervan PB, Wold B (1992) *Biochemistry* **31**: 70-81
- Young SL, Krawczyk S, Matteucci MD, Toole JJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10023-10026
- Maher III LJ (1992) *Biochemistry* **31**: 7587-7594
- Orson FM, Thomas DW, McShan WM, Kessler DJ, Hogan ME (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 3435-3441
- Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ, Hogan ME (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8227-8231
- Wu H, Holcenberg JS, Tomich J, Chen J, Jones-PA, Huang SH, Calame KL (1990) *Gene* **89**: 203-209
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER (1990) *Nature (Lond)* **345**: 718-721
- Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang L, Nabel GJ (1990) *Science* **250**: 997-1000

Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

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

Zachęcamy także do zaprenumerowania „Postępów Biochemii”

Mutacje dynamiczne. Funkcja niestabilnych sekwencji DNA w niektórych chorobach genetycznych człowieka

Dynamic mutations. The role of unstable DNA sequences in human genetic disease

MICHAŁ MILEWSKI¹,
JERZY BAL²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Niestabilne sekwencje DNA
 - II-1. Zespół łamliwego chromosomu X
 - II-2. Dystrofia miotoniczna
 - II-3. Rdzeniowy zanik mięśni typu Kennedy'ego
 - II-4. Płasawica Huntingtona
- III. Mutacje dynamiczne a antycypacja
- IV. Niestabilne sekwencje a patogenezę
- V. Mechanizm powstawania mutacji dynamicznych
- VI. Diagnostyka molekularna chorób, wywołanych przez mutacje dynamiczne
- VII. Społeczne i prawne konsekwencje odkrycia mutacji dynamicznych

Wykaz stosowanych skrótów: *FMR-1* — gen, którego defekt jest przyczyną zespołu łamliwego chromosomu X; *DM-1* — gen, którego mutacje wywołują dystrofię miotoniczną; *AR* — gen receptora androgenów; *IT15* — gen, którego uszkodzenie jest odpowiedzialne za płasawicę Huntingtona; PCR — łańcuchowa reakcja syntezy DNA; fra-X — łamliwy chromosom X.

I. Wstęp

Mutacje, czyli zmiany w sekwencji DNA prowadzące do zaburzenia funkcjonowania genów, mają, według klasycznych założeń genetyki, stabilny charakter. Oznacza to, że pojawienie się mutacji w pewnej sekwencji DNA nie zwiększa, ani nie zmniejsza prawdopodobieństwa pojawienia się kolejnych mutacji. Charakter większości odkrytych dotychczas mutacji w genomie człowieka jest zgodny z tym schematem. Jednakże niedawne zidentyfikowanie przyczyn czterech genetycznie uwarunkowanych chorób — a mianowicie zespołu łamliwego chromosomu X [1-4], dystrofii miotonicznej [5-9], rdzeniowego zaniku mięśni typu Kennedy'ego [10] i płasawicy Huntingtona [11] — zmusiło genetyków molekularnych do opisanie nowej klasy mutacji o szczególnych właściwo-

Contents:

- I. Introduction
- II. Unstable DNA sequences
 - II-1. Fragile X syndrome
 - II-2. Myotonic dystrophy
 - II-3. Spinal and bulbar muscular atrophy
 - II-4. Huntington's chorea
- III. Dynamic mutations and anticipation
- IV. Unstable sequences and pathogenesis
- V. Mechanism of dynamic mutations
- VI. Molecular diagnostics of diseases caused by dynamic mutations
- VII. Social and legal consequences of discovery of dynamic mutations

ciach. Za występowanie wyżej wymienionych chorób odpowiedzialne są bowiem tzw. niestabilne sekwencje DNA [12-14], które w wyniku mutacji ulegają wydłużeniu lub rzadziej skróceniu, przy czym prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji zależy od długości niestabilnej sekwencji. Tego typu mutacje określono mianem mutacji dynamicznych [15].

II. Niestabilne sekwencje DNA

Niestabilne sekwencje DNA, będące przyczyną mutacji dynamicznych, należą do grupy tzw. sekwencji powtórzonych. Składają się z wielu powtórzeń krótkiej sekwencji trójnukleotydowej. Liczba powtórzeń u osób zdrowych utrzymuje się w określonych granicach, natomiast u osób chorych znacznie przekracza normalny poziom.

Sekwencje powtórzone, odznaczające się zwiększoną niestabilnością, znane są od dość dawna [16]. Na ogół zbudowane są z licznych kopii sekwencji dwu-, trój- lub czteronukleotydowych, a ich rozmieszczenie w genomie ludzkim jest w miarę regularne. Dowodem ich małej stabilności jest fakt, że większość z nich charakteryzuje się dużym polimorfizmem. Oznacza to, że dana sekwencja powtórzona istnieje w wielu formach, różniących się między sobą długością (czyli ilością powtórzeń podstawowej jednostki). Przyczyną tak znacznego polimorfizmu jest zapewne łatwość,

¹ mgr, ² dr, Zakład Genetyki, Instytut Matki i Dziecka 01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17a

z jaką tego typu sekwencje ulegają mutacji, polegającej na zmianie liczby jednostek składowych. Ponieważ są to na ogół sekwencje niekodujące, warianty polimorficzne nie są eliminowane drogą doboru i utrzymują się w populacji.

Niestabilność sekwencji powtórzonych, odpowiedzialnych za zespół łamliwego chromosomu X i dystrofię miotoniczną przekracza dotychczas poznane przykłady, a ponadto ma wyraźne konsekwencje fenotypowe. Oryginalnemu charakterowi tych mutacji towarzyszą też wyjątkowe cechy wywoływanych przez nie chorób.

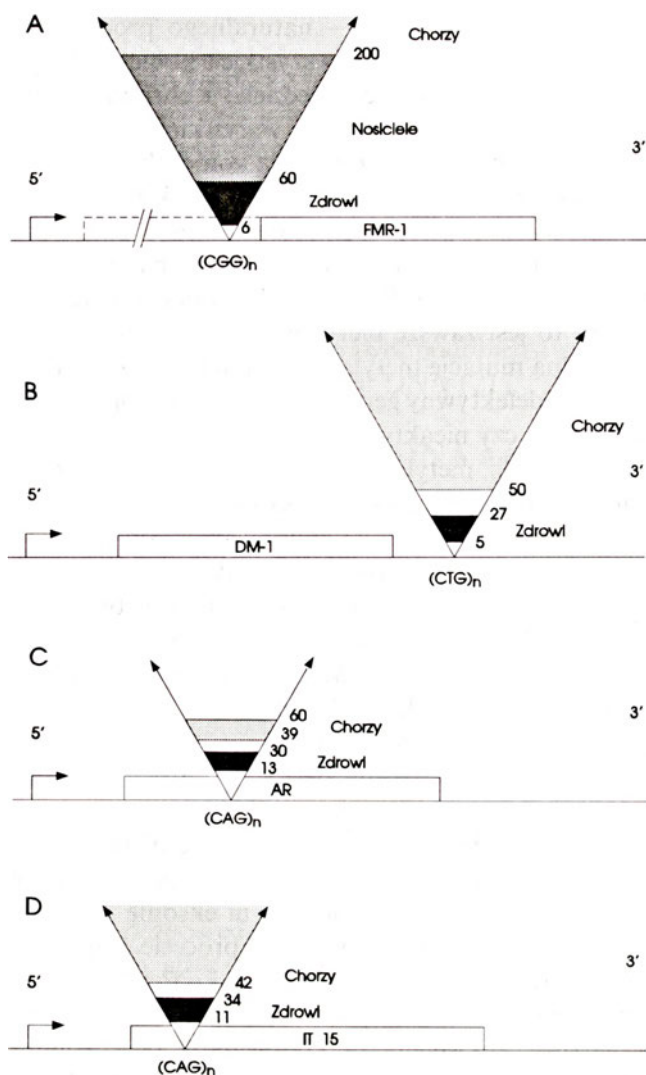
II-1. Zespół łamliwego chromosomu X

Jest to najczęstsza po zespole Downa uwarunkowana genetycznie forma upośledzenia umysłowego [17]. Cechą wyróżniającą zespół łamliwego chromosomu X (zespół fra-X, ang. *fragile X syndrome*) spośród innych chorób sprzężonych z chromosomem X jest fakt, że ok. 20% mężczyzn posiadających defektywny gen odpowiedzialny za tę chorobę nie wykazuje żadnych objawów upośledzenia, gdy tymczasem 30% kobiet nosicielek choroby, jest opóźniona w rozwoju umysłowym [18, 19]. Inną charakterystyczną cechą zespołu jest to, że córki bezobjawowego nosiciela, dziedziczące po ojcu chromosom X z defektywnym genem, nigdy nie wykazują cech choroby, natomiast upośledzenie umysłowe dotyka ich synów i czasami córki, czyli wnuków i wnuczki bezobjawowego nosiciela.

Do momentu odkrycia genu związanego z tą chorobą diagnoza zespołu oparta była na obrazie klinicznym i cytogenetycznej analizie ekspresji łamliwego miejsca w Xq27.3 (FRAXA) [20]. Łamliwe miejsca są dość częstymi markerami chromosomowymi, które uwiadcniają się w specyficznych warunkach hodowli komórek, jako charakterystyczne przewężenie w określonym miejscu chromosomu. Łamliwego chromosomu X, od którego wywodzi się nazwa zespołu, nie stwierdza się jednak u mężczyzn — bezobjawowych nosicieli i u ok. 50% kobiet, oblatoryjnych nosicielek choroby.

W 1991 r. zidentyfikowano gen *FMR-1* (*fragile X mental retardation-1*), odpowiedzialny za zespół fra-X [3]. Okazało się, że w pierwszym eksonie tego genu znajduje się sekwencja złożona z następujących kolejno po sobie powtórzeń tripletu CGG. Liczba tych powtórzeń u osób zdrowych wynosi od 6 do 60 (Ryc. 1). U osób dotkniętych zespołem fra-X, liczba powtórzeń przekracza 200 i może dochodzić nawet do 1000 (tzw. pełna mutacja). Natomiast u bezobjawowych nosicieli i większości nosicielek nie wykazujących objawów choroby, liczba kopii CGG wynosi od 60 do 200 tzw. premutacja).

W trakcie przekazywania defektywnego genu z pokolenia na pokolenie, liczba powtórzeń prawie zawsze wzrasta [21]. Tylko w nielicznych przypadkach, podczas transmisji genu od jednego z rodziców do dziecka, następuje zmniejszenie się liczby powtórzeń. Prze-



Ryc. 1. Mutacje dynamiczne, lokalizacja i poziom amplifikacji niestabilnych sekwencji w: A — zespole łamliwego chromosomu X; B — dystrofii miotonicznej; C — rdzeniowym zaniku mięśni typu Kennedy'ego; D — płasawicy Huntingтона. Liczbę powtórzeń trójnukleotydu podano przy osiach wychodzących z miejsc, odpowiadających położeniu niestabilnych sekwencji. (wg. [15], zmodyfikowane)

kształcenie premutacji w pełną mutację ma miejsce wyłącznie podczas przekazywania dziecku genu przez matkę, przy czym prawdopodobieństwo powstania pełnej mutacji jest proporcjonalne do liczby powtórzeń CGG w premutacji matki. Gdy potomstwu przekazywana jest premutacja ojca, liczba tripletów CGG nie ulega zmianie lub zwiększa się tylko nieznacznie.

Przyczyną powstawania łamliwego miejsca X(q27.3) jest prawdopodobnie niestabilna sekwencja w genie *FMR-1*. W wyniku pełnej mutacji powstaje bardzo długi odcinek DNA, zbudowany wyłącznie z G i C, co może mieć wpływ na opóźnienie procesu replikacji i powstawanie charakterystycznej struktury, obserwowanej pod mikroskopem jako przewężenie w długim ramieniu chromosomu X.

Efektom towarzyszącym amplifikacji tripletu CGG w genie *FMR-1* jest metylacja miejsca bogatego w sekwencji CpG (tzw. wyspy CpG), położonego po stronie 5' pierwszego eksonu *FMR-1* [22-25]. Obszar ten jest jednym z wielu miejsc metylowanych podczas inak-

tywacji chromosomu X — naturalnego procesu zachodzącego w komórkach wszystkich kobiet, którego efektem jest unieczynnienie jednego z chromosomów X i doprowadzenie ekspresji wszystkich genów do poziomu charakterystycznego dla komórek mężczyzn. U zdrowych mężczyzn wyspa CpG obok pierwszego eksonu *FMR-1* nie jest metylowana, a u zdrowych kobiet metylacji ulega tylko wyspa CpG na nieaktywnym chromosomie X. W przypadku chorych mężczyzn miejsce to jest zawsze metylowane, a u kobiet niosących pełną mutację metylacja ma miejsce bez względu na to, czy defektywny gen znajduje się na chromosomie aktywnym, czy nieaktywnym. Ponadto, w przypadku pełnej mutacji, metylowane są poszczególne cytozyny w niestabilnych tripletach CGG [25].

Niestabilność sekwencji zbudowanej z dużej liczby kopii CGG nie ogranicza się tylko do momentu przekazywania defektywnego genu potomstwu. Komórki somatyczne tej samej osoby z pełną mutacją posiadają często geny *FMR-1* o różnym poziomie amplifikacji niestabilnej sekwencji. Czasem obok pełnych mutacji pojawiają się nawet premutacje. Ta mozaikowość somatyczna świadczy o dużej niestabilności mitotycznej pełnej mutacji [21].

Dotychczas nie udało się wyizolować białka kodowanego przez gen *FMR-1*. Nie ma też pewności, czy niestabilna sekwencja w pierwszym eksonie genu zawiera informację odczytywaną w procesie translacji, czy też triplety CGG poprzedzają kodon inicjujący syntezę białka. Gdyby pierwsza z tych hipotez była prawdziwa, sekwencja ta kodowałaby ciąg arginin w N-końcowej części łańcucha aminokwasów [3].

II-2. Dystrofia miotoniczna

W 1991 r. po odkryciu mutacji odpowiedzialnej za zespół fra-X, zasugerowano, że podobny typ mutacji może być związany z inną chorobą uwarunkowaną genetycznie — dystrofią miotoniczną (ang. *myotonic dystrophy*). Ta dziedziczona w sposób autosomalny dominujący choroba powoduje postępujące osłabienie i zanik mięśni, a jej charakterystyczną cechą jest znaczne zróżnicowanie objawów, nawet wśród członków tej samej rodziny [26]. Zastanawiający jest fakt, że najostrejsza, wrodzona forma tej choroby jest zawsze dziedziczona od matki pacjenta, u której schorzenie ma łagodniejszy przebieg [27]. Zazwyczaj, w następujących po sobie pokoleniach zaostrza się przebieg choroby i obniża wiek wystąpienia pierwszych objawów. Zjawisko to, zwane antycypacją [28-29], do momentu odkrycia molekularnego podłoża choroby, uważane było za efekt subiektywnego doboru danych klinicznych.

Na początku 1992 roku, w kilku pracowniach jednocześnie, udało się sklonować gen związany z tą chorobą i wyjaśnić naturę wywołujących ją mutacji [5-9, 30]. Odkryty gen, nazwany DM-1, ale znany też pod nazwą *Mt-PK* (ang. *myotonin-protein kinase gene*),

koduje białko z grupy kinaz białkowych i jest zlokalizowany na chromosomie 19. W części 3' genu, w regionie ulegającym transkrypcji, lecz nie kodującym białka, znajduje się sekwencja złożona z wielu powtórzeń tripletu CTG. Podobnie, jak w przypadku zespołu łamliwego chromosomu X, liczba tych powtórzeń u osób zdrowych waha się w określonych granicach (5-27), podczas gdy u chorych przewyższa 50 i może nawet osiągnąć kilka tysięcy (Ryc. 1). Liczba powtórzeń CTG u osób dotkniętych dystrofią miotoniczną jest dość ściśle skorelowana z ostrością występujących objawów choroby [31, 32]. W trakcie przekazywania genu potomstwu, liczba tripletów prawie zawsze wzrasta.

II-3. Rdzeniowy zanik mięśni typu Kennedy'ego

W odniesieniu do przyczyny rdzeniowego zaniku mięśni typu Kennedy'ego (rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni, choroba Kennedy'ego, ang. *spinal and bulbar muscular atrophy, Kennedy's disease*) nie mówi się wprawdzie o mutacji dynamicznej, należy jednak wspomnieć, że podobnie jak w dwóch poprzednich uwarunkowanych genetycznie chorobach, mutacja polega tu również na zwiększeniu liczby powtórzeń sekwencji trójnukleotydowej. Ta recesywna, sprzężona z płcią choroba występuje tylko u mężczyzn, a jej główne objawy to osłabienie i zanik mięśni, ginekomastia oraz obniżona płodność [33].

Przyczyną choroby jest mutacja w genie receptora androgeny *AR* [10]. Amplifikacji ulega tu triplet CAG, a więc taka sama sekwencja powtórzona, jak w przypadku dystrofii miotonicznej, tyle że w tym wypadku odczytywana jest ona podczas transkrypcji z przeciwległej nici DNA. Jest to sekwencja kodująca i odpowiada ciągowi glutamin w N-końcowej części receptora androgeny.

W przeciwieństwie do wcześniej omawianych przypadków, nie mamy tu do czynienia z tak wyraźną tendencją do wzrostu liczby powtórzeń w kolejnych pokoleniach [34, 35]. Największy zaobserwowany wzrost liczby kopii CAG sięgał zaledwie kilku powtórzeń. Geny *AR* osób zdrowych mają od 13 do 30, a geny zmutowane od 39 do 60 powtórzeń CAG (Ryc. 1). Choć zaobserwowano pewną korelację między liczbą powtórzeń a nasileniem objawów chorobowych, to wydaje się, że zmienność fenotypowa w tej chorobie jest w znacznej mierze wynikiem działania innych, nieznanych jeszcze, czynników [35].

II-4. Płásawica Huntingtona

Niedawne odkrycie genu, którego defekt wywołuje płásawicę Huntingtona (ang. *Huntington's chorea, Huntington's disease*) było ukoronowaniem wieloletnich, żmudnych badań, prowadzonych w tym kierunku przez kilka, ściśle współpracujących ze sobą zespołów naukowców. Tak wielki wysiłek, włożony w te

badania, wynikał z dużego społecznego znaczenia tej nieuleczalnej i wyjątkowo uciążliwej dla chorego i jego otoczenia choroby.

Płásawica Huntingtona dziedziczona jest w sposób autosomalny dominujący a jej główne objawy to zaburzenia psychiczne, postępujące otępienie oraz występowanie mimowolnych ruchów płásawicznych [36]. Pierwsze oznaki choroby pojawiają się zazwyczaj w czwartej lub piątej dekadzie życia, a śmierć następuje po 10-20 latach. Młodocianej postaci płásawicy Huntingtona, związanej na ogół z dziedziczeniem ojcowskim, towarzyszą ostrzejsze objawy i szybszy przebieg choroby. Podobnie, jak w przypadku dystrofii miotonicznej, również w płásawicy Huntingtona obserwuje się zjawisko antycypacji, przejawiające się we wcześniejszym występowaniu objawów w kolejnych pokoleniach.

Dopiero po dziesięciu latach od wykazania sprzężenia defektu genetycznego, wywołującego płásawicę Huntingtona z chromosomem 4 udało się sklonować gen *IT15*, którego uszkodzenie jest przyczyną choroby [11]. Okazało się, że mutacje w tym genie mają charakter podobny do trzech opisanych powyżej mutacji dynamicznych. Tak jak w przypadku choroby Kennedy'ego, niestabilną sekwencją jest tutaj ciąg powtórzeń CAG, zlokalizowany w części 5' genu. Jest to sekwencja kodująca i odpowiada prawdopodobnie ciągowi glutamin w produkcie białkowym genu *IT15*, nazwanym huntingtyną (ang. *huntingtin*).

Ponieważ liczba chorych i zdrowych osób, przebadanych dotychczas pod kątem mutacji w genie *IT15*, nie jest zbyt duża, brak jest precyzyjnych danych dotyczących poziomu amplifikacji niestabilnej sekwencji w tym genie. Otrzymane dotychczas wyniki sugerują jednak, że mamy tu do czynienia z sytuacją podobną jak w chorobie Kennedy'ego, gdyż u osób zdrowych wykazano obecność od 11 do 34 kopii CAG, a u osób chorych od 42 do ok. 100 kopii (Ryc. 1). Wykazano przy tym, że im większa jest liczba powtórzeń CAG u chorego, tym wcześniej pojawiają się u niego pierwsze objawy choroby.

III. Mutacje dynamiczne a antycypacja

Główną cechą mutacji dynamicznych jest ich niestabilność, dlatego wydaje się oczywiste, że choroby będące ich wynikiem odznaczać się mogą zmiennością objawów. Ponieważ zaś niestabilne sekwencje DNA mają tendencję do wydłużania się, ich efekt patogenny może być w ten sposób wzmacniany z pokolenia na pokolenie. Proces antycypacji, obserwowany przy przekazywaniu dystrofii miotonicznej i płásawicy Huntingtona, znalazł tu więc swoje wytłumaczenie [37-40].

Odpowiednikiem antycypacji w przypadku zespołu łamliwego chromosomu X jest tzw. paradoks Sherman, mówiący, że prawdopodobieństwo wystąpienia choroby wśród rodzeństwa bezobjawowego nosiciela

jest znacznie mniejsze, niż wśród jego wnuków i prawnuków [18, 19]. Stwierdzenie to, w sposób pośredni, odnosi się do teorii, która zakłada, że stopień penetracji zmutowanego genu, a co za tym idzie, ryzyko wystąpienia upośledzenia umysłowego wzrasta w kolejnych generacjach w rodzinie, w której przekazywana jest choroba. Podobnie, jak w przypadku dystrofii miotonicznej i płásawicy Huntingtona, także i tu odkrycie mutacji dynamicznej pozwoliło na wyjaśnienie tej zagadki, tłumacząc wzrost ryzyka zachorowania zwiększeniem się prawdopodobieństwa amplifikacji niestabilnej sekwencji DNA [21].

IV. Niestabilne sekwencje DNA a patogenez

Patofizjologia chorób wywoływanych przez niestabilne sekwencje nie została dotychczas wyjaśniona. Wydaje się, że decydujący wpływ na wystąpienie objawów dystrofii miotonicznej i zespołu fra-X ma zahamowanie transkrypcji z uszkodzonego genu. Na przykład u dorosłych osób chorych na dystrofię miotoniczną stwierdzono obniżony poziom zarówno transkrypty genu *DM-1*, jak i kodowanego przezeń białka [41], natomiast w komórkach mężczyzn z pełną mutacją w genie *FMR-1* nie wykryto w ogóle transkrypty tego genu [42]. Przypuszcza się jednak, że w przypadku zespołu fra-X amplifikacja niestabilnej sekwencji nie jest bezpośrednią przyczyną zablokowania ekspresji genu, gdyż do zahamowania transkrypcji konieczna jest jeszcze metylacja pobliskiej wyspy CpG [43]. Amplifikacja tripletów nukleotydów może prawdopodobnie wpływać na poziom ekspresji genu niezależnie od pozycji mutacji w jego obrębie, gdyż w poznanych przypadkach, niestabilne sekwencje powtórzone umieszczone są zarówno na końcu 5', jak i 3' genu.

O ile nie dziwi wpływ zahamowania ekspresji genu na wyrażanie się choroby u mężczyzn z zespołem fra-X, to wydaje się zastanawiające, dlaczego mutacje te mają charakter dominujący i dlaczego zarówno w przypadku kobiet nosicielek zmutowanego genu *FMR-1*, jak i u osób chorych na dystrofię miotoniczną, defekt w jednym tylko genie decyduje o wystąpieniu objawów choroby. Możliwe, że jest to prosty efekt obniżenia poziomu białkowego produktu genu. Bardziej prawdopodobną wydaje się jednak sytuacja, gdy udział genu w szeregu procesów regulacyjnych jest przyczyną zwiększonej wrażliwości tego układu na obniżenie poziomu jednego z czynników, którym w tym przypadku zdaje się być transkrypt zmutowanego genu.

Inna jest prawdopodobnie przyczyna dominującego efektu mutacji dynamicznej, wywołującej płásawicę Huntingtona. Wiadomo, że brak jednej kopii genu *IT15* nie powoduje wystąpienia choroby. Osoby cierpiące na zespół Wolfa i Hirschhorna, który jest skutkiem delecji fragmentu chromosomu 4 obejmującego między innymi gen *IT15*, nie wykazują objawów płásawicy Huntingtona. Możliwe więc, że dodatkowe właściwości białka będącego produktem zmutowane-

go genu są przyczyną zaburzeń w funkcjonowaniu komórki, co z kolei prowadzi do wystąpienia choroby. Jeśli huntingtyna funkcjonuje jako multimer to możliwe jest inne wyjaśnienie patogennego charakteru mutacji. W wyniku mutacji w jednym z genów większość formujących się multimerów byłaby w takim wypadku nieaktywna (wystarczy, że jeden z polipeptydów kodowany byłby przez zmutowany gen) [44].

W przypadku genów *FMR-1*, *DM-1* i *IT15* nie ma pewności, czy są to jedyne geny odpowiedzialne za wystąpienie omawianych chorób. Możliwe, że defekty w tych genach mają również wpływ na funkcjonowanie genów sąsiednich, co tłumaczyłoby różnorodność objawów klinicznych, towarzyszących chociażby zespołowi fra-X, czy dystrofii miotonicznej.

Wyjaśnienia wymaga również kwestia udziału innych mutacji, poza niestabilnymi sekwencjami, w wywoływaniu opisywanych tu schorzeń. Dla zespołu fra-X opisano na przykład kilka przypadków osób z objawami typowymi dla tej choroby, u których jednak nie stwierdzono obecności łamliwego chromosomu X i nie wykryto charakterystycznej amplifikacji tripletu CGG. U jednej z takich osób wykryto mutację punktową w genie *FMR-1*, powodującą zmianę jednego aminokwasu w łańcuchu białkowym [45], a u dwóch innych znaleziono delecje, obejmujące cały gen *FMR-1* [46] lub jego część z końca 5' [47]. Zastanawiające jest to, że w przypadku wymienionej powyżej mutacji punktowej, objawy kliniczne są nieco ostrzejsze, niż w klasycznych przypadkach choroby. Znane są także przykłady chorych z dystrofią miotoniczną [8] lub płasawicą Huntingtona [10], u których nie stwierdzono amplifikacji odpowiedniej niestabilnej sekwencji, przy czym w tej drugiej chorobie mamy prawdopodobnie do czynienia z defektem w zupełnie innym genie, zlokalizowanym na innym chromosomie, niż gen *IT15*.

Gen *AR*, odpowiedzialny za rdzeniowy zanik mięśni typu Kennedy'ego wyróżnia się na tle omawianych powyżej genów, gdyż znanych jest tu wiele innych mutacji, poza amplifikacją tripletu CAG, które są przyczyną szeregu chorób, związanych z zaburzeniem wrażliwości na androgen [48-50]. Można przypuszczać, że niestabilne sekwencje DNA wpływają na funkcjonowanie genu *AR* inaczej, niż pozostałe mutacje, wywołując w związku z tym inne objawy. Ponieważ rola receptora androgenu w funkcjonowaniu organizmu jest bardzo istotna, niektórzy badacze wysuwają tezę, że amplifikacja tripletu CAG w takiej skali, jak to ma miejsce w zespole fra-X i dystrofii miotonicznej, mogłaby być mutacją letalną. Możliwość wywoływania przez taką wzmoczoną amplifikację objawów, związanych z zupełnie inną chorobą jest jeszcze jedną próbą wytłumaczenia nietypowości mutacji, odpowiedzialnej za chorobę Kennedy'ego.

Jedną z najbardziej fascynujących zagadek, związanych z niestabilnymi sekwencjami DNA, jest różnica w poziomie amplifikacji sekwencji powtórzonych

w trakcie przekazywania dziecku genu przez matkę bądź przez ojca. Wzmoczona niestabilność sekwencji powtórzonych, podczas przekazywania dziecku genu przez matkę, ma być może swoje źródło w różnicy między przebiegiem mejozy podczas oogenezy i spermatogenezy. Decydujące znaczenie może mieć tu chociażby różnica w poziomie puli dostępnych nukleotydów, bądź też któregoś z czynników replikacyjnych. Wiadomo, że częstość rekombinacji mejotycznej w niektórych regionach chromosomów jest również zależna od płci [51, 52]. Niedawno odkryto ponadto sekwencję powtórzoną, dla której poziom mutacji podczas spermatogenezy jest znacznie wyższy, niż podczas oogenezy [53].

Do ciekawszych hipotez dotyczących zespołu fra-X i próbujących wyjaśnić zjawisko przekształcania premutacji w pełną mutację podczas oogenezy, należy teoria naznaczenia (ang. *imprinting*), wysunięta w 1987 r. przez L a i r d a [54]. Koncepcja ta opiera się na założeniu, że inaktywacja chromosomu X, niosącego premutację, powoduje trwałe naznaczenie genu, które jest warunkiem koniecznym dla zajścia procesu przekształcania premutacji w pełną mutację. Teoria naznaczenia L a i r d a związana jest z szerszym zjawiskiem, określanym mianem naznaczenia genomowego (ang. *genomic imprinting*), w wyniku którego obserwuje się różnicę w ekspresji genów, w zależności od tego, czy leżą one na chromosomie pochodzenia matczynego, czy ojcowskiego. Być może, z naznaczeniem genomowym mamy do czynienia również w przypadku dystrofii miotonicznej, gdzie najostrejsza postać choroby jest związana wyłącznie z matczynym pochodzeniem mutacji, a także w płasawicy Huntingtona, gdzie młodociana forma choroby jest na ogół dziedziczona od ojca.

Większość teorii wyjaśniających zjawisko naznaczenia genomowego przypisuje bardzo duże znaczenie procesowi metylacji. Związek pomiędzy amplifikacją niestabilnych tripletów CGG w genie *FMR-1* a metylacją pobliskich sekwencji nasuwa pytanie o uniwersalność tej zależności. Ponieważ jednak dotychczasowe próby znalezienia dodatkowo zmetylowanej sekwencji na chromosomie 19, niosącym mutację odpowiedzialną za dystrofię miotoniczną, nie przyniosły efektu [55], należy uznać, że metylacja nie musi być nieodłącznym składnikiem mutacji dynamicznej.

V. Mechanizm powstawania mutacji dynamicznych

Na temat samego mechanizmu amplifikacji niestabilnych sekwencji wiadomo niewiele. Wykluczono dotychczas udział rekombinacji w tym procesie. Ponieważ podejrzewa się, że za wydłużanie się dwunukleotydowych sekwencji powtórzonych AC odpowiedzialne jest tak zwane ślizganie się polimerazy (ang. *polymerase slippage*) [16, 56], nie wykluczone, że niestabilne sekwencje, odpowiedzialne za powstawanie

mutacji dynamicznych, mogą ulegać amplifikacji w podobny sposób [21]. Jeśliby jednak przyjąć hipotezę, zakładającą, że możliwy jest drastyczny przyrost liczby powtórzeń podczas pojedynczej mejozy, należałoby wziąć pod uwagę inne prawdopodobne mechanizmy amplifikacji, jak chociażby wielokrotną wymianę chromatyd siostrzanych [1, 21]. Przy konstruowaniu hipotetycznego modelu amplifikacji należy uwzględnić także to, że powinien on wyjaśniać mitotyczną niestabilność opisywanych sekwencji.

Mechanizm wydłużania i skracania sekwencji powtórzonych jest prawdopodobnie taki sam w przypadku wszystkich sekwencji niestabilnych. Wart uwagi jest fakt, że dotychczas poznane mutacje dynamiczne to wyłącznie sekwencje złożone z tripletów, mimo że wśród pozostałych sekwencji powtórzonych bardzo częste są powtórzenia dwu-, cztero-, a nawet pięcinueklotydowe. Wynika to być może z faktu, że o ile każda zmiana liczby powtórzeń trójnukleotydowych zachowuje w sekwencji kodującej poprzednią ramkę odczytu, to w przypadku powtórzeń sekwencji nukleotydów, nie będącej wielokrotnością trzech, mutacja taka grozi zmianą ramki odczytu i w konsekwencji całkowitym uszkodzeniem funkcji genu.

Obecnie trwają poszukiwania trójnukleotydowych sekwencji powtórzonych w innych genach człowieka [57]. Mimo istnienia 60 możliwych tripletów, zbudowanych przy użyciu czterech typów nukleotydów (wykluczyć należy z tych rozważań triplety zbudowane z jednego typu nukleotydów, których powtórzenia trudno zakwalifikować jako trójnukleotydowe), mamy do czynienia jedynie z dziesięcioma typami trójnukleotydowych sekwencji powtórzonych, z których każdy można opisać na sześć sposobów, wykorzystując różne ramki odczytu i podając sekwencję nukleotydów na różnych niciach.¹

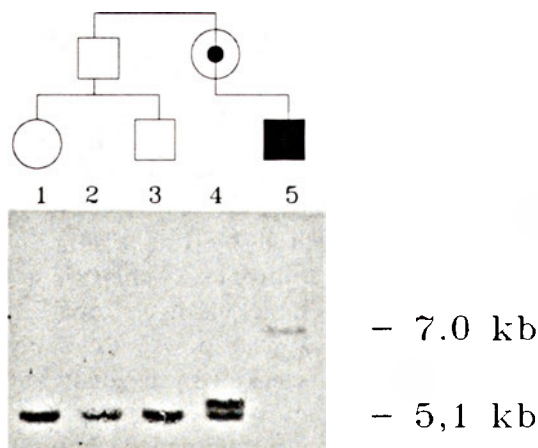
Stabilizujący wpływ na sekwencje powtórzone ma przerwanie ciągu identycznych powtórzeń przez inną sekwencję. W przypadku zespołu fra-X odkryto, że gen *FMR-1* zawierać może triplety AGG, przerywające sekwencję złożoną z wielu powtórzeń CGG [3]. Ponieważ obydwa triplety kodują argininę, dla ewentualnego produktu białkowego, zmiana ta byłaby bez znaczenia. Fakt ten posłużył za podstawę ciekawej hipotezy, która pojawienie się sekwencji o zwiększonej niestabilności tłumaczy wystąpieniem mutacji punktowej, przywracającej ciągłość sekwencji powtórzonych, a w związku z tym zwiększającej jej niestabilność [15]. Być może w taki sposób powstały wiele lat temu

premutacje, które, ulegając wydłużeniu w kolejnych pokoleniach są przyczyną obserwowanych obecnie przypadków choroby. Istnieje wiele faktów przemawiających za tym, że we wszystkich czterech chorobach związanych z mutacjami dynamicznymi mamy do czynienia z tak zwanym zjawiskiem założyciela (ang. *founder effect*) [59, 60]. Jednym z takich faktów jest brak przypadków pojawiania się świeżych mutacji, czyli mutacji, które powstały by *de novo* u pacjenta, a nie byłyby mu przekazane od jednego z rodziców [61]. Ścisłe sprzężenie mutacji odpowiedzialnych za zespół fra-X, dystrofię miotoniczną i płasawicę Huntingtona z określonymi allelami sąsiednich markerów polimorficznych również może świadczyć o tym, że wiele wykrywanych obecnie mutacji pochodzi od wspólnego przodka [62].

VI. Diagnostyka molekularna chorób, wywołanych przez mutacje dynamiczne

Diagnostyka molekularna opisywanych chorób opierała się do niedawna głównie na analizie sprzężonych z genem markerów polimorficznych. Odkrycie niestabilnych sekwencji, będących przyczyną tych chorób pozwoliło na opracowanie testów diagnostycznych, umożliwiających bezpośrednią analizę mutacji. Sposób wykrywania nadmiernej amplifikacji niestabilnych sekwencji jest podobny w przypadku wszystkich opisywanych tu chorób. Diagnostyka molekularna oparta jest na analizie restrykcyjnej połączonej z hybrydacją (Fot. 1) [63] lub na reakcji PCR [64-66].

W przypadku zespołu fra-X, dodatkową wartość



Fot. 1. Wynik analizy amplifikacji niestabilnej sekwencji CGG w rodzinie ryzyka zespołu fra-x.

Symbolami niewypełnionymi oznaczone są osoby zdrowe, nie będące nosicielami mutacji dynamicznej. Kobieta, nosicielka premutacji w genie *FMR-1* oznaczona jest kółkiem z kropką w środku, a chory chłopiec z objawami klinicznymi zespołu fra-x przedstawiony jest jako wypełniony kwadrat. Widoczne na zdjęciu prążki powstały w wyniku hybrydacji znakowanej sondy molekularnej (fragment genu *FMR-1*) ze związanym z filtrem, pociętym enzymem restrykcyjnym i rozdzielonym uprzednio w żelu agarozowym, DNA chromosomalnym. Prążki odpowiadające fragmentom DNA o wielkości 5,1 kb oznaczają obecność allelu dzikiego (niezmutowanego). Prążki leżące powyżej odpowiadają allelom z premutacją (ścieżka 4) lub pełną mutacją (ścieżka 5).

¹ Część badaczy stosuje zunifikowane symbole powtórzeń powtórzonych, opierając swój wybór na kolejności alfabetycznej możliwych kombinacji [58]. Według tej reguły, dla sekwencji niestabilnej zidentyfikowanej w genie *FMR-1*, należałoby zastosować symbol $p(CCG)_n$, a dla sekwencji związanych z dystrofią miotoniczną, chorobą Kennedy'ego i płasawicą Huntingtona obowiązywać powinien ten sam symbol $p(AGC)_n$. Ponieważ konwencja ta nie jest na razie zbyt popularna, w pracy tej wykorzystano symbole najczęściej spotykane w publikacjach naukowych.

diagnostyczną ma analiza metylacji sekwencji CpG, położonych obok końca 5' genu *FMR-1*. Wykorzystuje się tu enzymy restrykcyjne odróżniające sekwencje metylowane od niemetylowanych.

Powyższe metody nie tylko umożliwiają weryfikację rozpoznania klinicznego, ale mają też zastosowanie przy wykrywaniu nosicielstwa choroby oraz w badaniach prenatalnych [67, 68].

VII. Społeczne i prawne konsekwencje odkrycia mutacji dynamicznych

Z rozważań na temat pochodzenia mutacji dynamicznych wynika, że zdiagnozowani pacjenci, wykazujący wyraźne objawy kliniczne, to jedynie niewielka grupa w porównaniu z liczbą osób zdolnych w przyszłości do przekazania choroby swym dzieciom i wnukom. Na przykładzie zespołu fra-X widać najwyraźniej konsekwencje takiej sytuacji. O ile częstość występowania choroby wśród mężczyzn rasy białej wynosi ok. 1:1000, a u kobiet 1:2500, to ocenia się, że częstość występowania mutacji wśród zdrowych kobiet może, przy ostrożnych szacunkach, sięgać 1:500 [69]. W przypadku wszystkich zdrowych nosicielek mutacji istnieje duże ryzyko pojawienia się choroby u potomstwa. Skoro w niektórych krajach rozważa się możliwość wprowadzenia testów przesiewowych na mukowiscydozę, w której prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji u obojga rodziców warunkującego możliwość wystąpienia choroby u dziecka, wynosi ok. 1:600 (1 na ok. 25 osób rasy białej jest nosicielem mutacji w genie *CFTR*), to tym bardziej zasadne wydają się podobne zamierzenia w odniesieniu do zespołu fra-X. Odkrycie mutacji dynamicznych obudziło nadzieję na poznanie przyczyn wielu innych chorób o podłożu genetycznym, szczególnie tych, w których obserwuje się znaczne zróżnicowanie objawów klinicznych i nietypowy sposób dziedziczenia. Podejrzewa się również, że niestabilność mitotyczna tego typu sekwencji może być przyczyną niektórych chorób nowotworowych. Jeśli poznane dotąd przypadki patogennych niestabilnych sekwencji nie są wyjątkiem, to użycie sond molekularnych, zawierających trójnukleotydowe sekwencje powtórzone, powinno przyspieszyć identyfikację kolejnych genów, ulegających mutacjom dynamicznym.

Problem dyskryminacji osób będących nosicielami defektu genetycznego, nie ulegającego chwilowo manifestacji, jest już od dłuższego czasu poruszany na łamach prasy [70-74]. Można oczekiwać, że choroby związane z mutacjami dynamicznymi wzbudzą nową falę dyskusji na ten temat. Wydaje się, że nieodzowne jest ustanowienie zabezpieczeń prawnych uniemożliwiających niezgodne z życzeniem pacjenta wykorzystywanie danych o jego informacji genetycznej.

Addendum

Już po przesłaniu powyższego artykułu do Redakcji ukazało się kilka interesujących artykułów dotyczących

poruszanego tematu. Ustalono sekwencję białka będącego produktem genu *FMR-1* i okazało się, że zawiera ono domeny charakterystyczne dla białek wiążących RNA. Udało się też wyprodukować przeciwciała przeciwko temu białku, które mogą okazać się bardzo pomocne przy diagnozowaniu chorych [75, 76]. Najciekawszym jednak odkryciem jest zidentyfikowanie niestabilnych sekwencji jako przyczyn dwóch następnych chorób uwarunkowanych genetycznie. Za występowanie ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 1 (ang. *spinocerebellar ataxia type 1*) odpowiedzialna jest sekwencja powtórzona złożona z tripletów CAG [77], a za lekkie upośledzenie umysłowe związane z ekspresją łamliwego miejsca w Xq28 (FRAXE) odpowiada powtórzona sekwencja GCC [78]. Ten drugi przypadek wydaje się potwierdzać hipotezę mówiącą, że występowanie miejsc łamliwych towarzyszy amplifikacji tylko tych sekwencji powtórzonych, które składają się wyłącznie z par G-C.

Podziękowanie

Dziękujemy doc. dr hab. med. T. Mazurczakowi, mgr C. Żekanowskiemu i mgr A. Szpecht-Potockiej za cenne wskazówki, udzielone w trakcie pisania tej pracy.

Artykuł otrzymano 16 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 15 września 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boué J, Bertheas MF, Mandel JL (1991) *Science* **252**: 1097-1102
2. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) *Science* **252**: 1179-1181
3. Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, van Ommen GJB, Blonden LAJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunst CB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson DL, Oostra BA, Warren ST (1991) *Cell* **65**: 905-914
4. Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) *Science* **252**: 1711-1714
5. Harley HG, Brook JD, Rundle SA, Crow S, Reardon W, Buckler AJ, Harper PS, Housman DE, Shaw DJ (1992) *Nature (Lond)* **355**: 545-546
6. Buxton J, Shelbourne P, Davies J, Jones C, Van Tongeren T, Aslanidis C, de Jong P, Jansen G, Anvret M, Riley B, Williamson R, Johnson K (1992) *Nature (Lond)* **355**: 547-548
7. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, Sohn R, Zemelman B, Snell RG, Rundle SA, Crow S, Davies J, Shelbourne P, Buxton J, Jones C, Juvonen V, Johnson K, Harper PS, Shaw DJ, Housman DE (1992) *Cell* **68**: 799-808
8. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shuttler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Nairang M, Barceló J, O'Hoy K, Leblond S, Earle-Macdonald J, de Jong PJ, Wieringa B, Korneluk RG (1992) *Science* **255**: 1253-1255
9. Fu Y-H, Pizzuti A, Fenwick Jr. RG, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P, Wieringa B, Korneluk R, Perryman MB, Epstein HF, Caskey CT (1992) *Science* **255**: 1256-1258
10. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991) *Nature (Lond)* **352**: 77-79
11. Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) *Cell* **72**: 971-983
12. Sutherland GR, Haan EA, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Yu S, Richards RI (1991) *Lancet* **338**: 289-292

13. Caskey CT, Pizzuti A, Fu Y-H, Fenwick Jr RG, Nelson DL (1992) *Science* **256**: 784-789
14. Richards RI, Sutherland GR (1992) *Nature Genet* **1**: 7-9
15. Richards RI, Sutherland GR (1992) *Cell* **70**: 709-712
16. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) *Nature (Lond)* **314**: 67-73
17. Webb TP, Bunday SE, Thake AI, Todd J (1986) *Am J Med Genet* **23**: 573-580
18. Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G (1984) *Ann Hum Genet* **48**: 21-37
19. Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington NW, Sutherland GR, Turner G, Watson M (1985) *Hum Genet* **69**: 3289-3299
20. Lubs HA (1969) *Am J Hum Genet* **21**: 231-244
21. Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJMH, Holden JJA, Fenwick Jr. RG, Warren ST, Oostra BA, Nelson DA, Caskey CT (1991) *Cell* **67**: 1047-1058
22. Vincent A, Heitz D, Petit C, Kretz C, Oberlé I, Mandel JL (1991) *Nature (Lond)* **349**: 624-626
23. Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Froster-Iskenius U, Kerr B, Turner G, Thibodeau S, Daviers KE (1991) *Cell* **64**: 861-866
24. Heitz D, Rousseau F, Devys D, Saccone S, Abderrahim H, Le Paslier D, Cohen D, Vincent A, Toniolo D, Della Valle G, Johnson S, Schlessinger D, Oberlé I, Mandel JL (1991) *Science* **251**: 1236-1239
25. Hansen RS, Gartler SM, Scott CR, Chen S-H, Laird CD (1992) *Hum Mol Genet* **1**: 571-578
26. Harper PS (1989) *W: Myotonic Dystrophy 2* wyd., Saunders, London
27. Harper PS, Dyken PR (1972) *Lancet* **2**: 53-55
28. Penrose LS (1948) *Ann Eugenics* **14**: 125-132
29. Höweler CJ, Busch HFM, Geraedts JPM, Niermeijer MF, Staal A (1989) *Brain* **112**: 779-797
30. Mahadevan MS, Amemiya C, Jansen G, Sabourin L, Baird S, Neville CE, Wormskamp N, Segers B, Batzer M, Lamerdin J, de Jong P, Wieringa B, Korneluk RH (1993) *Hum Mol Genet* **2**: 299-304
31. Hunter A, Tsilfidis C, Mettler G, Jacob P, Mahadevan M, Surh L, Korneluk R (1992) *J Med Genet* **29**: 774-779
32. Tsilfidis C, MacKenzie AE, Mettler G, Barceló J, Korneluk RG (1992) *Nature Genet* **1**: 191-195
33. Arbizu T, Santamaria J, Gomez JM, Quilez A, Serra JP (1983) *J Neurol Sci* **59**: 371-382
34. Biancalana V, Serville F, Pommier J, Julien J, Hanauer A, Mandel JL (1992) *Hum Mol Genet* **4**: 255-258
35. La Spada AR, Roling DB, Harding AE, Warner CL, Spiegel R, Hausmanowa-Petrusewicz I, Yee W-C, Fishbeck KH (1992) *Nature Genet* **2**: 301-304
36. Martin JB, Gusella JF (1986) *N Engl J Med* **315**: 1267-1276
37. Sutherland GR, Richards RI (1992) *Am J Hum Genet* **51**: 7-9
38. Harper PS, Harley HG, Reardon W, Shaw DJ (1992) *Am J Hum Genet* **51**: 10-16
39. Ashizawa T, Dunne CJ, Dubel JR, Perryman MB, Epstein HF, Boerwinkle E, Hejtmancik JF (1992) *Neurology* **42**: 1871-1877
40. Ashizawa T, Dubel JR, Dunne PW, Dunne CJ, Fu Y-H, Pizzuti A, Caskey CT, Boerwinkle E, Perryman MB, Epstein HF, Hejtmancik JF (1992) *Neurology* **42**: 1877-1883
41. Fu Y-H, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG, Caskey CT (1993) *Science* **260**: 235-238
42. Pieretti M, Zhang F, Fu Y-H, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL (1991) *Cell* **68**: 817-822
43. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST (1992) *Hum Mol Genet* **1**: 397-400
44. Willard HF (1993) *Hum Mol Genet* **2**: 497-498
45. De Bouille K, Verkerk AJMH, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van Den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ (1993) *Nature Genet* **3**: 31-35
46. Gedeon AK, Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, Manca A, Korn B, Poustka A, Yu S, Sutherland GR, Mulley JC (1992) *Nature Genet* **1**: 341-344
47. Wöhrle D, Kotzot D, Hirst MC, Manca A, Korn B, Schmidt A, Barbi G, Rott HD, Poustka A, Davies KE, Steinbach P (1992) *Am J Hum Genet* **51**: 299-306
48. McPhaul MJ, Marcelli M, Tilley WD, Griffin JE, Wilson JD (1991) *FASEB J* **5**: 2910-2915
49. Batch JA, Williams DM, Davies HR, Brown BD, Evans BAJ, Hughes IA, Patterson MN (1992) *Hum Mol Genet* **7**: 497-503
50. Batch JA, Evans BAJ, Hughes IA, Patterson MN (1993) *J Med Genet* **30**: 198-201
51. Hunt PA, LeMaire R (1992) *Am J Hum Genet* **50**: 1162-1170
52. Rouyer F, Simmler M-C, Johnsson C, Vergnaud G, Cooke HJ, Weissenbach J (1986) *Nature (Lond)* **319**: 291-295
53. Vergnaud G, Mariat D, Apiou F, Aurias A, Lathrop M, Lauthier V (1991) *Genomics* **11**: 135-144
54. Laird CD (1987) *Genetics* **117**: 587-599
55. Shaw DJ, Chaudhary S, Rundle SA, Crow S, Brooks JD, Harper PS, Harley HG (1993) *J Med Genet* **30**: 189-192
56. Dracopoli NC, O'Connell P, Elsner TI, Lalouel J, White LRL, Buetow KH, Nishimura DY, Murrat JC, Helms C, Mishra SK, Donis-Keller H, Hall JM, Lee MK, King M, Attwood J, Morton NE, Robson EB, Mahtani M, Willard HF, Royle NJ, Patel I, Jeffreys AJ, Verga V, Jenkins T, Wever JL, Mitchell AL, Bale AE (1991) *Genomics* **9**: 686-700
57. Riggins GJ, Lokey LK, Chastain JL, Leiner HA, Sherman SL, Wilkinson KD, Warren ST (1992) *Nature Genet* **2**: 186-191
58. Richards RI, Sutherland GR (1992) *Trends Genet* **8**: 249-255
59. Chakrawarti A (1992) *Nature Genet* **1**: 237-238
60. Richards RI, Holman K, Friend K, Kremer E, Hillen D, Staples A, Brown WT, Goonewardena P, Tarleton J, Schwartz C, Sutherland GR (1992) *Nature Genet* **1**: 257-260
61. Smits APT, Dreesen JCFM, Post JG, Smets DFCM, de Die-Smulders C, Spaans-van der Bijl T, Govaerts LCP, Warren ST, Oostra BA, van Oost BA (1993) *J Med Genet* **30**: 94-96
62. Oudet C, Mornet E, Serre JL, Thomas F, Lentenz-Zengerling S, Kretz C, Deluchat C, Tejada I, Boué J, Mandel JL (1993) *Am J Hum Genet* **52**: 297-304
63. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Oberlé I, Mandel JL (1992) *Am J Med Genet* **43**: 197-207
64. Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown WT (1992) *Lancet* **339**: 271-272
65. Erster SH, Brown WT, Goonewardena P, Dobkin CS, Jenkins EC, Pergolizzi RG (1992) *Hum Genet* **90**: 55-61
66. Brunner HG, Nielsen W, van Oost BA, Jansen G, Wieringa B, Ropers HH, Smets HJM (1992) *J Med Genet* **29**: 780-784
67. Sutherland GR, Gedeon A, Kornman L, Donnelly A, Byard R W, Mulley JC, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Richards RI (1991) *N Engl J Med* **325**: 1720-1722
68. Myring J, Meredith AL, Harley HG, Kohn G, Norbury G, Harper PS, Shaw DJ (1992) *J Med Genet* **29**: 785-788
69. Mandel JL, Heitz D (1992) *Curr Opin Genet Dev* **2**: 422-430

70. Natowicz MR, Alper JK, Alper JS (1992) *Am J Hum Genet* **50**: 465-475
71. Billings PR, Kohn MA, de Cuevas M, Beckwith J, Alper JS, Natowicz MR (1992) *Am J Hum Genet* **50**: 476-482
72. Holtzman NA, Rothstein MA (1992) *Am J Hum Genet* **50**: 457-459
73. Harper PS (1992) *Am J Hum Genet* **50**: 460-464
74. Wertz DC, Fletcher JC (1993) *Clin Genet* **43**: 104-110
75. Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJMH, Galjaard H, Reuser AJJ, Noogeveen AT, Oostra BA (1993) *Nature* (Lond) **363**: 722-724
76. Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1993) *Cell* **74**: 291-298
77. Orr HT, Chung M-Y, Banfi S, Kwiatkowski TJ Jr, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW, Zoghbi HY (1993) *Nature Genet* **4**: 221-226
78. Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, Pointon J, Middleton-Price HR, Barnicoat A, Pembrey ME, Holland J, Oostra BA, Bobrow M, Davies KE (1993) *Cell* **74**: 127-134

Polimorfizm genu α_1 -antytrypsyny (*locus* Pi inhibitora proteaz)

Polymorphism of α_1 -antitrypsin gene (*Pi locus* of protease inhibitor)

ANNA KOWALSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa i funkcja α_1 -antytrypsyny
- III. Ekspresja genu α_1 -antytrypsyny
- IV. Molekularne podłoże polimorfizmu *locus* Pi
- V. Udział polimorfizmu *locus* Pi w patogenezie chorób

Wykaz stosowanych skrótów: A1AT — α_1 -antytrypsyna; Pi — inhibitor proteaz; kDa — kilodaltonów; pz — par zasad; kpz — 10^3 par zasad; A — adenina; G — guanina; C — cytozyna; T — tymina; Val — walina; Ala — alanina; Met — metionina; Ser — seryna; Ile — izoleucyna; Pro — prolina; Glu — glutaminian.

I. Wstęp

Zachowanie równowagi pomiędzy enzymami proteolitycznymi i ich inhibitorami jest jednym z istotnych czynników w utrzymywaniu homeostazy organizmu [1]. Inhibitory proteaz stanowią ok. 10% wszystkich białek ludzkiej surowicy krwi, tworząc największą po albuminach i immunoglobulinach frakcję białek funkcjonalnych krwi [2]. Szczególnie ważną rolę grają inhibitory proteaz serynowych, które kontrolują szereg procesów obronnych organizmu związanych m. in. z krzepnięciem, fibrynolizą, aktywacją komplementu, uwalnianiem kinin, procesami zapalnymi, a także metabolizmem tkanki łącznej [3-5]. Podstawowymi inhibitorami proteaz serynowych w surowicy są m.in. α_1 -antytrypsyna, antytrombina III, α_2 -antypłazmina, α_1 -antychymotrypsyna, inhibitor-C1, α_2 -

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure and function of α_1 -antitrypsin
- III. Expression of α_1 -antitrypsin gene
- IV. Molecular basis of *Pi locus* polymorphism
- V. Role of *Pi locus* polymorphism in pathogenesis of diseases

-makroglobulina, β_1 -antykolagenaza i in. [6]. Tworzą one rodzinę glikoprotein określaną w piśmiennictwie anglosaskim mianem "*serpins*". Wszystkie wykazują duży stopień podobieństwa, zarówno struktury molekularnej, szczególnie sekwencji aminokwasów tworzących centrum aktywne, jak i mechanizmu działania [7, 8].

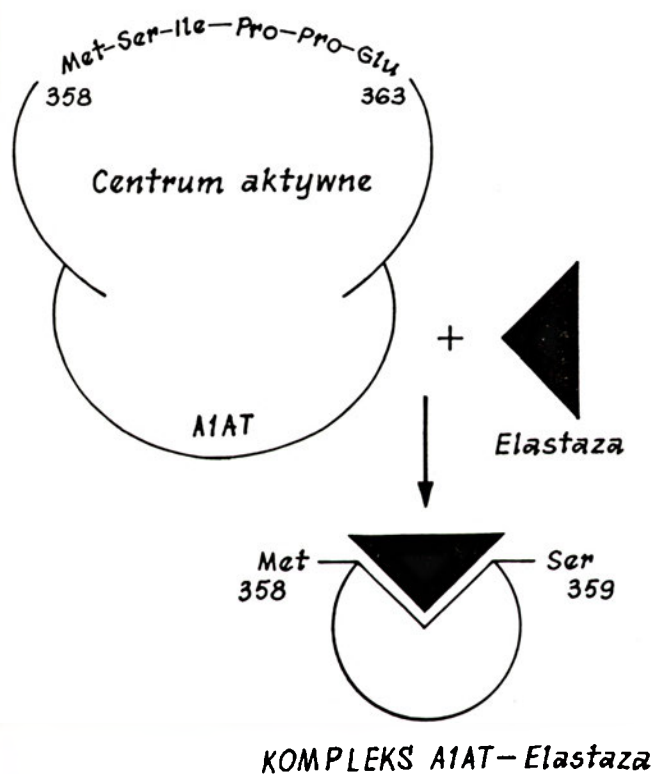
II. Budowa i funkcja α_1 -antytrypsyny

α_1 -antytrypsyna (A1AT), zwana także α_1 -inhibitorem proteaz lub α_1 -antyproteazą, wchodzi w skład frakcji α_1 -globulin ludzkiej surowicy krwi. Hamuje działanie szeregu proteaz serynowych: przede wszystkim elastazy neutrofilowej, a także trypsyny, chymotrypsyny, plazminy, plazminogenu, katepsyny G, [9]. Podstawową funkcją A1AT jest obrona organizmu przed zbyt silnym działaniem elastazy neutrofilowej wydzielanej przez leukocyty i makrofagi. Stała szybkości reakcji dla A1AT i elastazy wynosi $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ i jest 25-krotnie wyższa niż w przypadku jakiegokolwiek innej proteazy [10].

Cząsteczka A1AT (55 kDa) składa się z pojedynczego łańcucha peptydowego zawierającego 394 reszt aminokwasowych oraz trzech łańcuchów cukrowcowych o różnym stopniu rozgałęzienia, zbudowanych

* dr n. przyrod., Zakład Genetyki Człowieka PAN, 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32

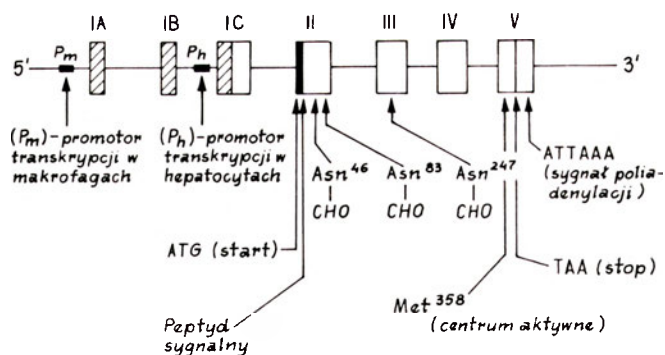
z reszt N-acetyloglukozaminy, mannozy, galaktozy i kwasu sialowego [11]. Badania krystalograficzne przeprowadzone przez L o e b e r m a n n a wykazały, iż A1AT jest białkiem globularnym o wysoce uporządkowanej strukturze trzeciorzędowej, stabilizowanej przez trzy wewnętrzne mostki elektrostatyczne [12]. Część A1AT zawiera osiem rejonów typu α -helisy oraz trzy typu β -harmonijki. Centrum aktywne białka tworzy sześć reszt aminokwasowych zajmujących pozycje od 358 do 363 w łańcuchu peptydowym. Zasadnicze znaczenie dla oddziaływania z elastazą mają metionina i seryna w pozycjach odpowiednio 358 i 359 (Ryc. 1). Mechanizm hamowania proteaz polega na ich inaktywacji poprzez tworzenie trwałego, nieodwracalnego kompleksu inhibitor-proteaza, który następnie jest usuwany z krwiobiegu.



Ryc. 1. Schemat oddziaływań pomiędzy elastazą neutrofilową a alfa₁-antytrypsyną.

III. Ekspresja genu alfa₁-antytrypsyny

Gen A1AT, zlokalizowany na chromosomie 14q31-32.3, składa się z 7 eksonów i 6 intronów o łącznej długości ok. 12.2 kbp [13, 14]. Sekwencja DNA całego genu A1AT wraz z regionem regulatorowym została poznana głównie dzięki badaniom K u r a c h i ' e g o [15] i L o n g a [16]. Pierwsze trzy eksony I_A, I_B, I_C kodują sekwencje regulatorowe oraz nie ulegają translacji fragment 5' mRNA. Pełna informacja o sekwencji aminokwasów białka zawarta jest w eksonach od II do V (Ryc. 2). W odległości ok. 12 kbp od końca 3' genu A1AT znajduje się sekwencja DNA o dużym stopniu homologii do genu A1AT ("sequence-related gene"), która prawdopodobnie nie ulega ekspresji



Lokalizacja: chromosom 14q 31-32.3

Długość: 12.2 kbp

Ryc. 2. Struktura genu alfa₁-antytrypsyny.

i stanowi tzw. pseudogen A1AT [17].

Synteza A1AT zachodzi głównie w wątrobie. Dodatkowym miejscem syntezy są fagocyty jednojądrzaste, monocyty krwi i makrofagi pęcherzyków płuc. Synteza A1AT w hepatocytach jest 200-krotnie bardziej intensywna niż w pozostałych tkankach [18]. Ekspresja genu ma charakter tkankowo-specyficzny i jest regulowana przez dwa różne, wzajemnie wykluczające się promotory specyficzne dla hepatocytów i makrofagów [19]. Długość mRNA A1AT w hepatocytach wynosi ok. 1.4 kbp. W makrofagach występują transkrypty o długości ok. 1.8 kbp. U podstaw powyższej niejednorodności leży prawdopodobnie zjawisko alternatywnego „składania” ("splicing") [20].

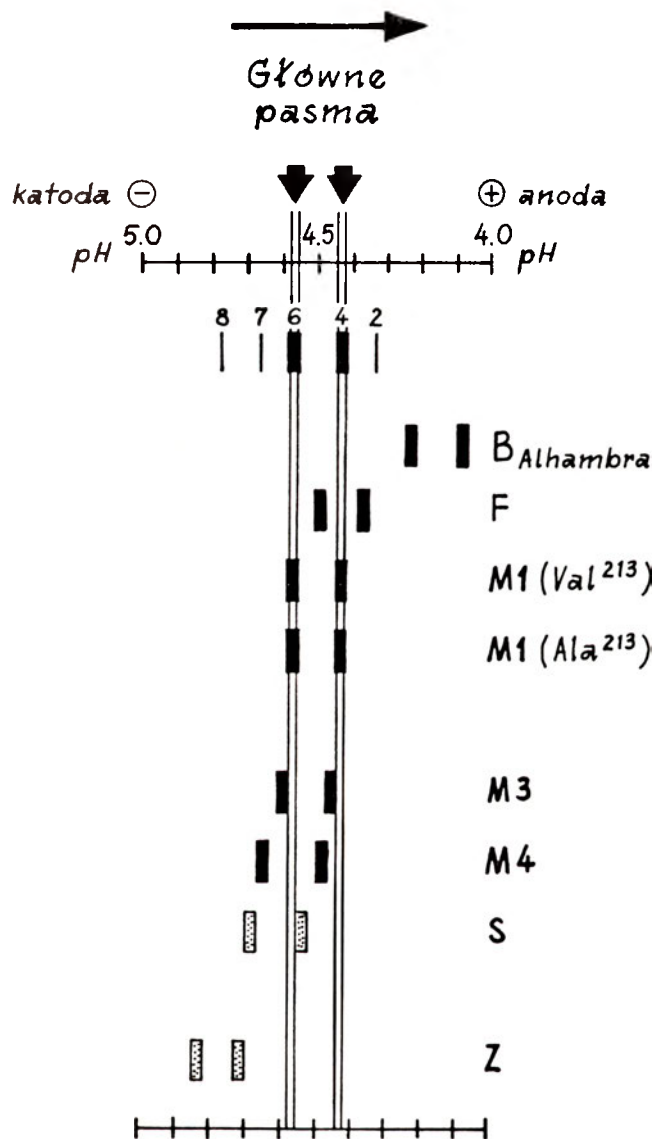
Cykl biosyntezy A1AT jest typowy dla glikoprotein sekrecyjnych. W wyniku translacji powstaje prekursor białka o długości 418 aminokwasów, przechodzący dzięki obecności N-końcowego peptydu sygnałowego do cystern aparatu Golgiego. Po zakończeniu procesu glikozylacji, odcięciu peptydu sygnałowego i przyjęciu odpowiedniej konformacji, dojrzałe białko jest wydzielane do krwi.

IV. Polimorfizm locus Pi

Gen alfa₁-antytrypsyny wykazuje silny polimorfizm. W populacji ludzkiej występuje wiele odmian fenotypowych A1AT tzw. wariantów, dziedziczących się autosomalnie kodominująco. Dzięki użyciu technik elektroforetycznych oraz molekularnych metod analizy DNA, wykryto dotychczas ponad 75 wariantów A1AT [21]. Większość z nich została sklasyfikowana na podstawie różnic w prędkości migracji cząsteczek A1AT podczas rozdzielania elektroforetycznego w żelu skrobiowym lub izoelektroogniskowania (IEF) w żelu poliakryloamidowym o gradiencie pH od 4 do 6 (Ryc. 3). Typowy wzór A1AT uzyskany metodą IEF składa się z pięciu pasm, z których dwa (pasmo 4 i 6) zdecydowanie dominują nad pozostałymi (pasma: 2, 7, 8). Ta mikroheterogenność cząsteczek A1AT w obrazie elektroforetycznym wynika z różnic w długości łańcucha peptydowego oraz bocznych łańcuchów cuk-

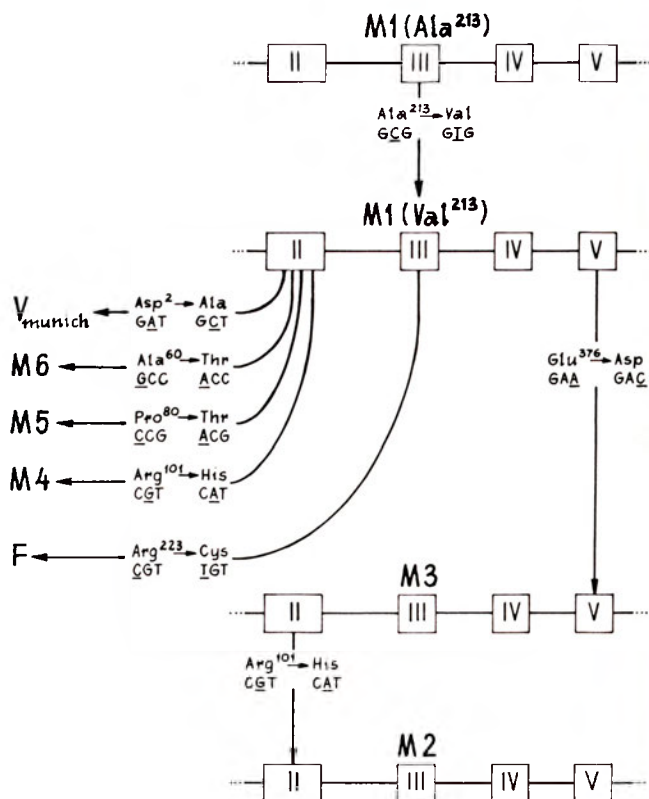
rowcowych.

Poznane dotychczas allele A1AT można zaliczyć na podstawie stężenia A1AT w surowicy do czterech grup przedstawionych w tabeli 1. Dzięki sekwencjonowaniu DNA poznano ostatnio molekularne podłoże zmian w genie A1AT, warunkujące powstanie ponad 30 alleli (Tabela 2).



Ryc. 3. Schemat izoelektroogniskowania wybranych wariantów alfa₁-antytrypsyny w zakresie pH 4-5.

Allele normalne charakterystyczne dla ludzi z prawidłowym poziomem A1AT w surowicy dominują w populacji, stanowiąc ponad 95% wszystkich alleli. Poszczególne subtypy podstawowego allelu M: M1 (Val²¹³), M1 (Ala²¹³), M2, M3 różnią się między sobą pojedynczymi nukleotydami [22, 23]. Allel M3 różni się od allelu M1 (Val²¹³) transwersją A → C w eksonie V, natomiast allel M2 różni się od M3 dodatkową transzycją G → A w eksonie II. Transycja C → T w pozycji 213 w eksonie III różnicuje allel M1 na: M1 (Ala²¹³) i M1 (Val²¹³). Powstałe warianty polimorficzne nie różnią się między sobą ruchliwością elektroforetyczną wskutek czego mogą być wykryte jedynie metodami analizy DNA (Ryc. 4). Inne allele normalne,



Ryc. 4. Mutacje w sekwencjach kodujących warunkujące powstanie podstawowych alleli normalnych genu alfa₁-antytrypsyny.

występujące w populacji z częstością mniejszą niż 0.1%, określane są jako rzadkie [10].

Allele deficytowe nie zapewniają prawidłowego stężenia A1AT w surowicy. Do najczęstszych alleli w tej grupie należą allele Z i S występujące w populacjach rasy kaukaskiej z częstością wahającą się od 1 do 4%. Allel Z powstał w wyniku transzycji G → A w eksonie V, dającej w pozycji 342 łańcucha peptydowego lizynę zamiast glutaminy [25]. Zmiana w sekwencji aminokwasów narusza trzeciorzędową strukturę białka. Wprowadzenie aminokwasu z dodatkową grupą aminową, wskutek zmiany ładunku cząsteczki, powoduje zerwanie mostka elektrostatycznego pomiędzy glutaminą 342 a lizyną 290. W wyniku tych zmian zwolnieniu ulega tempo potranslacyjnego procesu fałdowania białka, co sprzyja oddziaływaniom pomiędzy resztami hydrofobowymi przylegających do siebie cząsteczek A1AT i powoduje ich agregację w siateczce endoplazmatycznej hepatocytów. Około 10-15% zmutowanej formy A1AT jest wydzielane do krwi, gdzie wariant ten wykazuje zmniejszoną aktywność antyproteolityczną. Wskutek zmian konformacyjnych kompleks A1AT-elastaza nie jest strukturą stabilną.

W allelu S transwersja A → T w eksonie III genu prowadzi do zamiany glutaminy na walinę w pozycji 264. W następstwie zerwania mostka elektrostatycznego pomiędzy glutaminą a lizyną w pozycji 290 zmniejsza się stabilność białka, co powoduje jego rozpad w hepatocytach [16]. Jedynie 40% wariantu S wydzielane jest do krwiobiegu. Mutacja ta nie zmniejsza aktywności antyproteolitycznej inhibitora.

Tabela 1.Klasyfikacja podstawowych wariantów α_1 -antytrypsyny (według Crystala i in., 1989).

| Grupy wariantów | Symbol wariantu | Poziom A1AT w surowicy (mg/dl) | Częstość populacji | Funkcja A1AT | Ryzyko chorób wątroby płuc *) |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|--------------------|----------------|-------------------------------|
| Normalne (normalny poziom A1AT) | M 1 (Ala ²¹³) | 150-350 | 0.20-0.23 | normal. | — — |
| | M 1 (Val ²¹³) | 150-350 | 0.44-0.49 | „ | — — |
| | M 2 | 150-350 | 0.14-0.19 | „ | — — |
| | M 3 | 150-350 | 0.10-0.11 | „ | — — |
| | M 4 | 150-350 | 0.01-0.05 | „ | — — |
| | <i>B_{ulhambra}</i> <i>X_{christchurch}</i> | 150-350 150-350 | rzadkan rzadka | n. b. n. b. | — — — — |
| Deficytowe (zaniżony poziom A1AT) | Z | 15-50 | 0.01-0.02 | zreduk. | + + |
| | S | 100-200 | 0.02-0.04 | normal. | — — |
| | <i>M_{procida}</i> | 10 | rzadka | normal. | — + |
| | <i>M_{heerlen}</i> | 10 | „ | n. b. | — + |
| | <i>M_{malton}</i> | 10 | „ | n. b. | + + |
| | <i>M_{duarte}</i> | 10 | „ | n. b. | + + |
| Null (brak A1AT w surowicy) | Null _{<i>bellingham</i>} | 0 | rzadka | ... | — + |
| | Null _{<i>granite falls</i>} | 0 | „ | ... | — + |
| | Null _{<i>mattawa</i>} | 0 | „ | ... | — + |
| | Null _{<i>hong kong</i>} | 0 | „ | ... | — + |
| | Null _{<i>procida</i>} | 0 | „ | ... | — + |
| | Dysfunkcjonalne (normalny poziom ale zaburzona funkcja A1AT) | Pittsburgh | 150-350 | 1 przypadek | zmieniona |

n. b. — nie badano

... — brak A1AT w surowicy

*) + — zwiększone ryzyko chorób

— — brak zwiększonego ryzyka chorób

Nie obserwuje się też agregacji cząsteczek w cytoplazmie hepatocytów.

Inne zidentyfikowane allele deficytowe tj: *M_{heerlen}*, *M_{procida}*, *M_{duarte}*, *P*, *Z_{Augsburg}* należą do alleli rzadkich [26, 29]. Allel *M_{heerlen}* powstaje w wyniku tranzycji C → T w eksonie V, powodującej zamianę prolina na leucynę w pozycji 369 [30]. Wariant *M_{procida}* zawiera tranzycję T → C w eksonie II prowadzącą do zamiany leucyny na prolinę w pozycji 41 [31]. Analiza krystalograficzna obu wariantów sugeruje, że powyższe mutacje zmieniają strukturę A1AT w regionach α -helisy, co wpływa na zaburzenie procesu fałdowania cząsteczek A1AT i przyczynia się do ich degradacji przed wydzieleniem z hepatocytów. Do krwi przechodzi znikoma ilość A1AT (poniżej 10%).

Przyczyną powstawania alleli "null" (niemych) są mutacje punktowe typu zmiana fazy odczytu oraz mutacje nonsensowne, które uniemożliwiają syntezę prawidłowego produktu białkowego [32-36]. U wszystkich homozygotycznych nosicieli alleli niemych obserwuje się całkowity brak A1AT w surowicy krwi. Ich częstość w populacji nie przekracza 0.1%. Allel null_{*bellingham*} powstał w wyniku transwersji A → T w kodonie lizyny 217, wprowadzającej w to miejsce sygnał stop TAG [37]. W następstwie powstają skrócone mRNA, ulegające degradacji. Podobnie w allelu null_{*granite falls*}, delekcja cytozyny w eksonie II kodonu tyrozyny 160 powoduje przesunięcie ramki odczytu z wytworzeniem sygnału stop [38]. W allelu null_{*hong kong*}

w eksonie IV w pozycji leucyny 318 wypadają dwie zasady: tymina i cytozyna, co powoduje utworzenie kodonu stop w pozycji 334 [39].

Jedynym dotychczas poznanym wariantem dysfunkcyjnym jest wariant *Pi_{Pittsburgh}*. Zamiana metioniny na argininę w pozycji 358 centrum aktywnego cząsteczki A1AT powoduje zamianę jej normalnej aktywności w aktywność antytrombinową, co u nosiciela tego wariantu powodowało ciężką skazę krwotoczną [40].

V. Udział polimorfizmu locus *Pi* w patogenezie chorób

U większości nosicieli alleli niemych o fenotypach: *Pi* null, *Pi* null Z oraz u 60% homozygot *PiZZ* pomiędzy 30 a 40 rokiem życia występują objawy rozedmy płuc wskutek niedoboru A1AT [41-43]. Podwyższone ryzyko rozwoju chorób płuc występuje także u heterozygot: *PiMZ*, *PiMS* oraz homozygot *PiSS* [44]. Zakłócenie równowagi pomiędzy A1AT a proteazami w obrębie dolnych dróg oddechowych powoduje niszczenie ścianek pęcherzyków płucnych. Wskutek nadmiernej aktywności elastazy uwalnianej z fagocytów i makrofagów pęcherzykowych następuje uszkodzenie włókien elastyny, co z czasem prowadzi do zmniejszenia sprężystości tkanki płucnej [45].

Około 17% dzieci o fenotypie *PiZZ* choruje na choroby wątroby (marskość, rak wątroby), z czego 3% umiera w pierwszych latach życia [46-49]. Mechanizm

Tabela 2.Molekularne podłoże polimorfizmu niektórych alleli deficytowych i niemych α_1 -antytrypsyny

| Allele | Mutacja i jej efekt molekularny | Autorzy |
|------------------------------|--|---------------------------------|
| Deficytowe: | | |
| Z | Ekson V: Glu ³⁴² (GAG) → Lys ³⁴² (GAA) utrata mostka elektrostatycznego pomiędzy Glu ³⁴² a Lys ²⁹⁰ →, akumulacja zmutowanej A1AT w cytoplazmie hepatocytów | Kidd V. J. i in., 1983 |
| Z _{Augsburg} | Ekson V: Glu ³⁴² (GAG) → Lys ³⁴² (GAA) Ekson II: Arg ¹⁰¹ (CGT) → His(CAT) utrata mostka elektrostatycznego akumulacja A1AT w hepatocytach | Faber J. P. i in., 1990 |
| S | Ekson III: Glu ²⁶⁴ (GAA) → Val ²⁶⁴ (GTA) utrata mostka elektrostatycznego pomiędzy Glu ²⁶⁴ a Lys ²⁹⁰ | Long G. L. i in., 1984 |
| M _{heerlen} | Ekson V: Pro ³⁶⁹ (CCC) → Leu ³⁶⁹ (CTC) Ekson III: Val ²¹³ (GTG) → Ala ²¹³ (GCG) zmiana struktury A1AT w regionach α -helisy, utrata stabilności białka — degradacja | Hofker M. H. i in., 1987 |
| M _{malton} | Ekson II: Phe ⁵¹ /Phe ⁵² (TTC) → delecja zakłócony proces fałdowania białka, skrócony region B 6, akumulacja w cytoplazmie hepatocytów | Fraizer G. C. i in., 1989 |
| M _{minerat springs} | Ekson II: Gly ⁶⁷ (GGG) → Glu ⁶⁷ (GAG) zakłócony proces fałdowania białka, utrata aktywności antyproteazowej | Curiel D. i in., 1990 |
| M _{procida} | Ekson II: Leu ⁴¹ (CTG) → Pro ⁴¹ (CCG) znieszczenie regionów α -helisy, degradacja A1AT | Takahaski H. i in., 1988 |
| M _{nichinan} | Ekson II: Phe ⁵² (TTC) → delecja Gly ¹⁴⁸ (GGG) → Arg ¹⁴⁸ (AGG) agregacja zmutowanej A1AT | Matsunaga E. i in., 1990 |
| I | Ekson II: Arg ³⁹ (CGC) → Cys ³⁹ (TGC) utrata mostka elektrostatycznego | Graham A. i in., 1989 |
| Null | | |
| granite falls | Ekson II: Tyr ¹⁶⁰ (TCA) → delecja → STOP ¹⁶⁰ (TAG) skrócenie łańcucha peptydowego | Nukiwa T. i in., 1987 |
| bellingham | Ekson II: Lys ²¹⁷ (AAG) → STOP ²¹⁷ (TAG) skrócenie łańcucha peptydowego | Sato K. i in., 1988 |
| cardiff | Ekson III: Asp ²⁵⁶ (GAT) → Val ²⁵⁶ (GTT) nieprawidłowy proces fałdowania białka | Graham A. i in., 1989 |
| newport | Ekson V: Glu ³⁴² (GAG) → Lys ³⁴² (GAA) Ekson II: Gly ¹¹⁵ (GGC) → Ser ¹¹⁵ (AGC) nieprawidłowy proces fałdowania białka | Graham A. i in., 1990 |
| mattawa | Ekson V: Leu ³⁵³ (TTA) → insercja T → Phe ³⁵³ (TTT) → STOP ³⁷⁶ (TAG) skrócony łańcuch peptydowy | Curiel D. i in., 1989 |
| hongkong | Ekson IV: Leu ³¹⁸ (CTC) → delecja → STOP ³³⁴ (TAA) skrócony łańcuch peptydowy, degradacja A1AT | Sifers R. N. i in., 1988 |

| | | |
|----------------------|---|--------------------------------|
| isola de procida | delecja ok. 7 kpz, w tym eksony: II-V brak ekspresji genu | Takahashi H. i in., 1990 |
| balton | Ekson V: Pro ³⁶² (CCC) → delecja → STOP ³⁷³ (TAA) skröcony łańcuch peptydowy | Fraizer G.C. i in., 1989 |
| Z _{wrexham} | Ekson V: Glu ³⁴² (GAG) → Lys ³⁴² (GAA) w sekwencji peptydu sygnalnego: Ser ⁻¹⁹ (TCG) → Leu(TTG) nieprawidłowy proces fałdowania białka | Graham A. i in., 1990 |

niszczenia hepatocytów przez zakumulowaną A1AT nie jest znany, podobnie jak nieznanne pozostają czynniki inicjujące proces chorobowy [50].

Niedobór A1AT uwarunkowany mutacjami wewnątrz genu alfa₁-antytrypsyny odgrywa także istotną rolę w patogenezie wielu innych chorób o niewyjaśnionej jeszcze etiologii np. reumatoidalnego zapalenia stawów, panniculitis, chorobie Alzheimera i in. [51-55].

Poznanie molekularnego podłoża polimorfizmu genu alfa₁-antytrypsyny stwarza przede wszystkim możliwość lepszego zrozumienia patogenezy chorób uwarunkowanych niedoborem A1AT. Rozwój precyzyjnej diagnostyki niedoboru A1AT opartej o analizę DNA może w przyszłości zaowocować opracowaniem metod terapii genowej dla poszczególnych wariantów A1AT [10, 56].

Podziękowania

Autorka pragnie serdecznie podziękować Panu Prof. dr habil. med. Antoniemu Horstowi za dyskusję i wiele cennych uwag w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 16 lutego 1993 r.
Zaakceptowano do druku 22 lipca 1993 r.

Piśmiennictwo

- Carrell RW (1986) *J Clin Invest* **78**: 1427-1431
- Putnam F (1975) W: The Plasma Proteins. Structure, function, and Genetic Control, Academic Press, London
- Bonney RJ, Smith RJ (1986) W: Advances in Inflammation Research, Otterness et al Raven Press, New York, **11**: 127-133
- Kraut J (1977) *Ann Rev Biochem* **46**: 331-358
- Stroud RM (1974) *Scientific American*, July: 74-88
- Travis J, Salvesen GS (1983) *Ann Rev Biochem* **53**: 655-709
- Perlmutter DH, Pierce JA (1989) *Am J Physiol* **257**: L147-L162
- Powers JC (1986) W: Advances in Inflammatory Research, Otterness et al. Raven Press, New York **11**: 145-157
- Koj A (1972) *Przeg Lekarski* **29** (7): 699-705
- Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG (1988) *Amer J Med* **84** (suppl. 6A): 13-31
- Carrell RW, Jeppsson JO, Laurell CB (1982) *Nature* (Lond) **298**: 329-334
- Loebermann H, Tokuoaka R, Deisenhofer J (1984) *J Mol Biol* **177**: 531-556
- Lai EC, Kao FT, Law ML (1983) *Am J Hum Genet* **35**: 385-392
- Leicht M, Long GL, Chandra T (1982) *Nature* (Lond) **297**: 655-659
- Kurachi K, Chandra T, Friezner Degen SJ (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78** (11): 6826-6830

- Long GL, Chandra T, Woo SLC (1984) *Biochemistry* **23** (21): 4828-4837
- Kelsey GD, Parkar M, Povey S (1988) *Ann Hum Genet* **52**: 151-160
- Mornex JF, Chytil-Weir A, Martinet (1986) *J Clin Invest* **77**: 1952-1961
- De Simone V, Ciliberto G, Hardon E (1987) *EMBO J* **6** (9): 2759-2766
- Perlino E, Cortese R, Ciliberto G (1987) *EMBO J* **6** (9): 2767-2771
- Crystal RG (1989) *Trends in Genetics* **5** (12): 411-417
- Graham A, Hayes K, Weidinger S (1990) *Hum Genet* **85**: 381-382
- Nukiwa T, Brantly ML, Ogushi F (1988) *Am J Hum Genet* **43**: 322-330
- Nukiwa T, Satoh K, Brantly M (1986) *J Biol Chem* **261** (34): 15989-15994
- Kidd VJ, Wallace RB, Ikutata K (1983) *Nature* (Lond) **304**: 230-234
- Faber JP, Weidinger S, Olek K (1990) *Am J Hum Genet* **46**: 1158-1162
- Fraizer GC, Harrold TR, Cox DW 1989 *Am J Hum Genet* **44**: 894-902
- Curriel DT, Stier LE, Crystal RG (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 47-56
- Matsunaga E, Shiokawa S, Nakamura H (1990) *Am J Hum Genet* **46**: 602-612
- Hofker MH, Nukiwa T, van Paassen HMB (1989) *Hum Genet* **81**: 264-268
- Takahashi H, Nukiwa T, Satoh K (1988) *J Biol Chem* **263** (30): 15528-15534
- Graham A, Kalsheker N, Newton CR (1989) *Hum Genet* **84**: 55-58
- Graham A, Kalsheker N, Bamforth FJ (1990) *Hum Genet* **85**: 537-540
- Curriel DT, Brantly M, Curriel E (1989) *J Clin Invest* **83**: 1144-1152
- Takahashi H, Crystal RG (1990) *Am J Hum Genet* **47**: 403-413
- Fraizer GC, Siewertsen M, Harrold TR (1989) *Hum Genet* **83**: 377-382
- Satoh K, Nukiwa T, Brantly (1988) *Am J Hum Genet* **42**: 77-83
- Nukiwa T, Takahashi H, Brantly M (1987) *J Biol Chem* **262**: 11999-12004
- Sifers RN, Brashears-Macettee S, Kidd VJ (1988) *J Biol Chem* **263** (15): 7330-7335
- Owen MC, Brennan SO, Lewis JH (1983) *New Eng J Med* **309** (12): 694-698
- Eriksson S (1989) *Chest* **95** (1): 181-189
- Klasen EC, Biemond I, Laros CD (1986) *Clin Genet* **29**: 211-215
- Wewers M (1989) *Chest* **95** (1): 190-195
- Bruce RM, Cohen BH, Diamond EL (1984) *Am Rev Respir Dis* **130**: 386-390
- Janoff A (1985) *Am Rev Respir Dis* **132**: 417-433
- Eriksson S, Carlson J, Velez R (1986) *New Eng J Med* **314**: 736-739
- Hodges JR, Millward-Sadler GH, Barbatis C (1981) *Eng J Med* **304** (10): 557-560
- Kishimoto Y, Yamada S, Hirayama Ch (1990) *Hum Genet* **84**: 132-136

49. Rosenthal Ph, Liebman WM, Thaler MM (1979) *Am J Dis Child* 133: 1195-1196
50. Schwarzenberg SJ, Sharp HL (1990) *J Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 10: 5-12
51. Walsh LJ, Cox DW (1984) *J Immunogenetics* 11: 115-120
52. Rabinovitz M, Gavalier JS, Kelly RH (1992) *Hepatology* 16 (1): 145-148
53. Gollin PA, Kalaria RN, Eikelenboom P (1992) *Neuroreport* 3 (2): 201-203
54. McCombe PA, Clark P, Frith JA (1985) *Ann Neurol* 18: 514-516
55. Baumgartner R, Trueb R, Bruckner L (1992) *Klin Monatsbl Augenheilkd* 200 (5): 529-531
56. Crystal RG (1992) *Am J Med* 92 (6A): 449-528

Artykuł jubileuszowy z okazji siedemdziesiątej piątej rocznicy utworzenia Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie

Transport białek przez błony biologiczne

Protein Transport across Biological Membranes

KATARZYNA NAŁĘCZ*

Spis treści:

- I. Sekrecja i transport białek do retikulum endoplazmatycznego
 - I-1. Sekwencje sygnałowe
 - I-2. Droga syntetyzowanego polipeptydu do błony endoplazmatycznego retikulum
 - I-3. Przejście polipeptydu przez błonę endoplazmatycznego retikulum
- II. Transport białek do jądra
 - II-1. Sekwencje kierujące do jądra
 - II-2. Miejsce przejścia białek do jądra
- III. Transport białek do mitochondriów
 - III-1. Przyporządkowanie białek odpowiednim przedziałom mitochondrialnym
 - III-2. Etapy transportu białek do mitochondriów
- IV. Sekrecja i transport białek u bakterii Gram(-).
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Secretion and transport of proteins into endoplasmic reticulum
 - I-1. Signal sequences
 - I-2. A path of synthesized polypeptide towards the membrane of endoplasmic reticulum
 - I-3. Polypeptide transfer across the endoplasmic reticulum membrane
- II. Protein transport into nucleus
 - II-1. Nuclear leading sequences
 - II-2. Localization of protein transport into nucleus
- III. Protein transport into mitochondria
 - III-1. Protein sorting into corresponding compartments of mitochondria
 - III-2. Steps of protein transport into mitochondria
- IV. Secretion and protein transport in Gram(-) bacteria
- V. Conclusions

Błony biologiczne tworzą w komórce przedziały charakteryzujące się obecnością odrębnych enzymów, co determinuje różnice w lokalizacji poszczególnych szlaków metabolicznych. Błony stanowią również granice utrzymujące gradienty metabolitów i jonów, w tym zwłaszcza H^+ . Granice te umożliwiają jednak komunikację między poszczególnymi przedziałami dzięki istnieniu specyficznych układów transportujących. Często białka spełniające podobne funkcje, jak np. transportujące wapń, czy hydrolizujące ATP, znajdują się w różnych błonach w komórce, a ich struktura pierwszorzędowa i charakterystyka funkcjonalna są różne. Ważną staje się więc odpowiedź na pytanie, jak to się dzieje, że białka powstające w cytoplazmie w procesie translacji są wbudowane do określonych błon lub przechodzą przez nie aby znaleźć się w innym

przedziale komórki, oraz jaki jest mechanizm wbudowania białka do dwuwarstwy fosfolipidowej. Przypuszczano, iż informacja określająca przyporządkowanie danego białka zawarta jest w kodującym je genie, a zatem w sekwencji aminokwasowej białka. Wykazanie tego wymagało jednak zastosowania współczesnych technik biologii molekularnej, umożliwiających otrzymanie białek z punktowo zmienionym pojedynczym aminokwasem, z usuniętą częścią sekwencji, a także syntezę *in vitro* fragmentów zawierających połączone części różnych polipeptydów.

I. Sekrecja i transport białek do retikulum endoplazmatycznego

I-1. Sekwencje sygnałowe

Badania translacji *in vitro* m-RNA wielu białek prokariotycznych i eukariotycznych podlegających sekrecji wykazały, że powstające białko jest większe od

* dr hab., Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ostatecznego produktu o ok. 20 aminokwasów [1-5]. Ten dodatkowy odcinek znajdujący się na N-końcu powstającego polipeptydu, kieruje białko do błony retikulum endoplazmatycznego, stąd nazwa „sekwencja sygnałowa” wprowadzona przez Blobel [1]. Jeszcze w trakcie zachodzącej translacji ten N-końcowy fragment zostaje usunięty dzięki działaniu specyficznej proteazy o budowie oligomerycznej [6]. Dodatkowe sekwencje w różnych białkach przenoszonych przez ten sam rodzaj błony nie są identyczne, stopień homologii między nimi jest niski. N-koniec takich presekwencji jest bardzo zróżnicowany pod względem długości i składu aminokwasowego, zawsze jednak nosi średni ładunek o wartości +1,7, a w swojej środkowej części zawiera co najmniej 9 hydrofobowych aminokwasów [7]. Wykres funkcji średniej hydrofobowości aminokwasów w sekwencji sygnałowej zarówno w przypadku białek pro- jak i eukariotycznych ma podobny przebieg. Długość odcinka hydrofobowego wskazuje, iż teoretycznie może on przejść przez błonę w postaci α -helisy, lub w postaci rozwiniętej albo nawet w formie mieszanej [7]. Badania efektu zwiększenia hydrofobowości N-końca ludzkiego lizozymu na jego sekrecję wykazały, iż większa zawartość struktury α -helikalnej znajduje się w sekwencjach niefunkcjonalnych. Ta obserwacja może sugerować, iż przynajmniej bliżej C-końca presekwencji polipeptyd powinien być rozwinięty, aby mógł oddziaływać z peptydazą [8]. Okazało się, że zmodyfikowanie metodami inżynierii genetycznej białka błonowego (jakim jest np. receptor asjaloglikoproteinowy H1) — w taki sposób, iż hydrofobowy fragment sekwencji sygnałowej został powielony dwu- trzy- lub czterokrotnie — powoduje, że pierwsza hydrofobowa sekwencja jest sygnałem inicjującym translokację polipeptydu, druga natomiast stanowi sygnał stop. Podobnie, trzecia hydrofobowa sekwencja stanowi sygnał do drugiej translokacji, podczas gdy czwarta — kolejny sygnał zatrzymujący dalsze przechodzenie polipeptydu przez błonę. Wykorzystanie do badań nad wbudowaniem do błony cząsteczek tego białka ze zwielokrotnionymi sekwencjami hydrofobowymi, wykazało, iż sygnałem wejścia fragmentu polipeptydu do błony jest pierwszy, licząc od N-końca, hydrofobowy fragment, nawet jeśli oryginalna sekwencja sygnałowa uległa delecji [9].

I-2. Droga syntezowanego polipeptydu do błony endoplazmatycznego retikulum

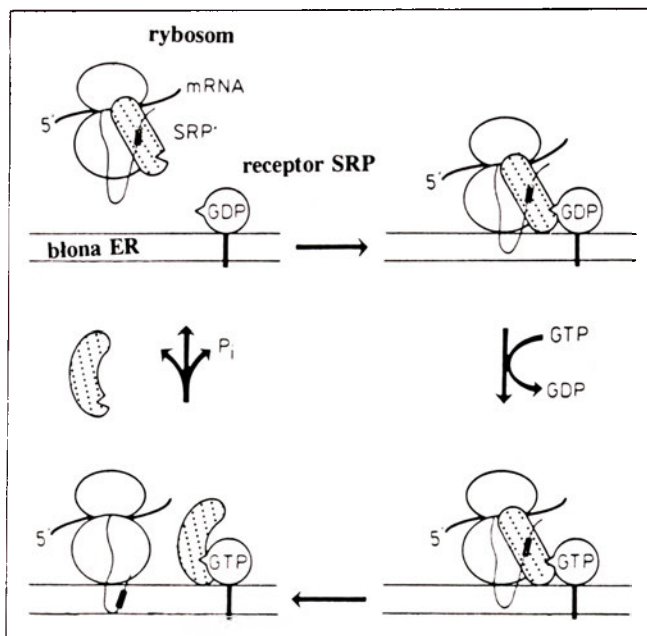
Synteza białka zaczyna się na wolnych polisomach w cytoplazmie. W trakcie tego procesu, gdy polipeptyd mający ulec sekrecji lub wbudowaniu do błony znajduje się jeszcze *in statu nascendi*, rybosomy wiążą się z błoną. Aby mogło dojść do wbudowania białka do błony endoplazmatycznego retikulum, syntezowany polipeptyd musi osiągnąć długość około 60-70 aminokwasów. Sekwencja sygnałowa znajduje się wtedy już

poza domeną sekrecyjną dużej podjednostki rybosomu, co oznacza, iż około 40 aminokwasów znajduje się jeszcze w tunelu rybosomalnym [10]. Ponieważ pierwsze 100 aminokwasów jest jakby osłonięte przed działaniem proteaz [11], poszukiwano białek wiążących się z sekwencją sygnałową. Izolowano kompleks białek wiążący się z sekwencją sygnałową (ang. SRP — *signal recognition particle*), w którego składzie znajduje się 6 polipeptydów (9, 14, 19, 54, 68 i 72 kDa) oraz 7S RNA [12]. Użycie światłoczułych pochodnych azydkowych pozwala na wytworzenie wiązania kowalencyjnego po naświetleniu. Technika tę wykorzystano stosując N^p-azydobenzoilo-lizylo-tRNA do syntezy sekwencji sygnałowej. Peptyd ze zmodyfikowaną lizyną po naświetleniu przyłączył się kowalencyjnie do białka o względnej masie cząsteczkowej 54 kDa, wchodzącego w skład kompleksu wiążącego sekwencję sygnałową [13]. Podobnie przeprowadzono w obecności azydkowej pochodnej lizylo-tRNA translację pierwszych 70 aminokwasów preprolaktyny, a więc fragmentu dłuższego od sekwencji sygnałowej tego białka. Po naświetleniu utworzony peptyd wiązał się z glikoproteiną o względnej masie cząsteczkowej 34 kDa zlokalizowaną w błonie mikrosomalnej [14]. Białko to nazwane białkiem cumującym (ang. *docking protein*) stanowi podjednostkę α receptora cytoplazmatycznego kompleksu wiążącego sekwencję sygnałową. Wydaje się ponadto, że interakcja powstającego peptydu z błoną zostaje dodatkowo wzmocniona poprzez oddziaływanie rybosomu z jego receptorem, białkiem, którego istnienie stwierdzono poprzez krzyżowe sieciowanie z rybosomami i które okazało się mieć względną masę cząsteczkową 180 kDa, w tym dużą (160 kDa) domenę cytosolową [15]. Wykazano, że wzajemne oddziaływanie wymienionych powyżej białek musi być stosunkowo silne, ponieważ uwolnienie kompleksu wiążącego sekwencję sygnałową wymaga energii dostarczanej przez hydrolizę GTP [16]. Dojście powstającego polipeptydu do błony endoplazmatycznego retikulum przedstawione jest schematycznie na rycinie 1 (wg [17]).

I-3. Przejście polipeptydu przez błonę endoplazmatycznego retikulum

Zidentyfikowanie poszczególnych białek (kompleksu rozpoznającego sekwencję sygnałową, białka cumującego i receptora rybosomu) uczestniczących w procesie doprowadzania powstającego polipeptydu do błony endoplazmatycznego retikulum nie wyjaśnia jednak mechanizmu przejścia polipeptydu przez błonę.

Część badaczy, a w szczególności grupa de Kruijffa, uznaje iż wystarczy hydrofobowy charakter sekwencji sygnałowej do oddziaływań z lipidami i przeciągnięcia reszty polipeptydu. Dzięki pomiarom dichroizmu kołowego określono w układach *in vitro* strukturę presekwencji faga λ i wykazano, iż w monowarstwach fosfolipidowych polipeptyd ten przyjmuje



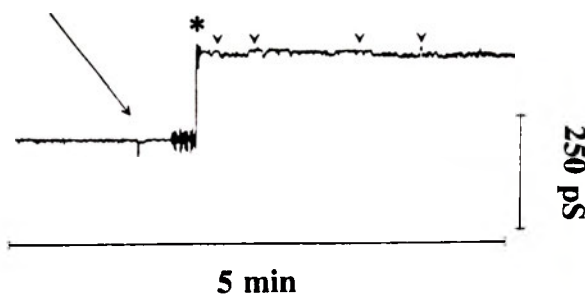
Ryc. 1. Rozpoczęcie translokacji białka. Schemat pokazuje pierwsze etapy translokacji białka przez błonę retikulum endoplazmatycznego (ER), gdy sekwencja sygnałowa (z zaznaczoną grubiej częścią hydrofobową) znalazła się poza rybosomem i została związana z kompleksem rozpoznającym tę sekwencję (SRP), zakropkowanym na schemacie (wg Rapoporta [17], za zgodą autora i wydawnictwa).

formę β -zgięcia, podczas gdy w dwuwarstwie — α -helisy [18]. Obserwacja taka, dowodząca możliwości zmiany konformacji w sekwencji sygnałowej, sugeruje, iż N-koniec powstającego białka może występować w formie rozwiniętej na powierzchni błony, oddziałując swoim dodatnim ładunkiem z jej ujemnie naładowaną powierzchnią. Hydrofobowy odcinek sekwencji sygnałowej mógłby następnie przyjąć strukturę α -helisy i wskutek oddziaływań hydrofobowych wniknąć do dwuwarstwy lipidowej. Pomiar magnetycznego rezonansu jądrowego ^{31}P wykazały, iż peptyd białka PhoE z *Escherichia coli* zmienia konformację czystych fosfolipidów. Zwiększenie stężenia tego polipeptydu w układzie *in vitro* zawierającym błonę utworzoną przez dioleilofosfatydyloetanolaminę i dioleilofosfatydyloglicerol, powodowało pojawienie się innych, niż dwuwarstwa, struktur lipidowych, w szczególności struktury heksagonalnej, której udział postulowany jest także w przypadku transportu związków niskocząsteczkowych [19].

Zarówno twórca teorii sygnałowej — Blobel, jak i współtwórca modelu mozaikowej budowy błony biologicznej — Singer, sugerowali od lat udział białek w procesie przenoszenia polipeptydu przez błonę [1, 20-22]. Według ich hipotezy białka transportujące polipeptydy powinny składać się z kilku podjednostek, a wiązanie hydrofobowej sekwencji sygnałowej miało by odbywać się na granicy 2 podjednostek po ich rozsunięciu i utworzeniu kanału przewodzącego dalszą część transportowanego polipeptydu [21, 22]. Ta czysta spekulacja znalazła ostatnio potwierdzenie w wynikach doświadczalnych wykazujących obecność

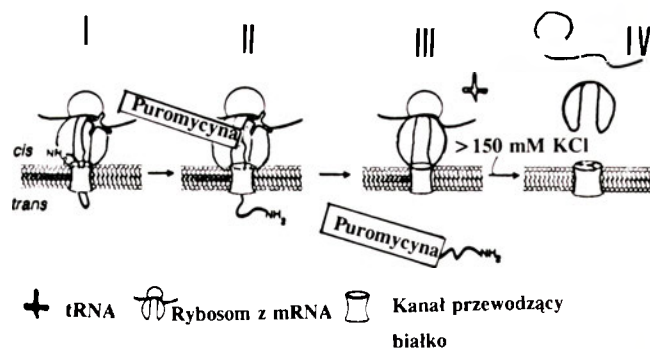
w endoplazmatycznym retikulum kanału „przewodzącego” białko. W układzie odtwarzającym transport polipeptydu przez błonę mikrosomalną doprowadzono do związania rybosomu z będącym *in statu nascendi* peptydem po jednej stronie błony lipidowej w układzie do pomiaru przewodnictwa. Dodanie puromycyny przy niskiej sile jonowej powoduje uwolnienie peptydu, rybosom nadal jednak związany jest z błoną. W takim układzie Simon i Blobel zmierzili przewodnictwo potasu o wartości 220 pS (Ryc. 2).

Dodanie 0.3 μM puromycyny



Ryc. 2. Pojedynczy kanał ujawniający się w obecności puromycyny. Szorstkie mikrosomy poddano fuzji z dwuwarstwą lipidową w aparacie do tworzenia czarnych błon. Po pierwszym otwarciu kanału o przewodnictwie 220 pS (zaznaczonym gwiazdką) usunięto puromycynę metodą perfuzji. Małe kanały chlorkowe zaznaczone są strzałkami (wg Simona i Blobela [23], za zgodą autorów i wydawnictwa).

Właściwość ta charakterystyczna dla kanałów występujących w błonach biologicznych — zanika po oddysocjowaniu rybosomów. Wydaje się więc, iż otwarcie kanału jest wywołane przez związanie rybosomu zawierającego syntezowany polipeptyd, a usunięcie przenieszonego polipeptydu pozostawia kanał w formie otwartej [23]. Przedstawiono to na rycinie 3. Niestety białko, które mogło by spełniać rolę takiego



Ryc. 3. Proponowany schemat działania kanału przewodzącego białko ujawniającego się w obecności puromycyny. Jony nie są w stanie przechodzić swobodnie przez kanał, gdy translokacji ulega powstający polipeptyd (I). Puromycyna zostaje przez rybosomalną peptydylotransferazę włączona do C-końca powstającego polipeptydu (II), a następnie peptydylo-puromycyna zostaje uwolniona z rybosomu i przeniesiona przez dwuwarstwę lipidową (III). To otwiera kanał przewodzący białko i zezwala na swobodny przepływ jonów. Zwiększenie siły jonowej uwalnia rybosom z błony, powodując zamknięcie kanału (IV), (wg Simona i Blobela [23], za zgodą autorów i wydawnictwa).

kanalu nie zostało dotąd zidentyfikowane.

Przejście polipeptydu do przestrzeni luminarnej endoplazmatycznego retikulum rozpoczyna kolejny etap przenoszenia białek, zachodzący dzięki ruchowi pęcherzyków błonowych (ang. *vesicular traffic*). W procesie tym białka zawarte w pęcherzykach przeniesione są dzięki odpączkowywaniu tych ostatnich i ich fuzji z aparatem Golgiego. Kolejne procesy oddzielenia pęcherzyków Golgiego, a następnie ich fuzji z innymi błonami powodują ostateczne dotarcie białka do innego przedziału komórkowego lub egzocytozę. Najwięcej danych dotyczących ruchu pęcherzyków zgromadzono w wyniku badań na drożdżach, a także nad sekrecją neuroprzebieżników w układzie nerwowym. W badaniach nad transportem pęcherzyków u drożdży opisano szereg genów *sec*, których produkty są białkami odpowiedzialnymi za odpączkowanie pęcherzyków i ich zakotwiczenie przy docelowej błonie [24-26]. W przypadku badań nad sekrecją neuroprzebieżników poznano białka, które nie tylko spełniają rolę receptorów dla docierających do błony pęcherzyków, ale także stwierdzono udział cytoplazmatycznych białek rozpuszczalnych ułatwiających dotarcie pęcherzyków przez hydrofilowe środowisko do błony docelowej [27, 28].

II. Transport białek do jądra

II-1. Sekwencje kierujące do jądra

Już wiele lat temu zaobserwowano, iż po wstrzyknięciu albuminy bydlęcej i histonów do oocytów *Xenopus*, tylko histony gromadziły się w jądrze, co doprowadziło do koncepcji pobierania selektywnego [29]. Stwierdzono, iż wiele białek regulujących transkrypcję genów znajduje się w cytoplazmie w postaci niefunkcjonalnej i wchodzi do jądra dopiero po uczynieniu bądź przez związanie ligandu (receptor hormonów sterydowych), bądź przez fosforylację albo samego czynnika transkrypcyjnego, albo białka zakotwiczonego go w cytoplazmie [30].

Zainteresowanie mechanizmem wchodzenia białek do jądra oraz wiedza na temat sekwencji sygnałowej w białkach przechodzących przez błonę endoplazmatycznego retikulum spowodowały poszukiwanie takiej sekwencji w budowie samych białek.

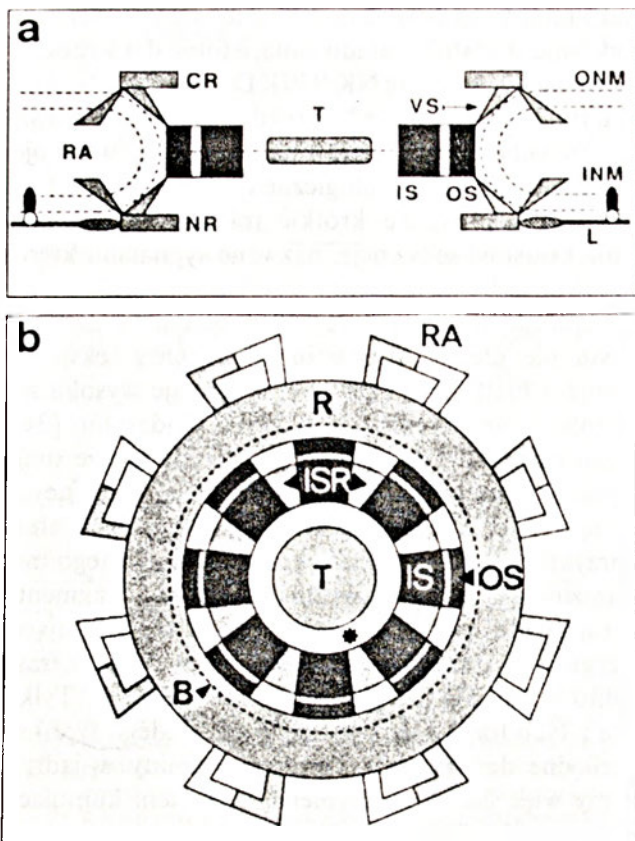
W przypadku białek wchodzących do jądra nie zaobserwowano dodatkowych, ulegających odcięciu fragmentów na N-końcu. Próby delekcji fragmentów sekwencji białek jądrowych, jak również zamiana drogą mutacji pojedynczych aminokwasów pozwoliły na ustalenie, iż w antygenie T wirusa SV40 fragment PPKK¹²⁸KRKV jest istotny dla wprowadzenia tego białka do jądra. Syntetyczny peptyd o tej sekwencji połączony z białkami niejądroowymi, jak kinaza pirogronianu, albumina bydlęca, czy immunoglobulina G, powoduje ich akumulację w jądrze [31-34]. Zamiana lizyny odpowiadającej lizynie w pozycji 128 na jakikol-

wiek aminokwas powoduje utratę tej właściwości [35]. Podobnie, dodatkowo naładowaną, istotną dla wchodzenia do jądra sekwencję NK³IPIKD znaleziono w czynniku transkrypcyjnym $\alpha 2$ z drożdży [36]. Okazało się, że przebadane białka jądrowe zawierają w swojej sekwencji odcinki homologiczne wobec jednego z tych dwu fragmentów. Te krótkie (nie więcej niż 8-10 aminokwasów) sekwencje, nazwane sygnałami kierującymi do jądra (ang. *nuclear localization signal*), mogą występować w różnych rejonach białka, w związku z tym nie ulegają usunięciu. Fragmenty sekwencji kierujące białko do jądra charakteryzuje wysoka zawartość aminokwasów o ładunku dodatnim [34], często są połączone z proliną i wydaje się, że mają wspólną strukturę KXXK/R. Sekwencji kierujących do jądra może być więcej w tym samym białku, a przykładem niezwykle skomplikowania tego mechanizmu jest nukleoplazmina mająca 4 fragmenty kierujące do jądra, dwa typu sekwencji kierującej antygeny T, a dwa podobne do odpowiedniego fragmentu w czynniku transkrypcyjnym $\alpha 2$ [37]. Tylko dwa z tych fragmentów (po jednym każdego typu) są niezbędne do akumulacji nukleoplazminy w jądrze, mamy więc jakby do czynienia z efektem kumulacji sygnałów [34, 38].

II-2. Miejsce przejścia białek do jądra

Badania nad wchodzeniem białek do jądra wskazywały, iż jest to proces zależny od temperatury, jak również ulegający wysyceniu, co mogło wskazywać na udział receptorów. Użycie znakowanych przeciwciał skierowanych przeciwko transportowanym białkom, wskazywało, iż białka przechodzą przez pory jądrowe [33, 34]. Podana radioaktywna aglutynina z zarodków pszenicy — substancja znana ze swojego efektu, jakim jest zahamowanie akumulacji białek jądrowych — także gromadzi się w porach jądrowych [39]. Ponieważ sekwencja kierująca do jądra jest dodatkowo naładowana, spodziewano się, iż białko receptorowe powinno mieć odpowiednio naładowany fragment silnie ujemny. Przeciwciała przeciwko takiemu kwaśnemu, sztucznie zsyntetyzowanemu peptydowi również akumulowały się w porach jądrowych [40]. Obserwacje te mogą sugerować, że receptory białek wchodzących do jądra zlokalizowane są w porach jądrowych, przenikających podwójną błonę otoczki jądrowej.

Pory jądrowe są strukturami o niezwykle skomplikowanej budowie. Białka, których jest co najmniej 500, wchodzące w skład porów tworzą dwa pierścienie, cytosolowy i jądrowy, połączone ze sobą strukturami przypominającymi szprychy. W ich środkowej części znajduje się struktura białkowa umożliwiająca jakby zaczopowanie kanału takiego kompleksu białkowego [41-43]. Model poru jądrowego przedstawiono na rycinie 4, wg [43]. Pory jądrowe są strukturami dynamicznymi. Swobodnie przepuszczają bowiem makrocząsteczki o średnicy 90 Å, jednak przechodzi przez



Ryc. 4. Model kompleksu poru jądrowego, bez szczegółów centralnego transportera, opracowany na podstawie analizy cienkich skrawków. (a) Model kompleksu poru jądrowego ekstrahowanego detergentem, w rzucie poprzecznym. Zaznaczono najważniejsze domeny strukturalne, szprychy wewnętrzne (IS), szprychy zewnętrzne (OS), podpórki pionowe (VS), pierścienie cyto- i karioplazmatyczny (CR i NR), odgałęzienia radialne (RA). Dokładne miejsce przyłączenia tych odgałęzień nie jest znane. Struktura o słabej gęstości, odpowiadająca centralnemu transporterowi jest oznaczona T, a lamina jako L. (b) Model kompleksu poru jądrowego pokazany w rzucie pionowym. Oznaczenia jak w części (a). Gwiazdka wskazuje miejsce, przez które mogłaby zachodzić bierna dyfuzja małych jonów. Dokładna budowa centralnego transportera T nie jest znana, dlatego nie pokazano centralnego poru (wg Akeya [43], za zgodą autora i wydawnictwa).

nie nukleoplazmina z koloidalnym złotem, a więc cząsteczka o średnicy 240 Å. Wydaje się zresztą, iż taka cząsteczka wiąże się najpierw z obrzeżem poru, tak jakby była przycumowana, a dopiero potem można stwierdzić jej obecność w środkowej części poru [44]. W procesie przenoszenia białek najprawdopodobniej uczestniczą tzw. nukleoporyny, białka o względnej masie cząsteczkowej 45, 54, 58, 62, 100, 145, 180, 210 i 270 kDa [45]. Wszystkie one połączone są przez -O-N- z acetyloglukozoaminą. Białka 62 i 180 kDa reagują z radioaktywną aglutyniną hamującą transport białek do jąder, a polipeptydy 54, 58 i 62 kDa można współstrącić przeciwciałami przeciw jednemu z nich i takie przeciwciała również zapobiegają akumulacji białek w jądrze [46]. Ponadto stwierdzono obecność w porach jądrowych białka o względnej masie cząsteczkowej 188 kDa, zdolnego do reakcji krzyżowej z przeciwciałami reagującymi z ciężkim łańcuchem miozyny i wykazującego aktywność ATPazy [47].

Ponieważ wiązanie białek z błoną jądrową nie wymaga energii, ich akumulacja natomiast jej wymaga, zachodzi bowiem w obecności ATP (jest znoszona przez apyrazę lub azydek + dezoksyglukozę) [48, 49], obecność hydrolizującego ATP białka podobnego do kurczliwej miozyny wywołała spekulacje na temat zmiany średnicy porów jądrowych poprzez kurczenie się lub rozciąganie.

Wydaje się, że, oprócz białek w porach jądrowych, także w cytosolu występują czynniki białkowe niezbędne do odtworzenia transportu białek do jąder *in vitro*. Ponadto, zarówno w cyto- jak i w nukleoplazmie wykazano obecność wielu polipeptydów zdolnych do wiązania sekwencji sygnałów kierujących do jądra [43, 44]. Nie jest jednak jasne, czy wszystkie te białka mogą brać udział w transporcie lub doprowadzaniu białek do jądra, być może część z nich odpowiada za zatrzymanie (zakotwiczenie) białek w cytoplazmie, zanim po uruchomieniu odpowiedniego sygnału będą one przetransportowane do jądra.

III. Transport białek do mitochondriów

III-1. Przyporządkowanie białek odpowiednim przedziałom mitochondrialnym

Mitochondria, jako organelle komórkowe oddzielone podwójną błoną zawierają 4 przedziały, jeśli chodzi o lokalizację białek — są to błony zewnętrzna i wewnętrzna oraz przestrzeń międzybłonowa i matriks. W przeciwieństwie do białek przechodzących przez błonę endoplazmatycznego retikulum, większość białek mitochondrialnych jest transportowanych do mitochondriów po ukończeniu ich syntezy. Wiele białek mitochondrialnych syntezowanych jest w postaci dłuższej, niż ich forma dojrzała, zawierając odcinaną później presekwencję w N-końcu. Ten odszczepiony proteolitycznie fragment może mieć różną długość, często zdarzają się odcinki dłuższe, niż 20 aminokwasów, jak to ma miejsce w przypadku białek kierowanych do endoplazmatycznego retikulum [50, 51]. Silnie hydrofobowe białko błonowe, jakim jest proteolipid ATPazy mitochondrialnej u *Neurospora crassa* zawiera presekwencję nawet z 66 reszt aminokwasowych [52]. Ponieważ transport tego białka do mitochondriów zachodzi po procesie translacji, wydaje się, iż taka długa presekwencja może osłaniać część hydrofobową i ułatwiać przejście tego białka przez hydrofilowe środowisko, jakim jest cytoplazma [50, 53]. Zarówno w przypadku proteolipidu, jak i innych usuwanych presekwencji kierujących do mitochondriów, fragment N-końcowy zawiera dużo ładunków dodatnich, nie zawiera zaś aminokwasów hydrofobowych. Po sekwencji kierującej do mitochondriów następuje zazwyczaj fragment istotny dla rozpoznania przez proteazę, a po nim fragment sekwencji przyporządkowujący białko do konkretnego przedziału mitochondrialnego. I tak w białku o masie 70 000 z zewnęt-

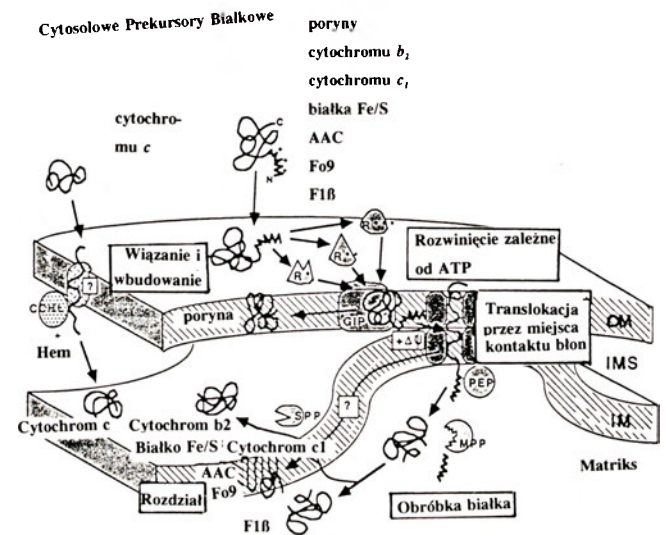
rznej błony mitochondriów drożdży, po krótkiej sekwencji kierującej do mitochondriów, znajduje się ponad dwudziestoaminokwasowy silnie hydrofobowy fragment. Usunięcie dwu aminokwasów z tego odcinka sekwencji wystarczyło, aby białko to znalazło się w matriks mitochondriów [53]. Dlatego dodatnio naładowane sekwencje kierujące nazywa się sekwencjami kierującymi do matriks (ang. *matrix-targeting sequences*). W białkach matriks i wewnętrznej błony mitochondrialnej dodatnio naładowane fragmenty kierujące zostają odcięte przez dwupodjednostkową metaloproteazę znajdującą się w matriks, kodowaną przez jądrowe geny *Mas1* i *Mas2* [54].

W przypadku wielu białek wewnętrznej błony i przestrzeni międzybłonowej pierwsza proteoliza nie doprowadza do formy dojrzałej białka, następuje druga proteoliza katalizowana przez nieznaną proteazę zlokalizowaną po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej. A szereg białek zewnętrznej błony mitochondrialnej zawiera dodatkowo naładowany N-koniec, który w ogóle nie ulega usunięciu (poryna, białko 70 kDa) [53]. Szczególnym przypadkiem jest cytochrom *c*, którego ostateczną lokalizacją jest wewnętrzna strona wewnętrznej błony. Nie jest on jednak przeprowadzony pośrednio przez matriks, lecz wchodzi jako apocytochrom. Najprawdopodobniej oddziaływanie apocytochromu z łaźą i przyłączenie do hemu powoduje jego bezpośrednie wejście do przestrzeni międzybłonowej, uważa się bowiem, iż łaźa związana jest z błoną zewnętrzną mitochondriów, po jej wewnętrznej stronie [55].

Stwierdzono także, że w niektórych białkach mitochondrialnych informacja dotycząca wbudowania do błony zawarta jest w innych niż N-koniec regionach cząsteczek. I tak np. informacja dotycząca wbudowania poryny do zewnętrznej błony mitochondrialnej znajduje się w części C-terminalnej tego białka, ponieważ poryna z usuniętymi aminokwasami 222-283 nie ulegała wbudowaniu [56]. Z kolei, aby została wbudowana do błony wewnętrznej translokaza nukleotydów adenylowych, konieczna jest obecność aż 111 pierwszych aminokwasów tego nośnika [57]. Ponieważ w białku tym, podobnie jak w białku rozprężającym, czy nośniku α -ketoglutaranu, występują trzykrotnie powtórzone homologiczne względem siebie sekwencje [58], wydaje się, że sygnał odpowiedzialny za skierowanie do matriks ulega także zwielokrotnieniu i znajduje się w środku sekwencji, tak jak ma to miejsce w białkach wchodzących do jądra. Wyjątek stanowi jedynie nośnik fosforanowy, białko homologiczne do wymienionych powyżej nośników, ale zawierające uszaną presekwencję w swoim N-końcu [59, 60].

Przyłączenie białek do mitochondriów nie wymaga energii, natomiast niezbędny jest wkład energii — i to zarówno w postaci trójfosforanów nukleotydów, jak i potencjału transmembranowego — przy wbudowaniu białek wymagających etapu przejścia przez matriks [61]. Przykłady dróg i mechanizmów wchodzenia

białek do mitochondriów przedstawione są na rycinie 5 [62]. Wejście cytochromu *c* nie wymaga energii, lecz tylko kowalencyjnego związania hemu przez łaźę do apocytochromu *c*. Utworzone sztucznie białko, które powstało w wyniku fuzji sekwencji kierującej do matriks cytochrom *c*, z sekwencją N-końcową cytochromu *c*, akumuluje się w przestrzeni międzybłonowej w nieobecności potencjału błonowego, w jego zaś obecności białko to przechodzi do matriks. Wydaje się więc, iż sekwencja kierująca zawiera także informację dotyczącą mechanizmu przejścia przez błonę, w szczególności zapotrzebowania energetycznego [63].



Ryc. 5. Schemat możliwych dróg importu do mitochondriów prekursorów białek. Znajdujące się w cytosolu prekursor białek mitochondrialnych są specyficznym rozpoznawane przez różne receptory (R*, R**, R***) na powierzchni mitochondriów. Etap ten może być poprzedzony przez niespecyficzne oddziaływanie z lipidami błony zewnętrznej (OM). Z miejsc receptorowych prekursor są przenoszone na białko GIP, pośredniczące we wbudowaniu prekursorów do błony zewnętrznej. Zależny od ATP enzym cytosolowy jest przyłączany do zewnętrznej strony mitochondriów i zapewnia osiągnięcie przez prekursor właściwie rozwiniętej konformacji. Następnie drogi wbudowania białek różnicują się, białka albo wbudowane są do błony zewnętrznej (poryna), albo do miejsc kontaktu międzybłonową zewnętrzną (OM) i wewnętrzną (IM). Wbudowanie do błony wewnętrznej wymaga potencjału transmembranowego ($\Delta\psi$). Dwa białka (MPP i PEP) współdziałają aby odszczepić N-końcową sekwencję kierującą. Prekursory, których ostateczną lokalizacją jest przestrzeń międzybłonowa (IMS) lub błona wewnętrzna (IM) ulegają ponownej translokacji przez błonę wewnętrzną, a niektóre z nich drugiej proteolizie przez enzym w przestrzeni międzybłonowej (SPP). Grupy prostetyczne (Fe-S, hem) dodane są w matriks lub przestrzeni międzybłonowej. Droga wbudowana cytochromu *c* wydaje się zachodzić poprzez bezpośrednią translokację przez dwuwarstwę lipidową. Prekursor wiąże się ściśle z łaźą cytochrom *c*: hem (CCHL) i po związaniu hemu zostaje uwolniony do przestrzeni międzybłonowej (wg P f a n n e r a i w s p. [62], za zgodą autorów).

III-2. Etapy transportu białek do mitochondriów

Białka transportowane są do mitochondriów po translacji polipeptydów i muszą znajdować się w pewnej rozwiniętej konformacji. Utworzenie mostków

dwusiarczkowych [64], czy uzyskanie pewnej trwałej konformacji po związaniu ligandu (reduktaza dwuhydrofolianowa z metotreksatem [65]) powoduje zahamowanie transportu. Podobny efekt uzyskano przez nadmierne rozwinięcie polipeptydu w obecności mocznika [66]. Okazało się, że do odtworzenia procesu transportu *in vitro* potrzebne są cytosolowe białka wrażliwe na N-etylomaleimid, utrzymanie właściwie rozwiniętej konformacji możliwe jest także dzięki oddziaływaniom z białkami szoku cieplnego (produktami genów *hsp70*, czy *ssc1p* u drożdży), po czym proces zmiany konformacji wymaga udziału ATP [67]. Przeciwciała przeciwko białkom szoku cieplnego wytrącają prekursor transportowanych białek w miejscach kontaktu między dwiema błonami [68].

Podobnie jak w przypadku przechodzenia przez błony endoplazmatycznego retikulum, tak i jeśli chodzi o mitochondria, ścierają się dwie koncepcje mechanizmu przechodzenia białek, tym razem przez obie błony [69, 70]. Wydaje się, że po zewnętrznej stronie zewnętrznej błony występują białkowe receptory. Zaobserwowano współzawodnictwo o miejsca wiążące, na przykład przeciwciała antyporynowe hamują nie tylko import poryny, ale również kilku białek wewnętrznej błony mitochondrialnej, nie hamują natomiast wchodzenia cytochromu *c* [70], który jak się zdaje przechodzi jako apocytochrom bezpośrednio przez dwuwarstwę lipidową [55]. Próby identyfikacji receptorów transportowanych białek skoncentrowały się na dwóch technikach — immunologicznej i sieciowania. Grupa Neupert'a wyizolowała wszystkie białka zewnętrznej błony mitochondrialnej, otrzymała skierowane przeciw nim przeciwciała i badała kolejno wpływ tych przeciwciał na transport białek. Okazało się, iż przeciwciała przeciw białku o względnej masie cząsteczkowej 19 kDa hamują transport niektórych, aczkolwiek nie wszystkich badanych białek [71]. Próbowano także zidentyfikować receptory przez sieciowanie z syntetycznym peptydem sygnałowym kierującym do matriks lub stosując chromatografię powinowactwa z takim peptydem. W ten sposób oczyszczono polipeptydy o względnych masach cząsteczkowych 29, 30 i 42 kDa [72-74] mające zdolność wiązania sekwencji kierującej do matriks.

Uważa się, iż układy transportujące zewnętrznej błony mitochondrialnej (poryna) i wewnętrznej (nośniki) oddziałują ze sobą w miejscach kontaktu między błonami. Okazało się, że w zewnętrznej błonie znajduje się wrażliwy na trypsynę kanał o przewodnictwie 220 pS, którego aktywność hamowana jest przez N-końcowy fragment podjednostki IV oksydazy cytochromu *c* [75]. Funkcją tego kanału mogło być przenoszenie transportowanych polipeptydów.

Doprowadzenie białka do mitochondriów, przejście przez błonę lub obie błony, jedno- lub dwustopniowe odszczepienie proteolityczne i wreszcie pozostanie polipeptydu w odpowiednim przedziale mitochondrialnym nie daje jeszcze formy ostatecznej tego białka.

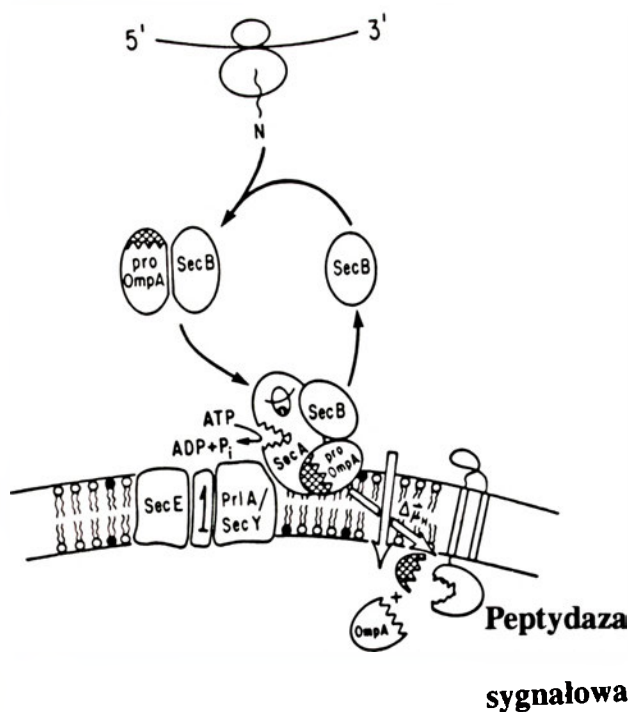
Konieczne jest nie tylko uzyskanie właściwej konformacji, ale także często osiągnięcie struktury oligomerycznej. W tym procesie uczestniczą tzw. białka opiekuńcze, czy towarzyszące (ang. *chaperons*, *chaperonins*) — białka szoku cieplnego o względnej masie cząsteczkowej 60 kDa (HSP60). Białka te, kodowane przez DNA jądrowy, występują w matriks i nie tylko potrzebne są do właściwego zwinienia białka kosztem hydrolizowanego ATP [76, 77], ale łączą także takie kompleksy występujące w wewnętrznej błonie, jak np. oksydaza cytochromu *c*, której 3 największe podjednostki kodowane są przez mitochondrialny DNA, a pozostałe przez DNA jądrowy i proces ich translacji zachodzi w cytozolu [78].

Na podkreślenie zasługuje fakt, że większość opisanych badań to doświadczenia prowadzone *in vitro*. Wydaje się, iż niektóre białka, jak np. podjednostka β ATPazy mitochondrialnej drożdży, mogą być wbudowane do mitochondriów *in vivo* w trakcie swojej syntezy [79], a więc możliwość transportu zachodzącego równoległe a translacją nie jest całkowicie wykluczona.

IV. Sekrecja i transport białek u bakterii Gram (-)

Ściana komórkowa bakterii Gram ujemnych składa się z dwu błon, wewnętrznej i zewnętrznej przedzielonych periplazmą z występującym w niej peptydoglikanem [80]. W obu błonach występują białka, białka również ulegają sekrecji. Jak opisano w części I-1, białka prokariotyczne charakteryzują się występowaniem presekwencji na N-końcu i ten odcinek polipeptydu ulega następnie proteolitycznemu odszczepieniu. Proces transportu i sekrecji białek u bakterii Gram(-) może zachodzić podczas translacji lub po niej [81]. I tak w genomie *Escherichia coli* znaleziono gen *ffh*, którego produkt jest homologiczny wobec podjednostki o masie 54,000 z kompleksu wiążącego sekwencję sygnałową u eukariontów, oraz gen *ffs*, kodujący 4,5S RNA zawierający domeny konserwatywne w stosunku do 7S RNA z tego samego kompleksu [82]. Badania nad sekrecją prowadzone na mutantach lub szczepach, w których pewne geny uległy delecji pozwoliło na stwierdzenie udziału białek opiekuńczych (*chaperons*), transportujących białka po translacji do błony wewnętrznej (produkty genów *secB*), a także udział innych białek, których geny należą do grupy *sec* (od sekrecji) i o których wiadomo, że *secY* koduje białko błonowe, a produkt genu *secA* jest związany z białkiem SECY i wymaga ATP, aby transportowany polipeptyd mógł przejść przez błonę [83-87] (Ryc. 6).

Zupełnie inny mechanizm rządzi wydzielaniem hemolizyny, procesem, w którym bierze udział białko błonowe (produkt genu *HlyD*) i białko (produkt genu *HlyB*), charakteryzujące się znaczną homologią z glikoproteiną P u ssaków, białkiem odpowiedzialnym za usuwanie leków i uzyskanie oporności na leki. Postu-



Ryc. 6. Schemat przedstawiający translokację białka proOmpA przez błonę plazmatyczną. Zaznaczono produkty poszczególnych genów *sec*, (wg Brundage i w s.p. [86], za zgodą autorów i wydawnictwa).

- Ostateczna lokalizacja białka jest zaprogramowana w sekwencji powstającego polipeptydu, w którym istnieją fragmenty kierujące, przyporządkowujące do odpowiedniego przedziału i wyznaczające ewentualne miejsce(a) odcięcia przez proteazę(y);
- Doprowadzenie białek do błony wymaga oddziaływania transportowanego polipeptydu z innymi białkami, bądź, żeby ochronić sekwencję sygnałową bądź w celu utrzymania odpowiedniej konformacji (kompleks rozpoznający sekwencję sygnałową, białka opiekuńcze);
- W błonie występują skomplikowane kompleksy białkowe, które ułatwiają transport;
- Samo wiązanie białka transportowanego z błoną nie wymaga energii, natomiast uwolnienie polipeptydu z kompleksów białkowych energii wymaga;
- Utrzymanie białka w cytoplazmie w konformacji rozwiniętej i odpowiednie jego uformowanie wymaga ATP i udziału białek szoku cieplnego.

Szczegółowe zestawienie cech transportu białek przez określone systemy błonowe przedstawia tabela I.

Artykuł otrzymano 10 maja 1993 r.

Zaakceptowano do druku 15 września 1993 r.

luje się ponadto, iż białko HlyB mogło by być pompą zależną od ATP [88].

V. Podsumowanie

W pozornie różnych sposobach przechodzenia lub wbudowywania białek do różnych błon da się jednak zaobserwować pewne cechy wspólne, a mianowicie:

Piśmiennictwo

1. Blobel G, Dobberstein B (1975) *J Cell Biol* 67: 835-851
2. Kemper B, Habener JF, Ernst MD, Potts JT,

Tabela 1.

Charakterystyka procesu transportu białek przez różne błony biologiczne.

| Cecha | Miejsce transportu przez błony | | | |
|------------------------------|--|---|--|--|
| | Retikulum endoplazmatyczne | Jądra | Mitochondria | Bakterie Gram (-) |
| Sygnal | Sekwencja hydrofobowa ok. 20 aminokwasów na N-końcu, sygnał +1,7, odcięcia | KXXK/R w różnych miejscach sekwencji, nieodszczepiane | Dodatkowo naładowana sekwencja, różnej długości, w różnych miejscach, odszczepiana lub nie | najczęściej tj. w retikulum endoplazmatycznym |
| Dojście do błony | Transport równoległe z transkrypcją, potrzebne kompleks rozpoznający sekwencję sygnałową i białko cumujące | Zaangażowane czynniki cytoplazmatyczne wiążące sekwencję kierującą do jądra | Niezbędna określona konformacja, utrzymana przez białka opiekuńcze (HSP70) | Równoległe z translacją, białka opiekuńcze (SECB) |
| Przejście przez błonę | Białko cumujące, receptor rybosomów, kanał przewodzący białko | Pory jądrowe, zaangażowanie ATPazy podobnej do miozyny | Receptory w błonie zewnętrznej, miejsca kontaktu obu błon, kanał hamowany przez sekwencję kierującą do matryks | Białka, produkty genów <i>sec</i> (<i>secA</i> , <i>secY</i>) HlyB |
| Zapotrzebowanie energetyczne | GTP — uwolnienie kompleksu wiążącego sekwencję sygnałową | ATP | ATP i potencjał transmembranowy (nie dla białek błony zewnętrznej) | ATP i potencjał transmembranowy |

- Rich A (1975) *Biochemistry* **15**: 15-19
3. Szczesna E, Boime I (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 1179-1183
 4. Devillers-Thiery A, Kindt T, Scheele G, Blobel G (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 5016-5020
 5. Bedouelle H, Braddford DJ, Fowler AV, Zabin J, Beckwith J, Hofnung M (1980) *Nature (Lond)* **285**: 78-81
 6. Evans EA, Gilmore R, Blobel G (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 581-585
 7. Von Heine G (1985) *J Mol Biol* **184**: 99-105
 8. Yamamoto Y, Ohkubo T, Kohara A, Tanaka T, Kichuchi M (1990) *Biochemistry* **29**: 8998-9006
 9. Wessels HP, Spiess M (1988) *Cell* **55**: 61-70
 10. Yonath A, Leonard KR, Wittmann HG (1987) *Science* **236**: 813-816
 11. Connolly T, Collins P, Gilmore R (1989) *J Cell Biol* **108**: 299-307
 12. Walter P, Blobel G (1982) *Nature (Lond)* **299**: 691-698
 13. Kurzchalia TV, Wiedman M, Girshovich AS, Bochkareva ES, Bielka H, Rapoport TA (1986) *Nature (Lond)* **320**: 634-636
 14. Wiedman M, Goerlich D, Hartmann E, Kurzchalia TV, Rapoport TA (1989) *FEBS Lett* **257**: 263-268
 15. Savitz AJ, Meyer DI (1990) *Nature (Lond)* **346**: 540-544
 16. Connolly T, Gilmore R (1989) *Cell* **57**: 599-610
 17. Rapoport TA (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 355-358
 18. Briggs MS, Cornell DG, Dluhy RA, Gierasch LM (1986) *Science* **233**: 206-233
 19. Killian JA, de Jong AMPh, Bijvelt J, Verkleij AJ, de Kruijff B (1990) *EMBO J* **9**: 815-819
 20. Gilmore R, Blobel G (1985) *Cell* **42**: 497-505
 21. Singer SJ, Maher PA, Yaffe MP (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1015-1019
 22. Singer SJ, Maher PA, Yaffe MP (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1960-1964
 23. Simon SM, Blobel G (1991) *Cell* **65**: 371-380
 24. Hosobuchi M, Kreis T, Schekman T (1992) *Nature (Lond)* **360**: 603-605
 25. Schekman R (1992) *Current Opinion Cell Biol* **4**: 587-592
 26. Barlowe C, d'Enfert C, Schekman R (1993) *J Biol Chem* **268**: 873-879
 27. Baringa M (1993) *Science* **260**: 487-489
 28. Sölner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993) *Nature (Lond)* **362**: 318-324
 29. Gurdon JB (1970) *Proc R Soc B* **176**: 303-314
 30. Hunt T (1989) *Cell* **59**: 949-951
 31. Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE (1984) *Nature (Lond)* **311**: 33-38
 32. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) *Cell* **39**: 499-509
 33. Wagner P, Kunz J, Koller A, Hall MN (1990) *FEBS Lett* **275**: 1-5
 34. Roberts B (1989) *Biochim Biophys Acta* **1008**: 263-280
 35. Butel JS, Guentzel MJ, Rapp F (1969) *J Virol* **4**: 632-641
 36. Hall MN, Hereford L, Herskovitz I (1984) *Cell* **36**: 1057-1065
 37. Dingwall C, Dilworth SM, Black SJ, Kearsey SE, Cox LS, Laskey RA (1986) W: Peters R, Trendelenburg M (red) *Nucleoplasmic Transport*, Springer-Verlag Berlin, str 159-169
 38. Burglin TR, De Robertis EM (1987) *EMBO J* **6**: 69-74
 39. Finlay DR, Newmeyer DD, Price TM, Forbes DJ (1987) *J Cell Biol* **104**: 189-200
 40. Yoneda Y, Imamoto-Sonobe N, Matsuoka Y, Iwamoto R, Kiho Y, Uchida T (1988) *Science* **242**: 275-278
 41. Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL, Jarnik M, Engel A, Aebi U (1990) *J Cell Biol* **110**: 883-894
 42. Unwin PNT, Milligan RA (1982) *J Cell Biol* **93**: 63-75
 43. Akey CW (1989) *J Cell Biol* **109**: 955-970
 44. Akey CW, Goldfarb DS (1989) *J Cell Biol* **109**: 971-982
 45. Snow CM, Senior A, Gerace L (1987) *J Cell Biol* **104**: 1143-1156
 46. Finlay DR, Meier E, Bradley P, Horecka J, Forbes DJ (1991) *J Cell Biol* **114**: 169-183
 47. Berrios M, Fisher PA (1986) *J Cell Biol* **103**: 711-724
 48. Newmeyer DD, Lucoq JM, Burglin TR, De Robertis EM (1986) *EMBO J* **5**: 501-510
 49. Richardson WD, Mills AD, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1988) *Cell* **52**: 655-664
 50. Hurt EC, van Loon APGM (1986) *Trends Biochem Sci* **11**: 204-207
 51. Roise D, Schatz G (1988) *J Biol Chem* **263**: 4509-4511
 52. Viebrock A, Perz A, Sebald W (1982) *EMBO J* **1**: 565-571
 53. Schatz G (1987) *Eur J Biochem* **165**: 1-6
 54. Yang M, Jensen RE, Yaffe MP, Opplinger W, Schatz G (1988) *EMBO J* **7**: 3857-3862
 55. Dumont ME, Ernst JF, Sherman F (1988) *J Biol Chem* **263**: 15928-15937
 56. Hamajima S, Sakaguchi M, Mihara K, Ono S, Sato R (1988) *J Biochem* **104**: 362-367
 57. Smagula C, Douglas MG (1988) *J Biol Chem* **263**: 6783-6790
 58. Saraste M, Walker JE (1982) *FEBS Lett* **144**: 250-254
 59. Zara V, Rassow J, Wachter E, Tropschug M, Palmieri F, Neupert W, Pfanner N (1991) *Eur J Biochem* **198**: 405-410
 60. Pratt RD, Ferreira GC, Pedersen PL (1991) *J Biol Chem* **266**: 1276-1280
 61. Pfanner N, Neupert W (1986) *FEBS Lett* **209**: 152-156
 62. Pfanner N, Hartl F-U, Neupert W (1988) *Eur J Biochem* **175**: 205-212
 63. Stuart RA, Nicholson DW, Neupert W (1990) *Cell* **60**: 31-43
 64. Vestweber D, Schatz G (1988) *J Cell Biol* **107**: 2037-2043
 65. Eilers M, Schatz G (1986) *Nature (Lond)* **322**: 228-232
 66. Law HP, Nagley P (1990) *Biochim Biophys Acta* **1027**: 141-148
 67. Murakami H, Pain D, Blobel G (1988) *J Cell Biol* **107**: 2051-2067
 68. Ostermann J, Voos W, Kang PJ, Craig EA, Neupert W, Pfanner N (1990) *FEBS Lett* **277**: 281-284
 69. Jordi W, de Kroon AIPM, Killian JA, de Kruijff B (1990) *Biochemistry* **29**: 2312-2321
 70. Pfaller R, Pfanner N, Neupert W (1989) *J Biol Chem* **264**: 34-39
 71. Sölner T, Griffiths G, Pfaller R, Pfanner N, Neupert W (1989) *Cell* **59**: 1061-1070
 72. Vestweber D, Brunner J, Baker A, Schatz G (1989) *Nature (Lond)* **341**: 205-209
 73. Ono H, Tuboi S (1990) *J Biochem* **107**: 840-845
 74. Gillespie LL (1987) *J Biol Chem* **262**: 7939-7942
 75. Henry JP, Chich JF, Goldschmidt D, Thieffry M (1989) *J Membrane Biol* **112**: 139-147
 76. Ostermann J, Horwich AL, Neupert W, Hartl FU (1989) *Nature (Lond)* **341**: 125-130
 77. Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neupert W, Hallberg EM, Horwich AL (1989) *Nature (Lond)* **337**: 620-625
 78. Wielburski A, Nelson BD (1983) *Biochem J* **212**: 829-834
 79. Fujiki M, Verner K (1993) *J Biol Chem* **268**: 1914-1920
 80. Scherrer R (1984) *Trends Biochem Sci* **9**: 242-245
 81. Seria artykułów przeglądowych w *J Bioenergetics Biomembr* (1990) **22**: 207-492, wydanie specjalne nt. eksportu białka w bakteriach
 82. Poritz MA, Bernstein HD, Strub K, Zopf D, Wilhelm H, Walter P (1990) *Science* **250**: 1111-1117
 83. Bassford P, Beckwith J, Ito K, Kumamoto C, Mizushima S, Oliver D, Randall L, Silhavy T, Tai PC, Wickner B (1991) *Cell* **65**: 367-368
 84. Gardel C, Johnson K, Jacq A, Beckwith J (1990) *EMBO J* **9**: 3209-3216
 85. Watanabe M, Blobel G (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1895-1899
 86. Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJM, Wickner W (1990) *Cell* **62**: 649-657
 87. Crooke E, Gunthrie B, Lecker S, Lill R, Wickner W (1988) *Cell* **54**: 1003-1011
 88. Holland B, Blight MA, Kenny B (1990) *J Bioenergetics Biomembr* **22**: 473-491

Rola proteolitycznego systemu kalpainowego w komórkach zwierzęcych

Role of the proteolytic calpain system in animal cells

ANNA JAKUBIEC-PUKA*

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Budowa kalpains
- III. Inhibitory kalpains
- IV. Działanie kalpains
- V. Lokalizacja kalpains wewnątrz komórki
- VI. Rola kalpains w komórkach
 - VI-1. Wpływ kalpains na aktywność lub na mechanizm działania niektórych enzymów
 - VI-2. Wpływ kalpains na organizację cytoszkieletu
 - VI-3. Działanie kalpains na miofibryle mięśnia prężowanego
 - VI-4. Inne role kalpains
- VII. Inne proteazy aktywowane przez jony Ca^{2+}
- VIII. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Calpain structure
- III. Calpain inhibitors
- IV. Calpain functions
- V. Cellular localisation of calpain
- VI. Role of calpain in cells
 - VI-1. Calpain influence upon activity or on mechanism of action of certain enzymes
 - VI-2. Calpain influence on cytoskeletal organization
 - VI-3. Calpain action on myofibrils of the striated muscle
 - VI-4. Other roles of calpain
- VII. Other Ca^{2+} — activated proteases
- VIII. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: CANP — Neutralna proteaza aktywowana przez jony wapnia; E 64 — L-trans-epoksyburstynylo-leucyloamido(3metylo)butan.

I. Wprowadzenie

Proteolityczna modyfikacja białek jest końcowym etapem ich biosyntezy; tą drogą większość białek dochodzi do formy dojrzałej. Ograniczona proteoliza jest też jedną z możliwości potranslacyjnej modyfikacji białek — powszechnego mechanizmu regulacji procesów fizjologicznych w komórce. W wyniku ograniczonej proteolizy, nawet jednego tylko wiązania peptydowego, może zostać usunięty istotny funkcjonalnie peptyd lub nastąpić zmiana stanu konformacji białka. W efekcie zwiększa się lub zmniejsza biologiczna aktywność białka. Równocześnie białko to może zostać wprowadzone na drogę degradacji [1-3].

Wiadomo, iż degradacja indywidualnych białek jest wybiórczo, precyzyjnie regulowana. Mechanizmy takiej regulacji są jednak jeszcze mało znane; są one obecnie intensywnie badane. Dotychczas dość dobrze

poznano 2 układy proteolityczne zapoczątkowujące wybiórczą degradację indywidualnych białek w komórkach zwierzęcych. Są to układ wielokatalitycznej, wielofunkcyjnej proteazy, znany też jako układ proteozomalny [4] oraz układ kalpainowy, będący tematem tego artykułu. Mimo, iż rola układu kalpainowego, zwłaszcza w wysoko wyspecjalizowanych tkankach, daleka jest jeszcze od wyjaśnienia, to ogromne znaczenie tego układu dla funkcji komórki nie budzi wątpliwości. Intencją autorki artykułu jest zwrócenie uwagi na układ kalpainowy, oraz zasygnalizowanie różnych jego funkcji, na podstawie najbardziej wiarygodnych przykładów.

Neutralna proteaza aktywowana przez jony Ca^{2+} , CANP lub kalpaina (EC 3.4.22.17) występuje powszechnie w komórkach zwierzęcych. Jest jedną z proteaz cysteinowych (tiolowych), zawierających w centrum aktywnym cysteinę i histydynę. Kalpaina jest typową wewnątrzkomórkową endopeptydazą, hydrolizującą wyłącznie wiązania peptydowe dużych białek, aktywną przy neutralnym pH. Aktywność jej jest bezwzględnie zależna od obecności jonów Ca^{2+} . Zatem kalpaina wykorzystuje wtórny przekaźnik sygnałów, jakim są jony Ca^{2+} . Samą kalpainę niektórzy zaliczają do wtórnych przekaźników sygnałów.

Pierwsze doniesienia na temat kalpains, oraz jej funkcji jako aktywatora kinaz, pochodzą z lat 1964-1968 [5-7]. W 1972 roku wykryto zależną od kalpains

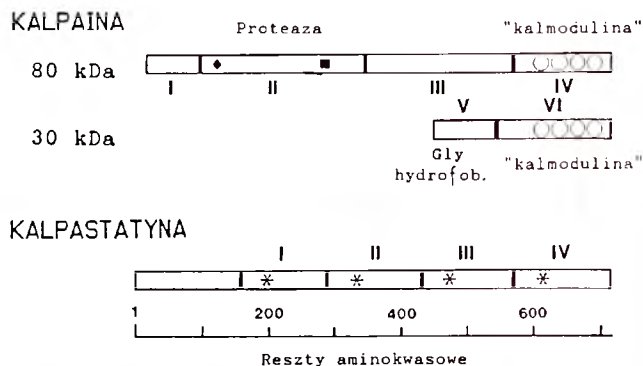
* doc. dr hab. Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

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

degradację miofibryli mięśnia szkieletowego [8]. W latach 1975-1976 wyizolowano z mięśnia szkieletowego formę kalpajny aktywną przy m-molarnych stężeniach Ca^{2+} (nazywaną obecnie m-kalpajną, kalpajną II, lub m-CANP), którą zidentyfikowano jako neutralną proteazę, aktywowaną przez Ca^{2+} w stężeniach m-molarnych, odpowiedzialną za pośmiertną degradację miofibryli [9, 10]. W 1978 roku wykryto wysoce specyficzny inhibitor kalpajny, nazwany kalpastatyną [11]. W roku 1981 wyróżniono drugą izoformę kalpajny, aktywną przy μ -molarnych stężeniach Ca^{2+} (μ -kalpajna, kalpajna I, μ -CANP) [12]. W latach 1986-1989 poznano budowę podjednostek kalpajny i kalpastatyny z odpowiednich sekwencji DNA [13-16]. W latach 1990-92 ukazało się wiele prac, które wniosły istotne informacje na temat funkcji układu kalpajnowego.

II. Budowa kalpajny

Kalpajna zbudowana jest z 2 podjednostek: 80 kDa i 30 kDa, nazwanych dużą i małą [10]. W podjednostce 80 kDa można wyróżnić 4 domeny (I-IV, licząc od N-końca); w podjednostce 30 kDa 2 domeny (V i VI, domena VI jest też nazywana IV') (Ryc. 1). Poniżej przedstawiono budowę kalpajny na przykładzie kalpajny ludzkiej. W domenie I znajduje się 87 (forma μ -) i 76 (forma m-) reszt aminokwasowych, których sekwencje nie są homologiczne z żadną ze znanych. Domena I działa jako inhibitor aktywności proteolitycznej. Częściowe usunięcie tej domeny drogą autolizy aktywuje enzym. Domena II, katalityczna, zawiera reszty aminokwasowe 88-327 (μ -) lub 77-316 (m-), jest podobna do innych znanych proteaz cysteinowych: katepsyn B, H, L oraz papajny. W centrum aktywnym kalpajny znajdują się reszty cysteinowe: w pozycji 108 (μ -) i 115 (m-). Domena III, zawierająca reszty 328-569 (μ -) lub 317-555 (m-), posiada sekwencję niepodobną do żadnej ze znanych; jej funkcja jest niejasna. Domena IV zawiera reszty 570-714 (μ -) lub 556-699 (m-), o sekwencji homologicznej z sekwencją kalmoduliny. W domenie tej znajdują się 4 rejony o sekwencji "EF-hand"*, która może wiązać Ca^{2+} . Domena V jest silnie hydrofobowa, jak również bogata w reszty glicynowe; w odcinku 1-64 od N-końca zawiera aż 37 reszt glicyny. Znaczna część tej domeny jest odtrawiana w czasie autolitycznej aktywacji enzymu. Domena VI, zawierająca reszty 102-168, posiada sekwencję homologiczną z sekwencją kalmoduliny i z sekwencją domeny IV. Domena VI zawiera 4 rejony "EF-hand". W domenach IV i VI może być związana różna liczba jonów wapnia; przypuszczalnie dla aktywności proteolitycznej potrzebne jest związanie co najmniej 4 lub 5 Ca^{2+} w obu tych domenach łącznie. Obie podjednostki 80 kDa i 30 kDa łączą się wiązaniem niekowalencyjnym, za pośrednictwem 8-10-ciu reszt ami-



Ryc. 1. Schematycznie przedstawiona struktura kalpajny i kalpastatyny [22]. Cyframi rzymskimi oznaczone odpowiednie domeny podjednostek 80 kDa (I-IV) i 30 kDa (V, VI). Cys i His centrum aktywnego oznaczono, odpowiednio, rombem i kwadratem. Struktury "EF hand" oznaczono kółkami w domenach IV i VI. Gwiazdki reprezentują istotne dla inhibicji sekwencje "TIPPLYR" kalpastatyny.

nokwasów C-końca. Podjednostka 80 kDa jest odmienna w μ - i m-kalpajnie (50-60% homologii). Ta sama zaś izoforma z tkanek zwierząt różnych gatunków wykazuje znaczne podobieństwo (około 95% homologii). Podjednostka 30 kDa jest jednakowa w μ - i m-kalpajnie i wykazuje wielkie podobieństwo międzygatunkowe [9, 13, 18-25].

Analiza struktury DNA mięśnia szkieletowego pozwala wnioskować o istnieniu białka o ciężarze 94 kDa, homologicznego wobec większej podjednostki kalpajny, określanego jako n-kalpajna lub p94. Izofорма ta zawiera, w porównaniu z izoformami μ - i m-, 3 dodatkowe odcinki o unikalnej sekwencji. Jak dotychczas, ani białka p94 nie udało się wyizolować z żywych komórek, ani nawet nie wykryto jego aktywności *in vivo*. Tym bardziej nic nie wiadomo o roli tego enzymu. Jedyną tkanką, w której wykryto mRNA białka p94, jest dojrzały mięsień szkieletowy. Interesujące jest, iż zawartość tego mRNA w mięśniu jest około 10-krotnie większa niż zawartość mRNA izoform μ - i m- [16, 24]. Jak się wydaje, zmodyfikowanym produktem białkowym genu p94 może być proteaza działająca w przestrzeni międzykomórkowej mięśnia, opisana jako "high m-calpain", aktywna przy wysokim, bo około 4 mM stężeniu Ca^{2+} [26, 27]. W *Schistosoma* zidentyfikowano białko bardzo podobne do dużych podjednostek kalpajny [28]. W tkankach zwierzęcych znaleziono inne proteazy, o niezidentyfikowanej jeszcze sekwencji, przypuszczalnie pokrewne kalpajnie [26-31].

Protomer genu podjednostki 80 kDa ma właściwości charakterystyczne dla genów tzw. „gospodarczych” („housekeeping”). Protomer ten zawiera wiele GC (> 70%), nie zawiera natomiast sekwencji "TATA" i "CAAT"; ma on więcej niż 10 miejsc zapoczątkowujących transkrypcję. Protomer ten poprzedzają 4 regiony negatywnej regulacji. Geny podjednostek 80 kDa i 30 kDa wykazują znaczne podobieństwo i, jak się zdaje, są regulowane synchronicznie. Każdy z genów większej podjednostki (μ -, m- i p94), oraz gen podjednostki 30 kDa występuje w innym chromosomie (u człowieka odpowiednio na 11, 1, 15 i 19 chromosomie) [22, 32].

* Wyjaśnienie odnośnie sekwencji „EF-hand” znajduje się w pracy przeglądowej w *Postęпах Biochemii*, porównaj pozycję 17 Piśmiennictwa

III. Inhibitory kalpajny

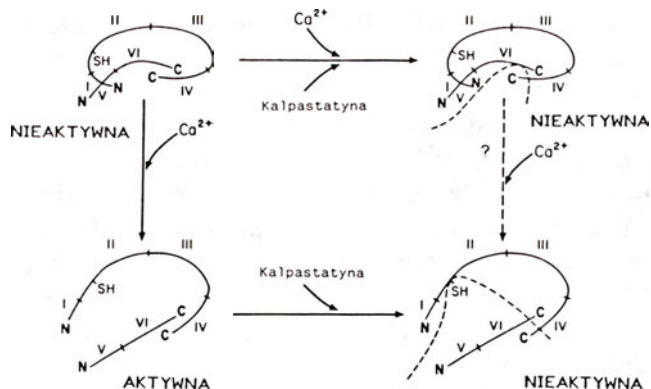
W żywej komórce jest jeszcze inne białko należące do systemu kalpainowego, mianowicie naturalny inhibitor kalpajny — kalpastatyna. Kalpastatyna hamuje specyficznie aktywność kalpajny i nie działa na inne proteazy cysteinowe. Jest białkiem o ciężarze 60-70 kDa, z nieznanymi przyczynami migrującym w SDS/PAGE tak jak białka o ciężarze 100-130 kDa. Kalpastatyna ma 4 miejsca inhibitorowe o powtarzającej się strukturze 130-amino-kwasowej. Każdy z tych odcinków zawiera, istotną dla inhibicji, sekwencję TIPXYR wiążącą jedną cząsteczkę kalpajny. Kalpastatyna wiąże się z kalpainą w obecności wapnia, przypuszczalnie z jej domenami kalmodulinopodobnymi (IV i VI) oraz z domeną katalityczną (II). Kalpastatyna działa jak inhibitor kompetycyjny kalpajny, będąc równocześnie jej substratem. Powstające w wyniku częściowej proteolizy kalpastatyny mniejsze peptydy są nadal inhibitorami kalpajny. Kalpastatyna przypuszczalnie czynnie uczestniczy w transporcie wewnątrzkomórkowym kalpajny [11, 15, 22, 23, 27, 33]. Wykryto kalpastatyny specyficznie hamujące μ - i m - formę kalpajny, które wiążą się z enzymem w przedziale stężeń Ca^{2+} odpowiadającym aktywacji danej jego formy. Wydaje się, że to głównie kalpastatyna reguluje aktywność μ -kalpajny, natomiast regulacja m -kalpajny jest bardziej złożona [34].

Prócz kalpastatyny inhibitorami kalpajny okazały się obecne w komórce poliaminy: spermina i spermidyna [35]. Również większość inhibitorów proteaz cysteinowych hamuje kalpainę (inhibitory grup sulfhydrylowych, leupeptyna, E64), wyjątek stanowią cystatyny. Otrzymano też inhibitory syntetyczne specyficzne wobec kalpain [36-39].

IV. Działania kalpajny

Aktywność kalpajny jest bezwzględnie zależna od jonów wapnia. Stężenie Ca^{2+} , przy którym reakcja proteolizy w warunkach *in vitro* osiąga połowę szybkości maksymalnej wynosi w przypadku μ -kalpajny $5.35 \mu M Ca^{2+}$, a w przypadku m -kalpajny $420 \mu M Ca^{2+}$, podczas gdy stężenie jonów Ca^{2+} w komórce jest co najwyżej $0.2-0.8 \mu M$ [26]. Wydaje się jednak, że *in vivo* działanie m -kalpajny może być efektywne już przy $0,1 \mu M$ stężeniu Ca^{2+} [40]. Przyczyny tego zjawiska nie są na razie wyjaśnione. Niejasne są też mechanizmy aktywacji i hamowania kalpajny, jak również sposób wiązania substratu przez kalpainę.

Wiadomo, że w domenie II kalpajny znajduje się centrum aktywne, a domena IV reguluje aktywność proteazową — hamuje ją w nieobecności Ca^{2+} . Po usunięciu domeny IV kalpainą staje się aktywna niezależnie od obecności jonów Ca^{2+} . Przypuszczalnie, jony Ca^{2+} powodują więc zmiany konformacji domeny IV oraz VI i w ich efekcie odsłonięcie centrum aktywnego oraz odhamowanie aktywności enzymatycznej w domenie II [27]. Proponowany przez Golla schemat działania kalpajny i jej interakcji z kalpastatyną przedstawiono



Ryc. 2. Schemat interakcji kalpajny z Ca^{2+} i z kalpastatyną [25]. Cyframi rzymskimi oznaczono kolejne domeny (I-VI). Kalpastatyna oznaczona przerywaną linią. Centrum aktywne (grupa SH) nieaktywnej cząsteczki jest sterycznie zablokwane przez N-końcowe regiony obu podjednostek.

na rycinie 2.

Uważa się, że kalpainą znajduje się w tkankach w postaci nieaktywnego proenzymu. Aktywacja następuje autokatalitycznie w obecności jonów Ca^{2+} , towarzyszy jej zmiana ciężaru podjednostki 80 kDa do 76 kDa oraz podjednostki 30 kDa do 18 kDa. Autoliza domeny I i V powoduje przypuszczalnie odsłonięcie centrum aktywnego i obniżenie stężenia Ca^{2+} potrzebnego do aktywacji. Forma aktywna enzymu jest bardzo nietrwała i stanowi co najwyżej kilka procent całej obecnej w komórce kalpajny [25, 27, 31, 41, 42].

W warunkach *in vitro* aktywatory innych proteaz cysteinowych aktywują również kalpainę. Spośród związków obecnych w komórce, aktywność kalpajny zwiększają fosfolipidy błonowe: fosfoinozytole, dioleinoglycerol, fosfoseryna, a także cerebrozydy i sulfatydy. Wiążą się one z N-końcową częścią małej podjednostki kalpajny. W warunkach *in vitro* związanie fosfolipidu przez kalpainę powoduje zwiększenie jej wrażliwości na Ca^{2+} o około 10 razy. Oznacza to w przypadku μ -kalpajny, że stężenie Ca^{2+} potrzebne do aktywacji enzymu jest bliskie stężeniu fizjologicznemu [29, 43, 44]. Jednak wydaje się, że w warunkach *in vivo* aktywacja kalpajny przez błonowe fosfolipidy jest tylko jednym z możliwych mechanizmów aktywacji [27]. Innym obecnym w komórce silnym aktywatorem kalpajny, jest izowalerianian karnityny (produkt przemiany L-leucyny). Działa on analogicznie jak fosfolipidy [34]. Dodanie histonów, zwłaszcza łącznie z fosfolipidami, zwiększa aktywność m -kalpajny wobec niektórych substratów (kinaz), zarówno *in vitro* jak i w warunkach zbliżonych do *in vivo*. Aktywacja ta polega na znacznym obniżeniu stężenia Ca^{2+} potrzebnego dla aktywacji. Aktywacja proteolizy kalpainowej przez histony mogłaby tłumaczyć możliwość działania m -kalpajny w jądrze. Aktywacja przez histony wydaje się odnosić wybiórczo tylko do niektórych białek, i to jak się zdaje poprzez oddziaływanie na substrat [45-47]. Równocześnie same histony są substratami kalpajny [48]. Należy zaznaczyć, że substrat ma wpływ na wrażliwość kalpajny na

jony Ca^{2+} ; optymalne dla działania kalpajny stężenie jonów Ca^{2+} może różnić się kilkakrotnie, zależnie od substratu [49].

Kalpajna jest typową endopeptydazą, specyficznie działającą na duże białka pewnych grup. Tnie białka na duże peptydy, nie powodując ich degradacji do małych peptydów czy nawet do aminokwasów. Hydroлізуje na ogół wiązania peptydowe w regionach międzydomenowych. Kalpajna nie wykazuje specyficzności wobec aminokwasów otaczających rozszczepiane wiązanie. Nieznane są przyczyny specyficzności kalpajny wobec poszczególnych białek, jak też wobec poszczególnych ich regionów. Przypuszczalnie o specyficzności decydują struktury wyższego rzędu. Substratami kalpajny są niektóre enzymy, zwłaszcza kinazy, liczne białka cytoszkieletowe, białka filamentów pośrednich, dystrofina, proteoglikany, białka związane z mikrotubulami (MAP 1 i MAP 2), białka wiążące kalmodulinę, niektóre białka receptorowe, niektóre białka miofibrili. Substratami kalpajny nie są: białka cytosolowe (za wyjątkiem kinaz i fosfataz), białka kalmodulino-podobne, a także natywne białka miofibrili: aktyna, miozyna i α -aktynina [40, 50-59].

Liczne białka, w formie „natywnej” odporne na działanie kalpajny, stają się jej substratami po częściowym zdenaturowaniu. Przypuszczalnie defosforylacja zwiększa podatność białka na trawienie przez kalpajnę [60]. Natomiast sama kalpajna nie wydaje się być regulowana przez fosforylację [61]. Sądzono w przeszłości, że tzw. regiony „PEST” (bogate w prolinę oraz aminokwasy kwaśne i hydroksylowe), charakterystyczne dla białek krótko-żyjących, predysponują białko do degradacji przez kalpajnę [3, 62]. Nie zostało to jednak potwierdzone.

V. Lokalizacja kalpajny wewnątrz komórki

Kalpajnę wykryto we wszystkich badanych dotychczas komórkach kręgowców, a także niższych zwierząt [22, 27]. W komórkach roślinnych enzym taki przypuszczalnie nie występuje [63]. Kalpajna, zarówno μ -, jak i m -, jest typowym enzymem wewnątrzkomórkowym, obecnym zarówno w cytosolu komórkowym, jak i związanym z organelami: błoną komórkową, mitochondriami, retikulum endoplazmatycznym, jądrami, strukturami cytoszkieletu [9, 31, 53, 64, 65], a w komórce dzielącej się z wrzecionem mitotycznym [40, 66]. W mięśniach szkieletowych, w których lokalizacja kalpajny została stosunkowo najlepiej poznana [64, 67], obie formy (μ - i m -) związane są głównie z miofibrilami, zwłaszcza z linią Z, ale także z wymienionymi wyżej organelami. W sarkoplazmie (cytoplazma komórki mięśniowej) kalpajna obecna jest w bardzo nieznacznej ilości [64]. Kalpastatyna jest zlokalizowana w komórce mięśniowej tak jak kalpajna. W mięśniach odnerwionych i zwierząt głodzonych zwiększa się koncentracja zarówno kalpajny, jak i kalpastatyny, ale ich lokalizacja wewnątrzkomórkowa nie ulega zmia-

nie. Również w wielu innych stanach patologicznych mięśnia prądkowanego wzrasta w nim aktywność kalpajny. W przestrzeni międzykomórkowej normalnego mięśnia szkieletowego nie wykryto ani kalpajny, ani kalpastatyny. Natomiast, w warunkach patologicznych, w mięśniach odnerwionych lub po głodzeniu, kalpajna i kalpastatyna pojawiają się w przestrzeni pozakomórkowej, przypuszczalnie w wyniku uszkodzenia błony komórkowej [64, 68-70].

Wzajemna proporcja zawartości kalpajny i kalpastatyny ma przypuszczalnie związek z regulacją aktywności kalpajny. Różni się ona zależnie od regionu komórki i może zmieniać się w przebiegu procesów komórkowych [64, 70]. Na przykład, w komórkach z hodowli, wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie μ - i m -kalpajny oraz kalpastatyny zmienia się zależnie od fazy podziału komórki. Mianowicie, w komórkach będących w fazie spoczynkowej obie formy kalpajny są równomiernie rozproszone w cytoplazmie, natomiast kalpastatyna jest zlokalizowana głównie wokół jądra. W czasie mitozy następuje koncentracja obu kalpajny w rejonie wrzeciona mitotycznego, oraz wiązanie m -kalpajny z chromosomami. Po zakończeniu mitozy m -kalpajna koncentruje się w okolicy błony komórkowej [40, 66].

VI. Rola kalpajny w komórkach

Reakcja hydrolizy wiązania peptydowego, w warunkach takich jak w żywym organizmie, jest nieodwracalna. Toteż, hydrolizę każdego wiązania peptydowego w danym białku należy traktować jak kolejny stopień w jego degradacji. Tak więc, zmiany struktury i właściwości danego białka, wynikłe z ograniczonej proteolizy, należy traktować jako nieodwracalne.

Wyjaśnienie roli kalpajny w żywym organizmie jest bardzo trudne z wielu przyczyn. Kalpajna jest obecna w komórce głównie w formie nieaktywnego proenzymu, taką też formę udaje się wyizolować. Aktywna forma kalpajny, powstająca w wyniku jej częściowej autolizy, jest bardzo nietrwała i stanowi najwyżej kilka procent enzymu zawartego w komórce. Identyfikacja endogennych substratów kalpajny jest również bardzo trudna, ponieważ działanie kalpajny na białko ogranicza się jedynie do wstępnych etapów jego degradacji. Nawet bardzo wrażliwe białka są hydrolizowane do nielicznych wielkich fragmentów, które ulegają dalszemu trawieniu przez mniej specyficzne proteazy komórkowe. Dodatkowym utrudnieniem w identyfikacji substratów kalpajny jest powszechność jej występowania. Z tych wszystkich względów brak dotychczas bezpośrednich dowodów, zarówno na to jaka jest rola kalpajny w komórce, jak i na to jaki jest mechanizm jej działania. O roli kalpajny w komórce można więc wnioskować tylko z dowodów pośrednich, a mianowicie: 1) z aktywności oczyszczonego enzymu wobec poszczególnych, oczyszczonych lub nasylnych białek, 2) z efektów działania inhibitorów i aktywatorów

Tabela 1.

Schemat prawdopodobnych oddziaływań systemu kalpainowego.

| Rola kalpains | Efekt proteolizy | Przykłady |
|--|---|---|
| I. Zmiana aktywności biologicznej białek | Aktywacja lub zmiana sposobu regulacji aktywności Utrata zdolności oddziaływania na efektor Inaktywacja | Kinazy Fosfatazy Receptor α -adrenergiczny (utrata zdolności wiązania białek G) pp ^{39mos} c-Jun, c-Fos |
| II. Zmiana kształtu komórki i/lub organizacji organeli subkomórkowych | Modelowanie lub dysagregacja struktur komórkowych | Białka cytoszkieletu Białka filamentów pośrednich Niektóre białka miofibrilli |
| III. Inicjowanie procesu degradacji | Wybiórcze wprowadzenie białek i organeli komórkowych na drogę degradacji | Miofibryle Niektóre białka miofibrilli |

kalpains, 3) z lokalizacji wewnątrzkomórkowej kalpains, 4) ze zmian stężenia i lokalizacji wewnątrzkomórkowej kalpains i kalpastatyny w przebiegu procesów komórkowych, 5) ze skutków aktywacji w izolowanych komórkach, lub w skrawkach tkankowych, kalpains endogennej, bądź kalpains egzogennej (wprowadzonej na przykład drogą mikroinjekcji). Zwłaszcza te ostatnie badania, prowadzone w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*, dostarczają najcenniejszych informacji na temat działania kalpains w żywym organizmie. Na podstawie posiadanych obecnie danych, uzyskanych zwłaszcza w ostatnich latach, można z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać jaka jest rola kalpains w komórce.

Efekty ograniczonej proteolizy białek przez kalpainę można zakwalifikować następująco: 1) zmiana aktywności (aktywacja bądź inaktywacja), albo zmiana mechanizmu regulacji, aktywnego biologicznie białka; 2) zmiana kształtu komórki i/lub organizacji organeli subkomórkowych; 3) wprowadzenie indywidualnego białka, lub całej organeli subkomórkowej, na drogę degradacji (Tabela 1). Przy czym, ograniczona proteoliza może wywoływać w tym samym białku więcej niż 1 z wymienionych efektów jednocześnie. Poniżej przedstawiono przykłady różnych efektów działania kalpains.

VI-1. Wpływ kalpains na aktywność lub na mechanizm działania niektórych enzymów

Przykładami białek aktywowanych przez kalpainę drogą ograniczonej proteolizy są: kinaza C [71], hydroksylaza tyrozynowa [72], V i X czynniki krzepnięcia krwi [73], czy receptor „rianodinowy” mięśnia szkieletowego [74]. Kalpainia moduluje również proces agregacji płytek krwi poprzez ograniczoną proteolizę agreginy [75].

Przykładami białek unieczynnianych przez kalpainę są czynniki transkrypcyjne c-Fos i c-Jun [76], jak

również kinaza pp^{39mos} [77]. Wydaje się, że kalpainia może inaktywować te białka również *in vivo*. W takim przypadku kalpainia mogłaby mieć istotne znaczenie dla regulacji procesów transkrypcji oraz procesów embriogenezy [76, 77].

Wynikiem działania kalpains jest zmiana mechanizmu regulacji aktywności pewnych enzymów. W taki sposób kalpainia działa na niektóre kinazy [47, 71, 78, 79]. Na przykład, jedna z kinaz C pozostaje w pełni aktywna po odtrawieniu jej części regulującej (około 30 kDa). Aktywność ta jednak przestaje być zależna od aktywacji przez jony Ca²⁺ i przez fosfolipidy [71, 79]. Należy podkreślić, że efekt ograniczonej proteolizy kinazy C przez inne proteazy jest analogiczny [80]. Podobnie, działanie kalpains na niektóre enzymy regulowane przez kalmodulinę powoduje uniezależnienie ich aktywności od kalmoduliny. W taki sposób, na przykład, kalpainia działa na kinazę lekkich łańcuchów miozyny [81], Ca²⁺ — ATPazę [82, 83], czy kalcyneurynę [84]. Innym przykładem zmiany mechanizmu regulacji aktywności enzymu przez kalpainę jest uniezależnienie aktywności kinazy fosforylasy od stopnia jej ufosforylowania [27].

Działanie kalpains może powodować zmianę umiejscowienia enzymu w komórce, przez uwolnienie go ze struktur komórkowych. Na przykład, jądrowa kinaza histonów jest odtrawiana przez kalpainę ze „szkieletu” jądrowego wraz z kompleksem kilku innych białek [45, 46].

VI-2. Wpływ kalpains na organizację cytoszkieletu

Kalpainia może wpływać na organizację cytoszkieletu, i w efekcie na kształt komórki i rozmieszczenie organeli, poprzez odcinanie z białek cytoszkieletowych ich fragmentów peptydowych istotnych dla wiązania z innymi białkami. Dobrym przykładem jest skutek aktywacji μ -kalpains erytrocytów przez jony Ca²⁺,

wprowadzone drogą jonoforezy. W efekcie, w krótkim czasie kalpaina ulega autolizie do formy aktywnej i równocześnie następuje degradacja spektryny oraz zmiana kształtu erytrocytów [85]. Innym przykładem jest degradacja spektryny soczewki oka przez kalpainę, wywołana w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*. Degradacji tej towarzyszy reorganizacja cytoszkieletu i zmętnienie soczewki [86]. Przypuszczalnie, również drogą modulacji białek cytoszkieletu, kalpaina wpływa na proces mitozy [40], na adhezję komórek [87], czy też na strukturę i czynność mięśnia gładkiego [88].

VI-3. Działanie kalpains na miofibryle mięśnia prążkowanego

Stosunkowo dobrze poznane zostało działanie kalpains na miofibryle mięśnia prążkowanego. Jest ono przykładem zarówno wpływu na rozmieszczenie organeli komórkowych, jak i na zapoczątkowanie ich degradacji. Wczesnym efektem działania kalpains na miofibryle jest usunięcie z nich linii N_2 (delikatnej struktury przebiegającej równoległe do linii Z, zawierającej najprawdopodobniej nebulinę lub titinę). Następnie usuwana jest linia Z: pojawiają się przerwy w jej ciągłości i stopniowo linia Z znika całkowicie. Usunięcie linii Z wywołuje dezorganizację miofibryli i uwalnianie z nich filamentów miozynowych i aktynowych [9, 25, 67].

Pewna pula filamentów w miofibrylach (5% do 10%) jest kilkakrotnie bardziej mobilna od pozostałych [89]. Są to filamety umiejscowione w powierzchniowych rejonach miofibryli. Białka tych filamentów mają kilkakrotnie szybszy metabolizm od białek filamentów centralnie położonych. Wraz ze wzrostem aktywności kalpains zwiększa się pula mobilnych filamentów, oraz następuje przyspieszenie metabolizmu ich białek [25]. Z kolei, w stanach powodujących wzmożony katabolizm białek mięśniowych (np. w głodzeniu) następuje zwiększenie puli mobilnych filamentów, wzrost aktywności kalpains oraz zawartości kalpains i kalpastatyny w mięśniu. Równocześnie wzrasta zawartość odpowiednich mRNA w mięśniu. Przypuszczalnie zatem, kalpaina na drodze specyficznej ograniczonej proteolizy powoduje uwalnianie filamentów miozynowych i aktynowych z powierzchni miofibryli oraz uwalnianie dużych peptydów z niektórych białek miofibryli. Wejście filamentów na drogę degradacji wydaje się więc być uwarunkowane ich uprzednim uwolnieniem z miofibryli przez kalpainę. Można przypuszczać również, że działanie kalpains warunkuje przeorganizowanie się dużych jednostek strukturalnych miofibryli bez ich degradacji. Byłoby to bardzo korzystne w czasie adaptacji mięśnia do zmienionych warunków czynności, ze względu na oszczędność energii i czasu [64, 68, 90].

Jak przedstawiono wyżej, system kalpainowy wydaje się uczestniczyć w regulacji katabolizmu miofibryli.

Jednak, kalpaina nie trawi głównych białek linii Z: α -aktyliny i aktyny, trawi natomiast jakieś inne niezidentyfikowane białko/a linii Z, lub jej obrzeża. Kalpaina nie trawi również zasadniczych białek filamentów cienkich i grubych, a mianowicie aktyny i miozyny w ich natywnej formie. Trawi natomiast białka organizujące filament cienki — tropomiozynę i tropomiozynę T, oraz filament gruby — białko C. Szczególnie warte uwagi jest to, iż kalpaina nie trawi ciężkich łańcuchów miozyny, które są znane z podatności na trawienie przez większość proteaz [9, 27, 67]. Wydaje się więc, że system kalpainowy zapoczątkowując degradację niektórych białek miofibrylarnych, warunkuje dalsze trawienie przez inne proteazy zarówno tych białek, jak i innych, nie będących substratami kalpains [25].

VI-4. Inne role kalpains

Do substratów kalpains należą liczne receptory hormonów i czynników wzrostu (EGF, PDGF, oraz receptory estrogenów, progesteronu, glikokortykoidów). Jednak, nie stwierdzono wpływu działania kalpains, na wiązania ligandów przez większość z tych receptorów [27]. Natomiast, zmodulowany przez kalpainę receptor α -adrenergiczny traci zdolność interakcji z białkami G [91].

Na osobną wzmiankę zasługuje przypuszczalna rola kalpains w układzie nerwowym. Jest ona tam obecna w różnych rodzajach komórek; forma μ - przeważa w neuronach, a forma m - w komórkach gleju. Kalpainę wykryto w różnych rejonach neuronu: w ciele komórki, aksonach, dendrytach, w błonach synaptycznych, w pęcherzykach synaptycznych [52, 92-94]. Działanie kalpains w komórkach tkanki nerwowej może dawać różnorodne efekty. Na przykład, kalpaina przyspiesza metabolizm mieliny i wydaje się odgrywać rolę w procesie mielinizacji [65, 95]. Działanie kalpains jest prawdopodobnie również bardzo istotne dla reorganizacji kontaktów synaptycznych, leżącej u podstaw plastyczności synaps. Przypuszczalnie więc, kalpaina odgrywa ważną rolę w procesach pamięci [94, 96, 97]. Pośrednie dane sugerują też, że zahamowanie aktywności kalpains może mieć wpływ na rozwój choroby Alzheimera i zmian starczych w mózgu [98].

VII. Inne proteazy aktywowane przez jony Ca^{2+}

Wypada wspomnieć, że oprócz kalpains w tkankach zwierzęcych są obecne inne, zależne od jonów wapnia układy proteolityczne, aktywne w neutralnym zakresie pH. Jak się wydaje, niektóre z funkcji tych proteaz przypisywano w przeszłości kalpainie. Do tej pory zidentyfikowano co najmniej 4 takie proteazy.

— Furyna — proteaza serynowa związana z aparatem Golgiego, powodująca „dojrzewanie” białek nowo-syntetyzowanych [99-101].

— Proteaza serynowa działająca pozakomórkowo,

trawiąca kolagen, fibronektynę i żelatynę, podobna do IX i X czynnika koagulacji [102, 103].

— Proteaza serynowa trawiąca „szkielet” jądrowy [104]; przypuszczalnie identyczna z multikatalityczną proteazą, czyli układem proteozomalnym [4].

— Ponadto znaleziono aktywowaną przez jony Ca^{2+} proteazę cysteinową, różną od kalpajny, związaną z frakcją mikrosomalną. Enzym ten ma udział w „dojrzwaniu” białek [105].

VIII. Podsumowanie

Jakkolwiek wiedza o mechanizmie działania kalpajny w komórce jest jeszcze bardzo niepełna i uzyskana głównie drogą dowodów pośrednich, to kluczowe znaczenie kalpajny dla metabolizmu komórki nie budzi już dziś wątpliwości. Bez względu na zależność od jonów Ca^{2+} oraz wpływ na modulację struktury i aktywności licznych białek, podstawowych dla życia i funkcji komórki, w tym kinaz, uzasadnia zaliczenie kalpajny do wtórnych przekaźników informacji komórkowej. Ponadto obecność kalpajny w jądrze i wpływ na stopień ufosforylowania histonów, jak też przypuszczalnie na długość życia niektórych czynników transkrypcyjnych i histonów, wskazuje na ich udział w regulacji syntezy białek.

Przypuszczalne efekty częściowej proteolizy białek przez kalpajnę można przedstawić następująco.

— Aktywacja lub inaktywacja czynności wielu białek istotnych dla funkcji komórki.

— Zmiana sposobu regulacji aktywności niektórych enzymów i białek o podstawowym dla komórki znaczeniu, polegająca na nieodwracalnej utracie wrażliwości na czynniki regulujące.

— Wybiórcza regulacja degradacji niektórych białek.

— Regulacja degradacji niektórych organeli subkomórkowych np. miofibryli mięśni.

— Zmiana organizacji cytoszkieletu i tym samym wpływ na zmiany kształtu komórki i rozmieszczenia organeli subkomórkowych.

— Wpływ na niektóre procesy podziału komórkowego.

— Wpływ na regulację syntezy białek.

— Wpływ na reorganizację kontaktów synaptycznych i proces pamięci.

Podziękowanie

Autorka pragnie podziękować mgr Urszuli Wiczorek oraz p. Agnieszce Matusiak za pomoc w przygotowaniu pracy do druku.

Artykuł otrzymano 15 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 10 września 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Han K-K, Martinage A (1992) *Int J Biochem* **24**: 19-28
2. Neurath H (1989) *TIBS* **14**: 268-271
3. Sugden PH, Fuller SJ (1991) *Biochem J* **273**: 21-37
4. Tanaka K, Tamura T, Yoshimura T, Ichihara A (1992) *The New Biologist* **4**: 173-187
5. Huston RB, Krebs EG (1968) *Biochemistry* **7**: 2116-2122
6. Guroff G (1964) *J Biol Chem* **239**: 149-155
7. Meyer WL, Fischer EH, Krebs EG (1964) *Biochemistry* **3**: 1033-1039
8. Busch WA, Stromer MH, Goll DE, Suzuki A (1972) *J Cell Biol* **52**: 367-381
9. Reville WJ, Goll DE, Stromer MH, Robson RM, Dayton WR (1976) *J Cell Biol* **70**: 1-8
10. Dayton WR, Reville WJ, Goll DE, Stromer MH (1976) *Biochemistry* **15**: 2159-2167
11. Waxman L, Krebs EG (1978) *J Biol Chem* **253**: 5888-5891
12. Dayton WR, Schollmeyer JV, Lepley RA, Cortes LR (1981) *Biochim Biophys Acta* **659**: 48-61
13. Aoki K, Imajoh S, Ohno S, Emori Y, Koike M, Kosaki G, Suzuki K (1986) *FEBS Lett* **205**: 313-317
14. Suzuki K, Emori Y, Ohno S, Imahori S, Kawasaki H, Miyake S (1986) *Biomed Biophys Acta* **45**: 1487-1491
15. Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Imahori K, Suzuki K (1987) *Proc Nat Acad Sci USA* **84**: 3590-3594
16. Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K (1989) *J Biol Chem* **264**: 20106-20111
17. Filipek A (1993) *Post Biochem* **39**: 126-133
18. Suzuki K, Ohno S, Imajoh S, Emori Y, Kawasaki H (1985) *Biomed Res* **6**: 323-327
19. Kawasaki H, Imajoh S, Kawashima S, Hayashi H, Suzuki K (1986) *J Biochem* **99**: 1525-1532
20. Imajoh S, Kawasaki H, Suzuki K (1987) *J Biochem* **101**: 447-452
21. Minami Y, Emori Y, Kawasaki H, Suzuki K (1987) *J Biochem* **101**: 889-895
22. Suzuki K, Ohno S (1990) *Cell Structure and Function* **15**: 1-6
23. Nishimura T, Goll DE (1991) *J Biol Chem* **266**: 11842-11850
24. Sorimachi H, Suzuki K (1992) *Biochim Biophys Acta* **1160**: 55-62
25. Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Christiansen JA (1992) *Biochemie* **74**: 225-237
26. Wolfe FH, Sathe SK, Goll DE, Kleese WC, Edmunds T, Duperret SM (1989) *Biochim Biophys Acta* **998**: 236-250
27. Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zalewska T (1992) *BioEssays* **14**: 549-556
28. Andresen K, Tom TD, Strand M (1991) *J Biol Chem* **266**: 15085-15090
29. Pontremoli S, Melloni E, Sparatore B, Salamino F, Michetti M, Sacco O, Horecker BL (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **128**: 331-338
30. Malik MN, Fenko MD, Sheikh AM, Kascsak RJ, Tonna-DeMasi MS, Wiśniewski HM (1987) *Biochim Biophys Acta* **916**: 135-144
31. Tavares A, Duque-Magalhaes MC (1991) *Biomed Biophys Acta* **50**: 523-529
32. Hata A, Ohno S, Akita Y, Suzuki K (1989) *J Biol Chem* **264**: 6404-6411
33. Kawasaki H, Emori Y, Imajoh-Ohmi S, Minami Y, Suzuki K (1989) *J Biochem* **106**: 274-281
34. Pontremoli S, Melloni E, Viotti PL, Michetti M, Salamino F, Horecker BL (1991) *Archiv Biochem Biophys* **288**: 646-652
35. Johnson P, Hammer JL (1990) *Experientia* **46**: 276-278
36. Suzuki K (1983) *J Biochem* **93**: 1305-1312
37. Tsujinaka T, Kajiwara Y, Kambayashi J, Sakon M, Higuchi N, Tanaka T, Mori T (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **153**: 1201-1208

38. Turk V, Bode W (1991) *FEBS Lett* **285**: 213-219
39. Wilcox D, Mason RW (1992) *Biochem J* **285**: 495-502
40. Schollmeyer JE (1988) *Science* **240**: 911-913
41. Edmunds T, Nagainis PA, Sathe SK, Thompson VF, Goll DE (1991) *Biochim Biophys Acta* **1077**: 197-208
42. Cong J, Goll DE, Peterson AM, Kapprell H-P (1989) *J Biol Chem* **264**: 10096-10103
43. Imajoh S, Kawasaki H, Suzuki K (1986) *J Biochem* **99**: 1281-1284
44. Chakrabarti AK, Dasgupta S, Banik NL, Hogan EL (1990) *Biochim Biophys Acta* **1038**: 195-198
45. Mellgren RL, Rozanov CB (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 589-595
46. Mellgren RL (1991) *J Biol Chem* **266**: 13920-13924
47. Kuroda T, Mikawa K, Mishima H, Kishimoto A (1991) *J Biochem* **110**: 364-368
48. Sakai K, Akanuma H, Imahori K, Kawashima S (1987) *J Biochem* **101**: 911-918
49. Barrett MJ, Goll DE, Thompson VF (1991) *Life Sci* **48**: 1659-1669
50. Nelson WJ, Traub P (1982) *J Cell Sci* **57**: 25-49
51. Burgoyne RD, Cumming R (1982) *FEBS Lett* **146**: 273-277
52. Kamakura K, Ishiura S, Sugita H, Toyokura Y (1983) *J Neurochem* **40**: 908-913
53. Ishizaki Y, Tashiro T, Kurokawa M (1983) *Eur J Biochem* **131**: 41-45
54. Ishizaki Y, Kurokawa M, Takahashi K (1985) *Eur J Biochem* **146**: 331-337
55. Fischer S, Vandekerckhove J, Ampe C, Traub P, Weber K (1986) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **367**: 1147-1152
56. Wang KK W, Villalobo A, Roufogalis BD (1989) *Biochem J* **262**: 693-706
57. Boivin P, Galand C, Dhermy D (1990) *Int J Biochem* **22**: 1479-1489
58. Cottin P, Poussard S, Mornet D, Brustis JJ, Mohammadpour M, Leger J, Ducasting A (1992) *Biochimie* **74**: 565-570
59. Suzuki K, Shimizu K, Hamamoto T, Nakagawa Y, Murachi T, Yamamuro T (1992) *Biochem J* **285**: 857-862
60. Pant HC (1988) *Biochem J* **256**: 665-668
61. Adachi Y, Kobayashi N, Murachi T, Hatanaka M (1986) *Biochem Biophys Res Commun* **136**: 1090-1096
62. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) *Science* **234**: 364-369
63. Wolfe FH, Szpacenko A, McGee K, Goll DE (1989) *Life Sci* **45**: 2093-2101
64. Kumamoto T, Kleese WC, Cong J, Goll DE, Pierce PR, Allen RE (1992) *Anat Rec* **232**: 60-77
65. Chakrabarti AK, Yoshida Y, Powers JM, Singh I, Hogan EL, Banik NL (1988) *J Neurosci Res* **20**: 351-358
66. Lane RD, Allan DM, Mellgren RL (1992) *Exp Cell Res* **203**: 5-16
67. Goll DE, Dayton WR, Singh I, Robson RM (1991) *Biol Chem* **266**: 8501-8510
68. Baker JH, Margolis RN (1987) *Muscle Nerve* **10**: 34-40
69. Spalla M, Kuo TH, Wiener J (1987) *Muscle Nerve* **10**: 54-59
70. Tolnai S, von Althen I (1987) *Life Sci* **41**: 1117-1122
71. Hashimoto E, Yamamura H (1991) *Int J Biochem* **23**: 507-512
72. Togari A, Ichikawa S, Nagatsu T (1986) *Biochem Biophys Res Commun* **134**: 749-754
73. Rodgers GM, Cong J, Goll DE, Kane WH (1987) *Biochim Biophys Acta* **929**: 263-270
74. Iino M, Takano-Ohmuro H, Kawana Y, Endo M (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **185**: 713-718
75. Puri RN, Zhou F, Colman RF, Colman RW (1990) *Am J Physiol* **259**: C862-C868
76. Hirai S, Kawasaki H, Yaniv M, Suzuki K (1991) *FEBS Lett* **287**: 57-61
77. Watanabe N, Woude GFV, Ikawa Y, Sagata N (1989) *Nature (Lond)* **342**: 505-511
78. Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y (1977) *J Biol Chem* **252**: 7610-7616
79. Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, Nishizuka Y (1989) *J Biol Chem* **264**: 4088-4092
80. Pontermoli S, Melloni E, Sparatore B, Michetti M, Salamino F, Horecker BL (1990) *J Biol Chem* **265**: 706-712
81. Ito M, Tanaka T, Nunoki K, Hidaka H, Suzuki K (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **145**: 1321-1328
82. Wang KK W, Villalobo A, Roufogalis BD (1988) *Archiv Biochem Biophys* **260**: 696-704
83. Au KS (1987) *Biochim Biophys Acta* **905**: 273-278
84. Tallant EA, Brumley LM, Wallace RW (1988) *Biochemistry* **27**: 2205-2211
85. Hayashi M, Inomata M, Saito Y, Ito H, Kawashima S (1991) *Biochim Biophys Acta* **1094**: 249-256
86. Truscott RJW, Marcantonio JM, Tomlinson J, Duncan G (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **162**: 1472-1477
87. Beckerle MC, Burrige K, DeMartino GN, Croall DE (1987) *Cell* **51**: 569-577
88. Haeberle JR, Coolican SA, Evan A, Hathaway DR (1985) *J Muscle Res Cell Motil* **6**: 347-363
89. van der Westhuyzen DR, Matsumoto K, Etlinger JD (1981) *J Biol Chem* **256**: 11791-11797
90. Ilian MA, Forsberg NE (1992) *Biochem J* **287**: 163-171
91. Lynch CJ, Sobo GE, Exton JH (1986) *Biochim Biophys Acta* **885**: 110-120
92. Hamakubo T, Kannagi R, Murachi T, Matsumoto A (1986) *J Neurosci* **6**: 3103-3111
93. Kamakura K, Ishiura S, Sugita H (1986) *J Neurosci Res* **15**: 167-173
94. Swanson GJ, Vrbova G (1987) *Dev Brain Res* **33**: 199-203
95. Domańska-Janik K, Nechaud B, Inomata M, Kawashima S, Zalcowska T (1992) *Mol Chem Neuro-pathol* **16**: 273-288
96. Sheppard A, Wu J, Rutishauser U, Lynch G (1991) *Biochim Biophys Acta* **1076**: 156-160
97. Staubli U, Larson J, Thibault O, Baudry M, Lynch G (1988) *Brain Res* **444**: 153-158
98. Takauchi S, Miyoshi K (1989) *Acta Neuropathol* **78**: 380-387
99. Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, Klimpel KR, Thomas G (1992) *J Biol Chem* **267**: 16396-16402
100. Oda K (1992) *J Biol Chem* **267**: 17465-17471
101. Misumi Y, Oda K, Fujiwara T, Takami N, Tashiro K, Ikchaya Y (1991) *J Biol Chem* **266**: 16954-16959
102. Sakiyama H, Nishino Y, Tanaka T, Tomosawa T, Kinoshita H, Nagata K, Chiba K, Sakiyama S (1989) *Biochim Biophys Acta* **990**: 156-161
103. Kinoshita H, Sakiyama H, Tokunaga K, Imajoh-Ohmi S, Hamada Y, Isono K, Sakiyama S (1989) *FEBS Lett* **250**: 411-415
104. Clawson GA, Norbeck LL, Hatem CL, Rhodes C, Amiri P, McKerrow JH, Patierno SR, Fiskum G (1992) *Cell Growth Differentiation* **3**: 827-838
105. Peach RJ, Brennan SO (1989) *Biochim Biophys Acta* **990**: 276-279

The 1994 Miami Bio/Technology winter Symposium on Advance in Gene Technology: Molecular Medicine.

Miami Beach, Florida, USA, 6-11 February 1994

Info: Miami Bio/Technology Winter Symposia, P O B 016129, Miami, FL 33101, USA

Wielofunkcyjne białko RecA *Escherichia coli* — budowa i funkcje

Multifunctional *Escherichia coli* RecA protein — structure and functions

HANNA SZPILEWSKA*
DOROTA KUCZYŃSKA-WIŚNIK*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa i charakterystyka białka RecA
 - II-1. Hydroliza NTP
 - II-2. Udział RecA w odpowiedzi SOS
 - II-2.1. Stabilna replikacja DNA
 - II-2.2. Mutageneza SOS
 - II-2.3. Naprawa rekombinacyjna DNA
- III. Udział białka RecA w rekombinacji
 - III-1. Wiązanie RecA z DNA
 - III-2. Proces wymiany nici
- IV. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure and characterization of RecA protein
 - II-1. NTP hydrolysis
 - II-2. Involvement of RecA protein in SOS response
 - II-2.1. Stable DNA replication
 - II-2.2. Mutagenesis SOS
 - II-2.3. Recombinational repair DNA
- III. Involvement of RecA protein in recombination
 - III-1. Binding of RecA to DNA
 - III-2. Branch migration process
- IV. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: ssDNA — jednoniciowy DNA, dsDNA — dwuniciowy DNA, rNTP — trójfosforany rybonukleotydów, Ssb — białko wiążące jednoniciowy DNA, iSDR — indukowana stabilna replikacja (ang. *inducible stable DNA replication*), replisom — kompleks enzymatyczny prowadzący replikację

I. Wstęp

Gen *recA* bakterii *Escherichia coli* został odkryty i nazwany ponad ćwierć wieku temu [1]. Został on sklonowany przez McEntee w 1976 roku [2]. W pierwszych publikacjach białko to nazywano białkiem X — dopiero Sedgwick udowodnił w 1978 r., że białko X jest produktem genu *recA* [3]. Białko zostało oczyszczone [4-6].

Białko RecA posiada liczne aktywności enzymatyczne: wiąże się z jedno- i dwuniciowym DNA, hydrolizuje ATP i UTP, katalizuje renaturację zdenaturowanego DNA, przeprowadza asymilację jednoniciowego DNA do komplementarnego dsDNA, stymuluje proteolizę białek bakteryjnych (LexA i UmuD) oraz fagowych (represor cI faga λ) [7, 8].

Dzięki tym właściwościom RecA odgrywa w komórce szereg istotnych funkcji: uczestniczy w homologicznej rekombinacji genetycznej, w naprawie DNA, odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi SOS [9].

II. Budowa i charakterystyka białka RecA

RecA jest białkiem o masie 37842 Da. Zbudowane jest z 352 aminokwasów [10, 11], wśród których charakterystyczna jest niewielka zawartość tyrozyny (7) i tryptofanu (2). W roztworach RecA przyjmuje różne formy w zależności od buforu i stężenia soli, Brenner [17] scharakteryzował cztery różne agregaty tworzone przy braku DNA: monomery, pierścienie o średnicy 12 nm zawierające 5 do 8 monomerów, pręty o średnicy 10 nm i długości 50-200 nm i duże wiązki prętów.

Z analizy pierwszorzędowej struktury RecA, modyfikacji chemicznych oraz analizy mutantów uzyskano liczne informacje pozwalające na zlokalizowanie funkcjonalnych domen w białku. Dodatkowo przeanalizowano białka będące analogami RecA a występujące u innych *Enterobacteriaceae*. Dane te pozwoliły na stwierdzenie, że RecA posiada dwa regiony o niskim stopniu homologii (około 40 końcowych reszt przy końcu C i około 30 początkowych z końca N). Usunięcie około 50 aminokwasów z końca karboksylowego daje funkcjonalne białko [12]. Miejsce wiązania ATP to reszty 66-73 wiążące grupy fosforanowe i regiony 106-170 i 257-280 wiążące część cukrową. Znajduje się tu sekwencja:

⁶⁶Gly-Pro-Glu-Ser-Ser-Gly-Lys-Thr, zgodna z tzw. „motywem A” (Gly/Ala-X-X-X-X-Gly-Lys-Thr/Ser gdzie X oznacza dowolny aminokwas) występującym u wielu innych ATP-az a odpowiedzialnym za wiąza-

* mgr, Katedra Biochemii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

nie reszty fosforanowej NTP [13]. Potencjalne miejsca wiązania ssDNA to reszty 195-209, natomiast region 156-165 tworzy miejsce wiązania dsDNA [12]. Za oddziaływanie — łączenie się RecA odpowiedzialne są pierwsze 33 aminokwasy N-terminalne [14, 15]. Prawdopodobnym miejscem wiązania białek, których proteolizę RecA przeprowadza (LexA, UmuD, cI) jest region pomiędzy 229 i 243 aminokwasem [12]. *Cazaux* [16] donosi, że istotny dla funkcji RecA jest region wokół aminokwasu 204, który ma znaczenie zarówno w funkcji koproteazy jak i rekombinacji. Struktura krystaliczna RecA została przebadana z rozdzielczością 2,3 Å, ale analiza strukturalna i funkcjonalna białka jest utrudniona z powodu nakładania się domen funkcjonalnych [12].

II-1. Hydroliza NTP

RecA przeprowadza hydrolizę większości naturalnie występujących rNTP i dNTP [18]. *In vitro* reakcja jest stymulowana zarówno przez ssDNA, jak i dsDNA [9, 7]. Hydroliza ATP w obecności ssDNA przebiega niezależnie od pH, jest umiarkowanie zależna od stężenia soli oraz liniowo zależna od ilości RecA. Hydroliza UTP w obecności ssDNA przebiega najwydajniej w pH = 6.2 (lub wyższym) i nie wykazuje liniowej zależności od RecA. W obecności dsDNA hydroliza ATP i UTP zależy od stężenia soli, nie jest liniowo zależna od ilości RecA a pH optymalne dla reakcji wynosi 6.2. RecA hydrolizuje ATP również przy braku DNA ale reakcja zachodzi wtedy bardzo wolno (w pH = 7,5 prędkość hydrolizy jest zmniejszona 2000 razy). RecA posiada pojedyncze miejsce aktywne dla wiązania i hydrolizy NTP, dlatego ATP i UTP hamują wzajemnie swoją hydrolizę a niehydrolizowany analog ATP — ATP γ S jest kompetencyjnym inhibitorem hydrolizy [9, 7]. ADP i ATP stabilizują odmienne konformacje białka RecA — RecA wiążąc ATP uzyskuje wysokie powinowactwo do DNA. Za istnieniem takiego allosterycznego mechanizmu przemawia to, że domeny w cząsteczce białka odpowiedzialne za wiązanie ATP i DNA położone są blisko siebie [13]. *Roca i Cox* [9] wysuwają hipotezę, że hydroliza ATP zachodzi w filamencie RecA jak „koordynowana fala”, gdzie hydroliza w jednym monomerze RecA powoduje hydrolizę ATP w kolejnym sąsiednim monomerze, zaś odstęp między falami wynosi 6-12 monomerów.

II-2. Udział RecA w odpowiedzi SOS

RecA odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi SOS w komórce [19-21]. System SOS jest odpowiedzią komórki na zahamowanie replikacji na skutek uszkodzenia DNA lub działania inhibitorów. Najogólniej proces ten polega na derepresji około 20 nieliniowo położonych genów, będących pod kontrolą represora LexA, w wyniku czego dochodzi do naprawy DNA, mutagenyzy, zahamowania podziałów, indukcji

stabilnej replikacji, zahamowania restrykcji, indukcji niektórych kolicyn oraz indukcji profagów. Białko LexA jest represorem genów SOS (w tym genów *lexA* i *recA*) i dopiero po uszkodzeniu DNA lub zahamowaniu jego replikacji dochodzi do ich odblokowania. W komórce pojawiają się wówczas sygnały indukujące (ssDNA i dNTP), pod wpływem których białko RecA przechodzi w formę aktywowaną (RecA*) i w tej postaci stymuluje LexA, do proteolizy. Kiedy RecA* doprowadza do niszczenia LexA, dochodzi do odblokowania genów SOS i uruchomienia poszczególnych mechanizmów SOS. Po przywróceniu replikacji spada poziom sygnałów indukujących, RecA przechodzi w formę nieaktywowaną, rośnie ilość LexA w komórce co prowadzi do ponownej represji genów SOS przez LexA [18, 19]. Dokładniej udział RecA w procesie regulacji systemu SOS przedstawiła niedawno na łamach „*Postępów Biochemii*” E. Grzesiuk [22].

Do uruchomienia odpowiedzi SOS niezbędna jest aktywowana forma białka RecA — RecA*. Aktywacja RecA polega na zmianie konformacji białka w wyniku oddziaływania RecA z ssDNA w obecności dNTP. *In vitro* RecA przechodzi w formę aktywowaną w obecności ssDNA i dNTP, przypuszcza się więc, że *in vivo* takimi sygnałami indukującymi aktywację RecA są jednoniciowe fragmenty powstałe w wyniku uszkodzenia DNA oraz gromadzące się z powodu zablokowania replikacji dNTP [23]. RecA* w obecności ATP, ssDNA i Mg²⁺ pełni rolę koproteazy, stymulując proteolizę trzech białek: represora LexA, białka UmuD oraz represora cI faga λ . Mechanizm reakcji proteolizy stymulowanej przez RecA jest zbliżony do reakcji proteaz serynowych [24].

Poza uruchomieniem odpowiedzi SOS RecA uczestniczy w następujących procesach SOS: naprawie rekombinacyjnej uszkodzonego DNA, mutagenyzy SOS oraz indukowanej stabilnej replikacji (iSDR).

II-2.1. Stabilna replikacja DNA

Sygnał SOS wywołuje w komórce indukowaną stabilną replikację (iSDR, ang. *inducible stable DNA replication*). Jest to replikacja, która w odróżnieniu od replikacji zależnej od miejsc *oriC* i białka DnaA, przeważającej w komórce, nie wymaga syntezy białka [25]. Replikacja ta rozpoczyna się z innych miejsc replikacji, zwanych *oriM*. Dla uruchomienia i utrzymania iSDR niezbędna jest obecność aktywowanej formy białka RecA (RecA*). Rola RecA* polega najprawdopodobniej na przekształceniu replisomu tak, że obniża zarówno wierność replikacji DNA, jak i wymagania co do reinicjacji. Taka modyfikacja wymaga albo RecA* jako składnika replisomu albo proteolitycznego przekształcenia jednego lub więcej białek replisomu. Ponieważ jednocześnie odkryto, że w iSDR uczestniczy RecBC sugeruje się, że być może zaangażowana jest tu rekombinacyjna funkcja RecA [26].

II-2.2. Mutageneza SOS

W trakcie odpowiedzi SOS dochodzi do zatrzymania replikacji w miejscu uszkodzenia DNA. Może wtedy dojść do wbudowywania nieprawidłowych zasad naprzeciw uszkodzenia w matrycowym DNA czyli do powstawania mutacji (jest to mutageneza SOS). Aby replikacja mogła przebiegać dalej konieczne jest zablokowanie aktywności korektorskiej polimerazy III (jest ona odpowiedzialna za usuwanie nieprawidłowej zasady z nowo zsyntetyzowanego DNA). Możliwe jest to po utworzeniu nukleoproteinowego kompleksu tzw. mutasomu, który tworzą: białko RecA, białka UmuC i UmuD' oraz polimeraza III [27]. Rola RecA w tym procesie i przebieg mutagenezy zostały opisane w cytowanej uprzednio pracy E. Grzesiuk [22] oraz w [28-33].

II-2.3. Naprawa rekombinacyjna DNA

Rekombinacja homologiczna, możliwa dzięki białku RecA, służy do naprawy uszkodzeń DNA, gdy nie istnieje nienaruszona komplementarna nić i informacja potrzebna do usunięcia uszkodzenia pochodzi z innej cząsteczki DNA. Ten rodzaj naprawy dotyczy dwuniciowych uszkodzeń DNA (np. wiązania poprzeczne lub podwójne pęknięcia DNA powstałe w wyniku działania np. promieni jonizujących lub czynników chemicznych) oraz DNA z przerwami powstałymi w trakcie replikacji, gdy replikacja zatrzymywana jest przy każdym uszkodzeniu DNA i zaczyna się od nowego fragmentu Okazaki (jest to druga możliwa droga wznowienia replikacji w miejscu uszkodzenia obok opisanej w III.3.2.) [19, 9].

W komórce *E. coli* znajduje się około 1200 kopii białka RecA, co stanowi 0.02% wszystkich białek. Po indukcji odpowiedzi SOS następuje prawie 100-krotny wzrost ilości RecA w komórce co stanowi 1-2% wszystkich białek *E. coli* [34]. Po indukcji SOS 90% białka RecA znajduje się w cytoplazmie a około 10% w obu błonach, z czego 95% we frakcji błon wewnętrznych [35]. Według badań Garvey [35] w warunkach odpowiedzi SOS frakcje błon komórkowych wykazują podwyższony poziom RecA. Ta zwiększona asocjacja RecA z błonami wymaga aktywowanej formy białka (RecA*). RecA występujące w błonach wiąże się specyficznie z kwaśnymi fosfolipidami, takimi jak kardiopolipina i fosfatydyloglicerol. Wiązanie to zachodzi w obecności dwuwartościowych kationów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Jednocześnie wiązanie przez RecA fosfolipidów uniemożliwia oddziaływanie białka z DNA, co sugeruje, że fosfolipidy oddziałują z miejscem wiązania DNA w cząsteczce RecA [36]. Fizjologiczna funkcja wiązania fosfolipidów przez RecA w trakcie odpowiedzi SOS pozostaje niewyjaśniona.

III. Udział białka RecA w rekombinacji

Wymiana nici jest kombinacją trzech istotnych mole-

kularnych procesów: homologicznego sparowania dwóch cząsteczek DNA, wymiany nici polegającej na wymianie pojedynczych zasad między dwoma termodynamicznie równoważnymi partnerami, i rotacji DNA. Rotacja wynika z helikalnej budowy DNA. W zasadzie którykolwiek, każdy lub żaden z tych procesów może być powiązany z hydrolizą ATP przez RecA [9]. W typowej wymianie 3 nici zachodzącej *in vitro* następuje hydroliza około 100 ATP na jedną parę zasad tworzonego heterodupleksu DNA [37]. Aktywną formą RecA jest filament nukleoproteinowy, gdzie DNA jest położone w wewnętrznej przestrzeni filamentu, który może angażować tysiące monomerów RecA [9].

Zaproponowano również, że białko RecA dzięki swojemu udziałowi w rekombinacji, jest potrzebne do właściwego rozdziału chromosomu do dwóch komórek potomnych [38].

III-I. Wiązanie RecA z DNA

RecA wiąże się z jednoniciowym DNA (ssDNA) oraz dwuniciowym (dsDNA) [9]. Wiązanie RecA z ssDNA zachodzi *in vitro* bez udziału dodatkowych kofaktorów. Kompleksy RecA/ssDNA powstają również w obecności dNTP ale obserwuje się wtedy ich przyspieszoną dysocjację: przy braku dNTP czas półtrwania kompleksu wynosi 10 min., natomiast w ich obecności maleje do około 20 sekund [7]. RecA wiąże się z DNA wzdłuż mniejszego rowka i szkieletu fosforanowego, z zasadami dostępnymi w głównym rowku filamentu [9]. Tworzenie filamentu następuje w kierunku 5'-3' na ssDNA oraz na dsDNA z przerwą (w stosunku do nici inicjującej leżącej naprzeciw przerwy, gdzie rozpoczyna się tworzenie filamentu) [9]. Podobnie przebiega tworzenie kompleksów RecA/dsDNA z jednoniciową przerwą gdzie nukleoproteinowy filament tworzy się w miejscu uszkodzenia [9]. Inaczej natomiast zachodzi wiązanie RecA do nieuszkodzonego dsDNA: proces jest zależny od pH (pH optymalne wynosi 6.2), jest wrażliwy na stężenie soli oraz wymaga obecności ATP, UTP lub ATP γ S (stabilizującego kompleks RecA/DNA) [18, 39, 40]. Stabilne wiązanie w obecności ATP wymaga systemu regeneracji ATP aby zapobiec akumulacji ADP. Reakcja ta zachodzi jednak bardzo wolno (dlatego uważano początkowo, że RecA nie wiąże dsDNA), wyjątek stanowi tu dsDNA z zakłóceniami w strukturze takimi jak rejony bogate w pary A-T [41], uszkodzenia lub rejony tworzące formę Z DNA [9, 7] lub podwyższenie temperatury [41]. Z jednym monomerem RecA wiąże się — w przypadku dsDNA 6 [42] lub według [43] 8 nukleotydów, natomiast dla ssDNA 3-4 nukleotydy [6].

Oglądany w mikroskopie elektronowym kompleks RecA-dsDNA jest prawoskrętną helisą, której jeden skręt zawiera 6,2-6,4 cząsteczek RecA i 18,6 par zasad DNA [42]. Długość konturu kompleksu jest o 50% dłuższa niż natywnego dsDNA. Egelman i Sta-

siak [44] donieśli, że skok i średnica helikalnego filamentu kompleksu RecA-dsDNA wynosiły odpowiednio 9,5 i 11,5 nm. Wymiary helisy są zmienne i zależą od stężenia jonów Mg^{++} , kofaktora nukleotydowego, pH lub obecności SSB [9]. Helikalna struktura kompleksu RecA/DNA jest różna w zależności od tego, czy uczestniczy w nim ssDNA czy dsDNA [45, 46]. Analiza rozpraszania neutronów pod małymi kątami umożliwiła rozróżnienie dwóch struktur helikalnych RecA: kompleksu z DNA w obecności ATP γ S z około 6 cząsteczkami RecA przypadającymi na jeden skręt helisy i odpowiadającego aktywnej formie enzymu oraz drugiej formy (związanego z ssDNA przy braku ATP, lub z ATP γ S przy braku DNA lub samego białka) z około 5 cząsteczkami RecA przypadającymi na skręt, co odpowiadało warunkom nieaktywnego enzymu [47]. Filament efektywnie usuwa inne białka wiążące DNA [9].

III-2. Proces wymiany nici

RecA stymuluje zarówno renaturację komplementarnego ssDNA jak i wymianę nici DNA pomiędzy homologicznymi cząsteczkami ssDNA i dsDNA. Jest to proces wieloetapowy składający się z: pokrycia ssDNA przez białko RecA, homologicznego dopasowania i wymiany nici DNA, polarnego wydłużenia połączonego heterodupleksu DNA [48]. Na początku RecA wiąże się z ssDNA w etapie zwanym presynapsą. ATP lub jego niehydrolizowalny analog ATP γ S zwiększa stabilność tego oddziaływania [49] i jest wymagany do utworzenia kompleksu, który jest aktywny w parowaniu DNA [50, 51]. Wiązanie ATP przez RecA indukuje stan wysokiego powinowactwa do wiązania DNA, co reprezentuje „aktywną” formę białka, które jest zdolne zarówno do wymiany nici DNA jak i ułatwia cięcie represora [48]. Ten stan umożliwia białku RecA usunięcie białka SSB oraz rozwinięcie dupleksu DNA. Białko RecA może być aktywowane przez NTP [15] lub *in vitro* odpowiednio przez wysokie stężenie soli [52] lub RNA i heparynę [53]. Kompleks hydrolizuje ATP z prędkością 25-30 cząsteczek ATP/min/monomer RecA [17, 41]. Według Kim i wsp. [54] hydroliza ATP przez RecA w wymianie nici służy do umożliwienia ominięcia strukturalnych barier, które mogą się pojawić w czasie naprawy rekombinacyjnej DNA oraz jest istotna w wymianie nici w przypadku udziału 4 nici DNA [55]. Gdy ATP jest hydrolizowane, powinowactwo powstałego kompleksu ADP-RecA-DNA jest zmniejszone i RecA może potencjalnie oddysocjować z ssDNA [48]. Kompleks presynapsy jest wrażliwy na obecność ADP — rozpada się, gdy stosunek ADP do ATP przekracza 1:3,3 [39]. Stąd ATP i inne NTP [15] w reakcji wymiany nici za pośrednictwem RecA odgrywają rolę cyklicznego czynnika, którego wiązanie i hydroliza modulują powinowactwo RecA do ssDNA [48]. Energia hydrolizy ATP nie jest wykorzystywana

per se w reakcji wymiany nici [48]. Kompleks presynapsy wydaje się istotny w następnych reakcjach szukania homologii i polarnego transferu nici. Lauder i Kowalczykowski [56] zauważyli, że poszczególne podjednostki w obrębie filamentu presynapsy białka RecA są sobie nierównoważne (filament jest asymetryczny względem powinowactwa do NTP), co mogłoby wyjaśnić jak białko RecA jest w stanie rozróżniać różne cząsteczki DNA podczas parowania homologicznego. Gdy sekwencja komplementarna do ssDNA będącego w kompleksie z RecA jest obecna w innej cząsteczce DNA, kompleks presynapsy tworzy połączenie z DNA. Po tym następuje ukierunkowany transfer nici, który zachodzi w kierunku od 5' do 3' w stosunku do ssDNA w kompleksie presynapsy aby ukończyć wymianę nici równocześnie z hydrolizą ATP [11]. W następnej fazie wymiany nici DNA, synapsie substratów DNA, rozciągnięty helikalny filament ssDNA-RecA aktywnie uczestniczy w parowaniu z inną cząsteczką DNA aby utworzyć kompleks nukleoproteinowy zawierający 2 cząsteczki DNA. Powstająca połączona cząsteczka heterodupleksowa DNA (zawierająca po nici z każdej cząsteczki rodzicielskiej) jest powiększana. Wymaga to ciągłej hydrolizy ATP i przebiega z prędkością około 10 par zasad/s [9]. Powiększanie heterodupleksu przebiega w kierunku 5'-3' w stosunku do usuniętej (niekomplementarnej) nici [57]. Polarność reakcji zależnej od białka RecA prawie na pewno wynika z ukierunkowanego wiązania RecA na ssDNA [58] oraz hydrolizy ATP [59].

Howard-Flanders i wsp. [60] zaproponowali model mechanizmu transferu nici przez RecA opierając się na założeniu, że monomer RecA ma 2 miejsca wiązania DNA, gdzie może wiązać ssDNA jak i dsDNA. Istnienie takich miejsc potwierdziły doświadczenia Müllera [61].

Horii [11] proponuje alternatywny model oparty na założeniu, że monomer RecA posiada pojedynczą domenę dla wiązania łańcucha polinukleotydowego oraz że w obecności ATP dwie cząsteczki RecA tworzą dimer jako podstawową jednostkę wiązania z DNA i wiązanie RecA do łańcucha polinukleotydowego indukuje strukturalną zmianę białka RecA, która powoduje większe powinowactwo do następnej cząsteczki RecA. Model ten wyjaśnia polarną polimeryzację białka RecA na ssDNA i polarny transfer nici DNA przez RecA oraz tworzenie cząsteczki połączonej DNA oraz kinetykę reakcji wymiany nici [11].

Białko SSB wpływa na prawie wszystkie procesy zależne od RecA: hamuje renaturację DNA promowaną przez RecA; stymuluje aktywność ATP-azy zależnej od ssDNA [62] i wymianę nici [63]. W warunkach umożliwiających wymianę nici, RecA kolejno usuwa związane SSB tworząc nasycony nukleoproteinowy filament [58, 64, 41, 65]. Ten nasycony kompleks jest bardziej stabilny niż nieciągły kompleks tworzony przy braku SSB [66].

In vitro tworzenie heterodupleksu DNA wymaga

3 wyraźnych funkcji enzymatycznych: na początku aktywność helikazy enzymu RecBCD inicjuje tworzenie heterodupleksu DNA przez rozwijanie liniowej dwuniciowej cząsteczki DNA do przejściowej formy jednociowego DNA; następnie RecA wiąże to DNA zanim ponownie się ono sparuje; na końcu RecA katalizuje reakcję parowania cząsteczki DNA z inną cząsteczką ssDNA, po czym następuje renaturacja tych cząsteczek aby utworzyć heterodupleks [67]. Enzym RecBCD dostaje się na cząsteczkę liniowego dsDNA na jej końcu i porusza się szybko wzdłuż cząsteczki rozwijając DNA. W obecności SSB, ponowne parowanie ssDNA za enzymem nie zachodzi, powstają cząsteczki ssDNA całkowicie pokrytego SSB [67, 68, 48]. RecBCD uczestniczy też w późniejszej fazie rekombinacji, przy rozdzielaniu rekombinantów [69, 70]. Białko RecA jest czynnikiem koniecznym w naprawie rekombinacyjnej. Uczestniczą w niej, poza białkiem RecA produkty genów: recB, recC, recD, recF, recN, recJ i ruv [70].

IV. Podsumowanie

Białka o podobnej funkcji i strukturze jak białko RecA *Escherichia coli* odkryto u bardzo licznych gatunków *Prokariota* (patrz [9, 71]). Te analogi RecA wykazują aktywność w rekombinacji homologicznej oraz zapewniają bakteriom odporność na czynniki uszkodzające DNA. Ponadto u licznych *Eukariota* (od drożdży po człowieka) stwierdzono obecność białek stymulujących wymianę nici DNA. Wszegobecność oraz wysoki stopień homologii analogów RecA sugeruje, że gen recA powstał bardzo wcześnie w toku ewolucji, być może przed rozejściem się dróg *Prokariota* i *Eukariota*.

Ponieważ RecA i białka o podobnej funkcji występujące u innych bakterii odgrywają tak ważną rolę w rekombinacji homologicznej oraz naprawie uszkodzonego DNA można przypuszczać, że białka te są ważnym czynnikiem warunkującym genetyczną różnorodność oraz ewolucję bakterii. Udział RecA w naprawie uszkodzonego DNA sugeruje także, że gen ten zapewnia bakteriom odporność na czynniki uszkodzające DNA (np. promieniowanie UV) a co za tym idzie opanowanie coraz to nowych ekosystemów [71].

Pomimo, że ostatnie lata przyniosły wiele nowych informacji o budowie, funkcjach oraz procesach w których RecA *E. coli* uczestniczy, białko to nadal wymaga dalszych badań min. nad oddziaływaniami RecA/DNA, rekombinacją i naprawą DNA czy iSDR.

Artykuł otrzymano 18 stycznia 1993 r.
Zaakceptowano do druku 25 maja 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Clark AJ, Margulies AD (1965) *Proc Natl Acad Sci USA* **53**: 451-459

2. McEntee K, Hesse JE, Epstein W (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 3979-3983
3. Sedgwick SG, Levine A, Bailone A (1978) *Molec Gen Genet* **160**: 267-276
4. Weinstock GM, McEntee K, Lehman IR (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 126-130
5. Shibata T, DasGupta C, Cunningham RP, Radding CM (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2606-2610
6. West SC, Cassuto E, Mursalim J, Howard-Flanders P (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2569-2573
7. Weinstock GM (1982) *Biochimie* **64**: 611-616
8. Little JW (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1375-1379
9. Roca AI, Cox MM (1990) *Critical Rev Biochem Mol Biol* **25** (6): 415-456
10. Sancar A, Stachelek C, Konigsberg W, Rupp WD (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2611-2615
11. Horii T (1991) *Biochimie* **73**: 177-185
12. Story RM, Weber IT, Steitz TA (1992) *Nature* (Lond) **355**: 318-325
13. Story RM, Steitz IT (1992) *Nature* (Lond) **355**: 374-376
14. Kawashima H, Horii T, Ogawa T, Ogawa H (1984) *Mol Gen Genet* **193**: 288-292
15. Kowalczykowski SC (1991) *Annu Rev Biophys Chem* **20**: 539-575
16. Cazaux C, Defais M (1992) *J Mol Biol* **223**: 823-829
17. Brenner SL, Mitchell RS, Morrical SW, Neuen-dorf SK, Schutte BC, Cox MM (1987) *J Biol Chem* **262**: 4011-4016
18. Weinstock GM, McEntee K, Lehman IR (1981) *J Biol Chem* **256**: 8829-8834
19. Walker GC (1984) *Microbiol Rev* **48**: 60-93
20. Witkin EM (1991) *Biochimie* **73**: 133-141
21. Janion C (1992) *Postępy Biochemii* **38** (2): 55-58
22. Grzesiuk E, *Postępy Biochemii* **38** (2): 59-64
23. Sassanfar M, Roberts JW (1991) *J Bacteriol* **173**: 5869-5875
24. Little JW (1991) *Biochimie* **73**: 411-422
25. Kogoma T, Lark KG (1975) *J Mol Biol* **94**: 243-256
26. Magee TR, Kogoma T (1990) *J Bacteriol* **172**: 1834-1839
27. Rajagopalan M, Lu Ch, Woodgate R, O'Donnell M, Goodman MF, Echols H (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10777-10781
28. Nohmi T, Battista JR, Dodson LA, Walker GC (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1816-1820
29. Dutreix M, Moreau PL, Bailone A, Galibert F, Battista JR, Walker GC, Devoret R (1989) *J Bacteriol* **171**: 2415-2423
30. Sweasy JB, Witkin EM, Sinha N, Roegner-Ma-niscalco V (1990) *J Bacteriol* **172** (6): 3030-3036
31. Witkin EM (1989) *Environmental and Molecular Mutagenesis* **14**: 30-34
32. Bailone A, Sommer S, Knežević J, Devoret R (1991) *Biochimie* **73**: 471-478
33. Bailone A, Sommer S, Knežević J, Dutreix M, Devoret R (1991) *Biochimie* **73**: 479-484
34. Salles B, Paoletti C (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 65-69
35. Garvey N, John A, Witkin E (1985) *J Bacteriol* **163** (3): 870-876
36. Krishna P, van de Sande JH (1990) *J Bacteriol* **172**: 6452-6458
37. Cox MM (1991) *Molec Microb* **5** (6): 1295-1299
38. Zyskind JW, Svitol AL, Steine WB, Biery MC, Smith DW (1992) *Molec Microb* **6** (17): 2525-2537
39. Wu A M, Kahn R, DasGupta C, Radding CM (1982) *Cell* **30**: 37-44
40. Pugh BF, Cox MM (1988) *J Mol Biol* **203**: 479-493
41. Kowalczykowski SC, Krupp RA (1987) *J Mol Biol* **193**: 97-113
42. DiCapua E, Engedl A, Stasiak A, Koller T (1982) *J Mol Biol* **157**: 87-103
43. Pugh BF, Cox MM (1987) *J Biol Chem* **262**: 1326-1336
44. Egelman EH, Stasiak A (1986) *J Mol Biol* **191**: 677-697
45. Hewat E, Ruigrok RWH, DiCapua E (1991) *EMBO J* **10** (9): 2695-2698
46. Egelman EH, Yu X (1989) *Science* **245**: 404-407
47. DiCapua E, Schnarr M, Ruigrok RWH, Lindner

- P, Timmins PA (1990) *J Mol Biol* **214**: 557-570
48. Eggleston AK, Kowalczykowski SC (1991) *Biochimie* **73**: 163-176
 49. Menetski JP, Kowalczykowski SC (1985) *J Mol Biol* **181**: 281-295
 50. Shibata T, DasGupta C, Cunninham RP, Radding CM (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1638-1642
 51. McEntee K, Weinstock GM, Lehman IR (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 857-861
 52. DiCapua E, Ruigrok RWH, Timmins PA (1990) *J Struct Biol* **104**: 91-96
 53. DiCapua E, Cuillel M, Hewat E, Schnarr M, Timmins PA, Ruigrok RWH (1992) *J Mol Biol* **226**: 707-719
 54. Kim JI, Cox MM, Inman RB (1992) *J Biol Chem* **267** (23): 16438-16443
 55. Kim JI, Cox MM, Inman RB (1992) *J Biol Chem* **267** (23): 16438-16449
 56. Lauder SD, Kowalczykowski SC (1991) *J Biol Chem* **266** (9): 5450-5458
 57. West SC, Cassuto E, Howard-Flanders P (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 6149-6153
 58. Thresher RJ, Christiansen G, Griffith JD (1988) *J Mol Biol* **201**: 101-113
 59. Konforti BB, Davis RW (1992) *J Mol Biol* **227**: 38-53
 60. Howard-Flanders P, West SC, Stasiak A (1984) *Nature* (Lond) **309**: 215-220
 61. Müller B, Koller T, Stasiak A (1990) *J Mol Biol* **212**: 97-112
 62. Lavery PE, Kowalczykowski SC (1988) *J Mol Biol* **203**: 861-874
 63. Cox MM, Leman IR *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**: 3433-3437
 64. Tsang SS, Muniyappa K, Azhderian E, Gonda DK, Radding CM, Flory J, Chase JW (1985) *J Mol Biol* **185**: 295-309
 65. Muniyappa K, Williams K, Chase JW, Radding CM (1990) *Nucl Acid Res* **18** (13): 3967-3973
 66. Kowalczykowski SC, Krupp RA (1987) *J Mol Biol* **193**: 81-95
 67. Roman LJ, Kowalczykowski SC (1989) *J Biol Chem* **264** (31): 18340-18348
 68. Kowalczykowski SC, Roman LJ (1990) W: Molecular Mechanisms in DNA Replication and Recombination. Alan R. Liss, Inc, str. 357-373
 69. Walker GC (1985) *Ann Rev Biochem* **54**: 4-5-457
 70. Taylor AF, Smith GR (1990) *J Mol Biol* **211**: 117-134
 71. Miller RV, Kokojohn TA (1990) *Annu Rev Microbiol* **44**: 365-394

Aktywność biologiczna lipidów rezorcynolowych

Biological activity of resorcinolic lipids

ARKADIUSZ KOZUBEK*

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Wpływ lipidów rezorcynolowych na metabolizm kwasów nukleinowych
- III. Wpływ lipidów rezorcynolowych na aktywności białek enzymatycznych
- IV. Właściwości amfifilowe i wpływ lipidów rezorcynolowych na błony biologiczne
 - IV-1. Interakcja lipidów rezorcynolowych z fosfolipidami oraz dwuwarstwową błoną fosfolipidową
 - IV-2. Interakcja lipidów rezorcynolowych z białkami oraz błonami biologicznymi
- V. Lipidy rezorcynolowe jako modulatory utleniania lipidów
- VI. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Effect of resorcinolic lipids on nucleic acids metabolism
- III. Effect of resorcinolic lipids on activities of enzymatic proteins
- IV. Amphiphilic properties and the effect of resorcinolic lipids on biological membranes
 - IV-1. Interaction of resorcinolic lipids with phospholipids and phospholipid bilayer membrane
 - IV-2. Interaction of resorcinolic lipids with proteins and biological membranes
- V. Resorcinolic lipids as modulators of lipid oxidation
- VI. Concluding remarks

I. Wprowadzenie

Grupa związków biologicznych określana jako lipidy jest zgodnie z klasyfikacją Katesa [1] bardzo szeroką i niejednorodną. Obejmuje ona ogromną liczbę związków w tym i grupę związków nazywaną lipidami fenolowymi lub długołańcuchowymi fenolami

[2]. Do związków tych należą dwa główne typy — te, których łańcuch węglowodorowy jest izoprenoidowy, podobnie jak w α -tokoferolu, wywodzące się biogenetycznie ze szlaku kwasu mewalonowego oraz te, których łańcuch jest prosty, nieizoprenoidowy wywodzący się ze szlaku poliketydowego podobnie jak kwas 6-pentadecylsalicylowy.

Przedmiotem tego opracowania będą związki należące do jednej z klas nieizoprenoidowych lipidów fenolowych, a mianowicie lipidy rezorcynolowe, będące wyższymi homologami orcyny (1,3-dihydroksy-5-metylobenzenu). Początkowo sądzono, że lipidy

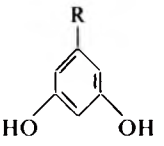
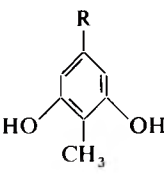
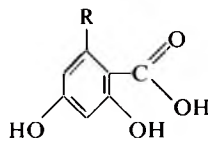
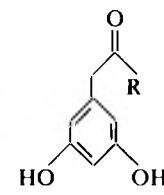
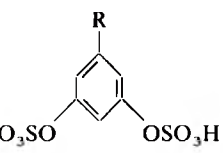
* doc. dr hab., Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

rezorcynolowe występują jedynie w świecie roślinnym, i to tylko u przedstawicieli jednej rodziny — *Anacardiaceae*. Pierwszym gatunkiem, u którego stwierdzono występowanie lipidów rezorcynolowych nazwanych bilobolami był *Ginkgo biloba* [3, 4]. Później wykazano obecność lipidów rezorcynolowych (5-n-alk-(en)ylorozorcynoli) również u innych gatunków należących do tej rodziny, jak również do innych rodzin królestwa roślin, w tym do roślin zbożowych [5-7]. Ich obecność stwierdzono również w świecie organizmów prokariotycznych. W trakcie badań regułą było nadawanie nowo wykazanym związkom różnych nazw, najczęściej wiążących się ze źródłem ich występowania. Tendencja ta doprowadziła do sytuacji, w której związki o chemicznie identycznej budowie czasami noszą kilka różnych nazw zwyczajowych. W tabeli 1 przedstawiono poszczególnych przedstawicieli lipidów rezorcynolowych wraz z ich nazwami zwyczajowymi. Cechą wspólną dotychczas poznanych lipidów rezorcynolowych jest ich występowanie w zewnętrznych warstwach owoców lub nasion.

Cząsteczki lipidów rezorcynolowych charakteryzują się posiadaniem prostego, nieparzystowęgłowego łańcucha węglowodorowego o długości zależnej od

Tabela 1.

Najczęściej występujące lipidy rezorcynolowe i ich nazwy zwyczajowe.

| | |
|---|---|
|  | bilobol C15 kardol C15 grewillol C13 persoonol C11 ardisiol C13 |
|  | metrylokardol C15 |
|  | kwas merulinowy A C17 kwas ginkgolowy C15 |
|  | 2-oksoalkilorezorcynol |
|  | panosialina C15 |

R — łańcuch zawierający nieparzystą liczbę atomów węgla (od 7 do 29). Najczęściej występują homologi C15-C23.

źródła pochodzenia lipidu. Łańcuch ten jest nasycony, lub może zawierać od jednego do trzech wiązań podwójnych, z reguły o konfiguracji cis ułożonych najczęściej przy atomach węgla C8, C11 i C14. Lipidy rezorcynolowe występują jako mieszaniny zawierające co najmniej kilka homologów. W większości materiałów za wyjątkiem roślin trawiastych (*Gramineae*), w tym zbóż oraz komórek bakteryjnych wykazano jedynie kilka typów homologów, najczęściej trzy, różniących się długością łańcuchów, lub (i) stopniem ich nienasycenia. Regułą jest występowanie pochodnych o 15 i 17 węglowych nasyconych i nienasyconych łańcuchów bocznych np. [8]. Trawy a szczególnie ziarniaki zbóż charakteryzują się występowaniem największej liczby homologów od C13 do C27, przy czym każdy z nich może występować jako nasycony, jednonienasycony oraz dwunienasycony [9-14]. Podobnie szerokie spektrum homologów występuje w komórkach bakterii z rodzaju *Azotobacter*, z tym że wykazano jedynie obecność homologów nasyconych [15-18]. Oprócz 5-n-alk(en)ylorozorcynoli zarówno w ziarniakach zbóż jak i komórek bakteryjnych stwierdzono występowanie mniejszych ilości ich pochodnych. W tabeli 2 przedstawiono występowanie dotychczas poznanych homologów lipidów rezorcynolowych. Należy zaznaczyć, że analiza chromatograficzna ekstraktów acetonowych z ziaren zbóż wykazuje obecność jeszcze co najmniej 4 pasm podobnie reagujących z solami dwuazoniowymi co alk(en)ylorozorcynole. Jednym z nich są ostatnio zidentyfikowane 5-(2-oksoalkilo)rezorcynole oraz 5-(2-oksoalkenilo)rezorcynole [19].

Zainteresowanym chemizmem, izolacją oraz analizą lipidów rezorcynolowych a także innych lipidów fenolowych polecam publikacje Tymana [2] oraz Lorenza i Hengtrakul [20].

Mimo wykazania obecności tych nietypowych związków lipidowych w coraz to większej ilości organizmów ich biologiczna aktywność i rola w fizjologii, oraz regulacji procesów metabolicznych jest poznana w niewielkim stopniu. Wykazanie występowania długołańcuchowych homologów orczy w ziarniakach zbóż [5-7], a szczególnie w produktach zbożowych opartych na frakcji przemiałowej otrąb [21, 22] powoduje, że istotnym problemem staje się poznanie i wyjaśnienie roli tych związków jako składników diety wprowadzanych wraz z pokarmem do organizmu zarówno ludzkiego jak i zwierząt hodowlanych — patrz np. [20].

Badania aktywności biologicznej lipidów rezorcynolowych wykazały ich silne cytotoksyczne i antynowotworowe działanie [23-25]. Najwyższą aktywność wykazano dla homologów zawierających 11 do 15 atomów węgla w łańcuchu ($ED_{50} < 10^{-5}$ M) przy czym stwierdzono, że wiązanie podwójne w łańcuchu bocznym czterokrotnie zwiększa działanie cytotoksyczne alkilorezorcynolu [25]. Wykazano również, że dla wykazywania aktywności antynowotworowej nie jest istotna obecność grup karboksylowych przy pierścieniu lipidu rezorcynolowego [23]. Ze względu na

Tabela 2.

Występowanie lipidów rezorcynolowych w materiałach biologicznych.

| Źródło | Rodzina | Rodzaj | | |
|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|
| rośliny wyższe | <i>Anacardiaceae</i> | <i>Anacardium</i> | | |
| | | <i>Gluta</i> | | |
| | | <i>Mangifera</i> | | |
| | | <i>Melanorrhoea</i> | | |
| | | <i>Camposperma</i> | | |
| | | <i>Pistacia</i> | | |
| | | <i>Araceae</i> | <i>Philodendron</i> | |
| | | | <i>Compositae</i> | <i>Baccharis</i> |
| | | | | <i>Gingko</i> |
| | | | | <i>Ginkgoaceae</i> |
| | <i>Triticum</i> | | | |
| | <i>Gramineae</i> | | | <i>Hordeum</i> |
| | | | | <i>Panicum</i> |
| | | | | <i>Agropyron</i> |
| | | | | <i>Bromus</i> |
| | | | | <i>Elymus</i> |
| | | <i>Dactylis</i> | | |
| | | <i>Arrhenatherum</i> | | |
| | | <i>Alopecurus</i> | | |
| | | <i>Festuca</i> | | |
| | | <i>Iridaceae</i> | <i>Iris</i> | |
| | | <i>Leguminosae</i> | <i>Ononis</i> | |
| | <i>Myrsinaceae</i> | <i>Rapanea</i> | | |
| | | <i>Ardisia</i> | | |
| | <i>Myristicaceae</i> | <i>Knema</i> | | |
| | | <i>Virola</i> | | |
| | <i>Primulaceae</i> | <i>Lysimachia</i> | | |
| | <i>Proteaceae</i> | <i>Grevillea</i> | | |
| | | <i>Hakea</i> | | |
| | | <i>Opisthiolepis</i> | | |
| | | <i>Persoonia</i> | | |
| | | <i>Cardwellia</i> | | |
| | | <i>Pterophila</i> | | |
| <i>Sphaerophorus</i> | | | | |
| <i>Evernia</i> | | | | |
| <i>Anzia</i> | | | | |
| mchy porosty | | <i>Basidiomycetes</i> | <i>Merulius</i> | |
| | | | <i>Phlebia</i> | |
| | | | <i>Phoma</i> | |
| | | | <i>Corticium</i> | |
| | | | <i>Verticiladiella</i> | |
| | | | <i>Streptomyces</i> | |
| | <i>Stemphylium</i> | | | |
| grzyby | <i>Actinomycetes</i> | <i>Hypnomyces</i> | | |
| | | <i>Sargassaceae</i> | | |
| glony | <i>Actinomycetes</i> | <i>Cystophora</i> | | |
| | | <i>Caulocystis</i> | | |
| bakterie | <i>Actinomycetes</i> | <i>Mycobacterium</i> | | |
| | | <i>Azotobacter</i> | | |
| | | <i>Pseudomonas</i> | | |

obszerność tematu, w tym opracowaniu omówione zostaną jedynie biochemiczne aspekty aktywności biologicznej lipidów rezorcynolowych.

II. Wpływ lipidów rezorcynolowych na metabolizm kwasów nukleinowych

Jednym z możliwych mechanizmów działania lipidów rezorcynolowych na komórki jest bezpośredni wpływ na strukturę i metabolizm kwasów nukleinowych. Badając siedemnastowęglowy kwas alkilorezorcynolowy (kwas merulinowy A) wykazano, że w stęże-

niach 100 µg/ml hamuje on całkowicie syntezę DNA, RNA a także syntezę białka w komórkach *Bacillus brevis* [26]. Podobnie inhibicyjne właściwości posiadają również 5-n-alkilorezorcynole co wykazano na przykładzie 5-n-decylorezorcynolu. Związek ten hamował całkowicie syntezę obu kwasów nukleinowych w izolowanych tymocytach szczurzych w stężeniu 50 µM [27]. Interesującą obserwacją jest wykazanie, że 5-n-tridecylo oraz 5-n-pentadecenylrezorcynole z *Hakea triufurcata* mają zdolność do stymulowanego przez jony Cu²⁺ nacinania nici replikacyjnej formy plazmidowego DNA ΦX174 [28], jak również DNA grasiczego (S z m i d z i ŋ s k i i K o z u b e k — dane niepublikowane). Aktywność ta jest silniejsza w obecności tlenu, co sugeruje istotną rolę w tym procesie wstępnego utlenienia pierścienia benzenowego przy węglu C-4. Również wzrost aktywności związany ze zwiększaniem długości łańcucha alifatycznego wskazuje, że interakcja cząsteczek alkilorezorcynoli z podwójną helisą DNA odbywa się poprzez wbudowanie łańcucha do jej wnętrza. Dokładny mechanizm nacinania łańcucha kwasu nukleinowego wymaga jednak jeszcze wyjaśnienia. Ostatnie badania wykazały, że lipidy fenolowe, w tym i alkilorezorcynole i ich pochodne w stężeniach rzędu mikrogramów/ml wykazują również zdolność do kompetycyjnej inhibicji odwrotnej transkryptyazy wirusów białaczki mysiej oraz ptasiej mieloblastozy [29, 30].

III. Wpływ lipidów rezorcynolowych na aktywności białek enzymatycznych

Pochodne 5-n-tridecylo, 5-n-pentadecylo oraz 5-n-nonadecylorezorcynolu o sulfonowanych obu grupach hydroksylowych, nazwane panosialiną [31, 32], wydzielane przez *Streptomyces* wykazują zdolność do hamowania aktywności takich enzymów jak sialidazy PR8, Narashino, HVJ, kwaśnej fosfatazy oraz poligalaktouronazy. Stężenie wymagane dla połowicznej inhibicji badanych enzymów wahało się od $0,6 \times 10^{-5}$ M do $5,6 \times 10^{-5}$ M i zależało głównie od długości łańcucha alifatycznego panosialin [31]. Również swoistość w stosunku do badanych enzymów zależała od długości łańcucha. Sialidaza PR8 hamowana była w stopniu odwrotnie proporcjonalnym do długości łańcucha podczas gdy stopień inhibicji pozostałych enzymów był do niej proporcjonalny. Wykazano również, że 5-n-alk(en)ylrezorcynole oraz alkilofenole z *Gingko biloba* wykazują zdolność do hamowania aktywności enzymów dehydrogenazowych, takich jak dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu, dehydrogenaza mleczanowa oraz dehydrogenaza izocytrynianowa [33]. Długołańcuchowe lipidy rezorcynolowe (C-10 — C-19) w stężeniach 10^{-4} M i niższych hamowały oddychanie komórek drożdży [34], bakterii (*Bacillus cereus*, *Micrococcus lysodikticus*) [35], tymocytów [27] oraz izolowanych mitochondriów. Związki te hamowały utlenianie NAD-zależnych substratów [36]

wykazując rotenonopodobne działanie.

IV. Właściwości amfifilowe i wpływ lipidów rezorcynolowych na błony biologiczne

Ponieważ szereg istotnych procesów metabolicznych komórki jest związanych pośrednio lub bezpośrednio z biologicznymi strukturami błonowymi, istotnym jest poznanie wpływu lipidów rezorcynolowych na strukturę i funkcję tych błon.

Obecność w cząsteczce lipidów rezorcynolowych wyraźnie oddzielonych regionów hydrofilowych (pierścieni dwuhydroksybenzenowy) oraz hydrofobowych (łańcuch alifatyczny) wskazują na amfifilowy charakter tych związków. Większość dotychczasowych badań w tym zakresie prowadzono na lipidach rezorcynolowych izolowanych z ziaren zbóż, tak więc dane dotyczą szerokiego spektrum homologów. Ze względu na małą polarność części hydrofilowej lipidy rezorcynolowe wykazują praktyczną nierozpuszczalność w wodzie. Wykazano, że związki te tworzą bardzo stabilne błonki monomolekularnej grubości [34, 37, 38]. W warstwach monomolekularnych pierścienie dwuhydroksybenzenowe długołańcuchowych cząsteczek lipidów rezorcynolowych zorientowane są prostopadle do powierzchni subfazy [38], a wielkość zajmowanej przez nie powierzchni zależy zarówno od długości łańcucha alifatycznego jak i stopnia jego nienasylenia. Przy tej samej wartości ciśnienia powierzchniowego cząsteczki o nienasyconych łańcuchach zajmują większą powierzchnię niż cząsteczki o łańcuchach nasyconych. Wzrost długości łańcucha alifatycznego również powoduje zwiększenie tej powierzchni [34]. Powierzchnia zajmowana przez cząsteczki lipidów rezorcynolowych zależy także od temperatury. W temperaturach do 5°C obserwuje się kondensację cząsteczek zawierających łańcuchy nasycone (graniczna powierzchnia 0.27 nm²), natomiast w temperaturach powyżej 35°C następuje jej zwiększenie do 0.40 nm² [37]. Obecność w łańcuchu wiązania podwójnego zapobiega kondensacji cząsteczek w niskich temperaturach [38]. Badając wpływ pH subfazy na właściwości jednowarstwowych błonek lipidów rezorcynolowych K a t o i w s p. wykazali, że obecność w cząsteczkach tych związków długich łańcuchów alifatycznych istotnie przesunęła wartości pK_a (od 9.3 wykazywanej dla rezorcynolu, do co najmniej 12) [38].

Lipidy rezorcynolowe charakteryzują bardzo niskie wartości krytycznego stężenia micelnego. Wartości CMC, wyznaczone dla różnych homologów przez badanie solubilizacji 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu, zawierały się w zakresie od 0.35 do 4.0 μM zależnie od długości i stopnia nienasylenia łańcucha alifatycznego (K i e l e c z a w a i K o z u b e k — dane niepublikowane). Wraz ze wzrostem pH roztworu wartości CMC ulegają 5-krotnemu zwiększeniu dla homologów jednonienasyconych, a 13-krotnemu dla homologów nasyconych.

IV-1. Interakcja lipidów rezorcynolowych z fosfolipidami oraz dwuwarstwową błoną fosfolipidową

Lipidy rezorcynolowe charakteryzując się wysokimi wartościami współczynnika podziału oktanol/woda [34] łatwo wbudowują się do dwuwarstw fosfolipidowych powodując istotne zmiany w ich strukturze oraz właściwościach. Wraz ze wzrostem ilości lipidów rezorcynolowych w błonach liposomów lecytynowych obserwuje się istotne zmiany właściwości termotropowych fosfolipidu. W niskich stężeniach błonowych zarówno nasycone jak i nienasycone homologi wykazują dobrą mieszalność z fosfolipidami. Zwiększenie ilości alk(en)ylorazorcynoli w dwuwarstwie powoduje zjawiska związane z rozdzielaniem faz — poszerzanie przejścia oraz powstawanie dodatkowych przejść fazowych. Następuje również przesunięcie głównego przejścia fazowego w stronę wyższych temperatur [39]. Badając wpływ niskich stężeń błonowych (5-20 mol%) dwu homologów C17 — nasyconego oraz jednonienasyconego [40], stwierdzono ich różny wpływ na właściwości termotropowe dwupalmitoilofosfatydylocholine. Homolog nasycony w stężeniach powyżej 10 mol% powodował zanik przedprzejścia, wzrost temperatury oraz entalpii przejścia fazowego a także jego ponad trzykrotne poszerzenie. Homolog nienasycony powodował przesunięcie przedprzejścia w stronę wyższych temperatur, podobne do homologu nasyconego poszerzenie głównego przejścia, lecz obniżenie entalpii tego przejścia. Dodatkowo w stężeniach powyżej 15 mol% obserwuje się procesy związane z separacją faz w mieszaninie fosfatydylocholine z lipidem rezorcynolowym [39, 40]. Obecność lipidów rezorcynolowych w dwuwarstwie pęcherzyków lecytynowych powoduje również istotne zmiany tzw. płynności błony, badane poprzez śledzenie zmian parametrów opisujących ruchliwość znakowanych spinowo kwasów tłuszczowych. W temperaturach wyższych od temperatury przejścia fazowego zarówno homolog nasycony jak i nienasycony — w stężeniach poniżej 6 mol% powodowały wzrost wartości parametru uporządkowania 5-doksylostearnianu. W wyższych stężeniach (6-14 mol%) badane homologi powodują również istotne obniżenie ruchliwości 12-doksylostearnianu [41]. Ciekawym spostrzeżeniem jest wykazanie o wiele silniejszego efektu lipidów rezorcynolowych na ruchliwość obu typów znaczników w błonach liposomowych zawierających cholesterol. Ten podobny do wpływu cholesterolu na dynamikę fosfolipidów w dwuwarstwie efekt lipidu rezorcynolowego objawiał się przy niższych stężeniach alk(en)ylorazorcynolu, i był silniejszy dla błon zawierających większe stężenie cholesterolu [41]. Podobny stabilizujący efekt alkilorazorcynoli został zaobserwowany w dwuwarstwach zbudowanych z dwufosfatydyloglicerolu [35] przy użyciu pyrenu jako znacznika fluorescencyjnego. Stabilizujący efekt lipidów rezorcynolowych wynikać mo-

że z interakcji wolnych grup hydroksylowych pierścienia alk(en)ylorzecynolu i tworzenia przez nie wiązań wodorowych z cząsteczkami lipidów błonowych. Tworzenie takich wiązań w mieszaninach lipidów rezorcynolowych z fosfolipidami potwierdziły wyniki badania ich widm w podczerwieni [35].

Grupa B a t r a k o v a wykazała, że nasycone homologi 5-n-alk(en)ylorzecynolu wykazują zdolność do tworzenia, szczególnie w wysokich pH (powyżej 7.5) stabilnych czarnych błonek [42, 43]. Wykazano również, że naturalne mieszaniny alkilorzecynoli stabilizują dwuwarstwy (tak ich trwałość jak i przewodność elektryczną) takich lipidów jak fosfatydyloetanamina, fosfatydyloglicerol i dwufosfatydyloglicerol [43] przy czym stabilizacja ta zależała istotnie od typu badanego fosfolipidu. Autorzy postulują tworzenie w mieszaninach lipidów rezorcynolowych z fosfolipidami sieciowych struktur agregacyjnych utrzymywanych wiązaniami wodorowymi pomiędzy alkilorzecynolami, a grupami polarnymi fosfolipidów.

Badania przy użyciu liposomów lecytynowych wykazały, że lipidy rezorcynolowe a szczególnie homologi o nienasyconych łańcuchach wykazały zdolność do indukowania zwiększonej przepuszczalności dwuwarstwy tak w stosunku do jonów jak i małych cząsteczek nieelektrolitów [44]. Przyczyną wzrostu przepuszczalności błon liposomowych powodowanej przez lipidy rezorcynolowe może być indukowanie przez nie tworzenia wewnątrz błonowych struktur niewarstwowych takich jak odwrócone micelle czy faza heksagonalna H_{II} . Badania przy zastosowaniu analizy widm fosforowego magnetycznego rezonansu jądrowego wykazały, że szczególnie homologi nienasycone, w stężeniach powyżej 30 mol%, indukują powstawanie struktur niewarstwowych typu H_{II} [39].

IV-2. Interakcja lipidów rezorcynolowych z białkami i błonami biologicznymi

O zdolności lipidów rezorcynolowych do bezpośredniej interakcji z białkami świadczą wyniki uzyskane w badaniach monomolekularnych warstw tych związków [34]. Monowarstwy przygotowane z samych alkilorzecynoli jak i z ich mieszanin z fosfolipidami wiążą silnie białka, szczególnie amfifilowe, z subfazy. Najsilniejsze wiązanie wykazano dla homologów zawierających do 19 atomów węgla w łańcuchu. Wiązanie badanych białek przez alkilorzecynole jest istotnie silniejsze niż przez takie fosfolipidy jak fosfatydylocholina czy fosfatydyloglicerol. Wiązanie alkilorzecynoli poprzez regiony hydrofobowe białek zostało potwierdzone w badaniach ich wpływu na intensywność fluorescencji reszt tryptofanowych takich białek jak spektryna erytrocytarna [49], toksyna dyfterytowa (K i e l e c z a w a — dane niepublikowane) a także chlorofil [50]. Wiązanie badanych związków do tych białek powoduje silne wygaszanie fluorescencji, wskazując na ich lokalizację w pobliżu reszt

tryptofanowych, oraz możliwą bezpośrednią interakcję pierścieni alkilorzecynoli z pierścieniami tryptofanu.

Wynikiem zdolności lipidów rezorcynolowych do wbudowywania się i modulacji właściwości dwuwarstwy fosfolipidowej oraz interakcji z białkami jest możliwość modulacji aktywności błon biologicznych.

Lipidy rezorcynolowe dodane do zawiesin erytrocytów w stężeniach rzędu 10^{-5} M powodują wyciekanie jonów potasowych z ich wnętrza [44] a także zwiększenie przepuszczalności błony erytrocytarnej dla nieelektrolitów o średnicy cząsteczkowej do 1.4 nm [45]. W stężeniach niższych o rząd wielkości obserwuje się również wzrost przepuszczalności błony dla cząsteczek wody [46]. To zwiększenie przepuszczalności błony erytrocytarnej prowadzi do hemolizy komórek [44, 47]. Badając zależność hemolitycznych właściwości homologów 5-n-alk(en)ylorzecynoli od długości i stopnia nienasyceń ich łańcucha bocznego stwierdzono, iż najsilniejsze działanie wykazują homologi o nienasyconych łańcuchach 15 i 17 węglowych [48]. Badania w kriotypowej mikroskopii elektronowej wykazały, że lipidy rezorcynolowe powodują również istotne zmiany w dystrybucji białek w płaszczyźnie błony. Piętnastowęglowy nasycony homolog, który praktycznie całkowicie uwalnia jony potasu z erytrocytów oraz liposomów powoduje widoczną agregację i skupianie się cząsteczek białkowych w błonie erytrocytarnej. Homologi nienasycone wykazujące najsilniejsze działanie hemolityczne powodują niemal całkowite zniszczenie struktury błony oraz agregację i wydzielenie cząstek białkowych. Najłabsze działanie zaburzające morfologię powierzchni błony wykazywały długołańcuchowe homologi o nasyconych łańcuchach alifatycznych [39]. Wykazano również, że w stężeniach rzędu 10^{-5} M lipidy rezorcynolowe a szczególnie ich homologi nienasycone powodują spadek obserwowanej aktywności acetylocholinesterazy błony erytrocytarnej przy równoczesnym stymulowaniu aktywności Ca^{2+} — zależnej ATPazy [51]. Podobny inhibicyjny efekt jednego z homologów a mianowicie tridecylozorcynolu (grewillolu) zaobserwowano dla wyizolowanej $Na^+ - K^+$ -ATPazy [52]. Wymienione powyżej modulacyjne działanie 5-n-alk(en)ylorzecynoli na aktywność białek błonowych wynika jak się zdaje przede wszystkim ze zmian w ich ruchliwości lateralnej. Za tą sugestią przemawia również fakt stwierdzenia zdecydowanego obniżenia wiązania fibrynogenu przez jego receptory w błonie krwinek płytkowych inkubowanych z mikromolowymi stężeniami różnych homologów alkilorzecynolu [53]. Także wyniki badań kinetyki hydrolizy modyfikowanej przez wbudowanie poszczególnych homologów alk(en)ylorzecynoli do dwuwarstwy fosfolipidowej przez trzustkową fosfolipazę A_2 również tą możliwość sugeruje. Wykazano bowiem, że lipidy rezorcynolowe a szczególnie 5-n-heptadecylo i 5-n-heptadecenylorzecynole wbudowane do błony liposomowej w ilości

ciach nie przekraczających 4 mol% powodują m.in. kilkunastokrotne wydłużenia tzw. fazy latencji enzymu, czyli okresu w którym następuje redystrybucja produktów w dwuwarstwie warunkująca wiązanie dalszych cząsteczek i pełną aktywność enzymu [54]. Podobną aktywność inhibicyjną w stosunku do fosfolipazy A₂ z jadu kobry wykazano dla mieszaniny alkilorezorcynoli bakteryjnych wbudowanych do czarnych błonek lecytynowych jak również do emulsji fosfolipidowej. W stężeniach ok. 8 mM lipidy rezorcynolowe hamowały badany enzym w 95% [42].

Hamujący wpływ lipidów rezorcynolowych (C15-C27) na procesy transportu elektronów, zarówno rozsprzęgniętego jak i sprzężonego w fotosystemach PSI i PSII sugeruje także możliwość działania lipidów rezorcynolowych poprzez obniżanie ruchliwości cząsteczek białek błonowych. Z drugiej strony ok. 30% stymulacja transportu sprzężonego jak i fotofosforylacji przez niskie ($0,5 \times 10^{-7}$ M) stężenia alkilorezorcynoli sugeruje możliwość wykazywania przez te związki właściwości rozsprzęgających [50]. Fenolowa natura lipidów rezorcynolowych sugeruje również możliwość zastępowania przez nie naturalnych związków fenolowych takich jak ubichinon czy plastochinon w mediowanych przez nie w błonach procesach przekazywania elektronów.

V. Lipidy rezorcynolowe jako modulatory utleniania lipidów

Lipidy rezorcynolowe jako związki fenolowe wykazują zdolność do ochrony lipidowych składników komórki przed procesami utleniania. Wykazano, że długołańcuchowe homologi 5-n-alk(en)ylorzorcynolu zapobiegają indukowanej jonami Fe²⁺ peroksydacji kwasów tłuszczowych oraz fosfolipidów w błonach liposomowych [55], a także procesom autooksydacji kwasów tłuszczowych i triglicerydów (Nienartowicz i Kozubek — w przygotowaniu). Mieszanka długołańcuchowych lipidów rezorcynolowych zapobiega także procesom peroksydacji w błonach naturalnych. W stężeniach 10^{-3} - 10^{-4} M alkilorezorcynole całkowicie hamowały indukowaną mieszaninami Fe²⁺-kwas askrobinowy oraz Fe²⁺-NADPH peroksydację w mikrosomach wątrobowych, a także fragmentach retikulum sarkoplazmatycznego [56]. Wykazanie zdolności alkilorezorcynoli do hamowania obserwowanej aktywności fosfolipazy A₂ sugeruje możliwość uczestniczenia tych związków również w modulacji procesów enzymatycznego utleniania lipidów, prowadzących w komórkach głównie do powstawania metabolicznie aktywnych produktów, takich jak leukotrieny, tromboksany i prostaglandyny. Stwierdzono także, że homologi 5-n-alkilorezorcynolu hamują również utlenianie kwasu arachidonowego przez lipoksygenazę leukocytarną (5-LOX) oraz cyklooksygenazę pęcherzyków nasiennych [57]. W stężeniu 50 μM lipoksygenaza jest hamowana silniej (do 90%) przez

wielonienasycone homologi pentadecylorzorcynolu niż przez homologi nasycone. Aktywność grewillolu (5-n-tridecylorzorcynol) była dwukrotnie niższa od aktywności homologu piętnastowęglowego. Tej zależności zdolności inhibicyjnej od stopnia nienasycenia łańcucha alifatycznego nie wykazano dla cyklooksygenazy. Aktywność inhibicyjna jedno, dwu i trójnienasyconych homologów była podobna. Badane lipidy rezorcynolowe wykazywały istotnie silniejsze działanie inhibicyjne w stosunku do cyklooksygenazy już przy 10 μM stężeniu 5-n-pentadecatrienylorzorcynolu stwierdzono ok. 99% hamowanie jej aktywności [57]. W odróżnieniu od innych aktywności metylowana pochodna pentadecylorzorcynolu okazała się również dobrym inhibitorem cyklooksygenazy (87% inhibicji przy 10 μM). Wstępne badania w grupie Mathiasa [58] wskazują, że homologi lipidów rezorcynolowych izolowane ze zbóż wykazują zdolność mutacji syntezy tromboksanu A₂ przez płytki krwi. Złożony kształt zależności ilości syntetyzowanego tromboksanu od stężenia lipidów rezorcynolowych (niskie i wysokie stężenia jednych homologów stymulują a pośrednie hamują syntezę) sugeruje konieczność dokładnego zbadania zależności pomiędzy poziomem nadtlenników lipidowych w komórkach, stężeniem alkilorezorcynoli i syntezą tromboksanu.

VI. Podsumowanie

Mimo względnie dużej ilości danych dotyczących biologicznej aktywności lipidów rezorcynolowych ich rola w biologii ziarniaka, a szczególnie procesie dojrzewania i przechodzenia w stan spoczynku, a także wpływ na organizmy zwierzęce pozostają nadal niewyjaśnione. Poznanie dokładnych mechanizmów działania lipidów rezorcynolowych, jak i ich preferencji w stosunku do określonych procesów metabolicznych przyczyni się z pewnością do uzyskania odpowiedzi, m.in. na ciągle nie mające jasnej odpowiedzi pytanie — czy alkilorezorcynole są związkami pożytecznymi.

Artykuł otrzymano 8 stycznia 1993 r.

Zaakceptowano do druku 17 września 1993 r.

Praca finansowana w ramach projektu KBN Nr 4 1294 91 01.

Piśmiennictwo

1. Kates M (1972) W: Work, TS Work, E (red) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology t 3. North-Holland, Amsterdam, London, New York, str. 268-610
2. Tyman JHP (1979) *Chem Soc Rev* 8: 499-537
3. Kawamura J (1928) *Japan J Chem* 3: 89-95
4. Furukawa S (1934) *Sci Papers Inst Phys Chem Res (Tokyo)* 24: 304-327
5. Wenkert E, Loeser E-M, Mahapatra SN, Schenker F, Wilson Em (1964) *J Org Chem* 29: 435-439
6. Wieringa GW (1967) *Bibl Nutr Dieta* 7
7. Briggs DE (1974) *Phytochemistry* 13: 987-996

8. Tyman JHP (1976) *Anal Chem* **48**: 30-34
9. Kozubek A, Geurts van Kessel WSM., Demel RA (1979) *J Chromatogr* **169**: 422-425
10. Kozubek A, Tłuścik F, Mejbaum-Katzenellenbogen W (1981) *Acta Soc Bot Polon* **50**: 637-643
11. Kozubek A (1984) *J Chromatogr* **295**: 304-307
12. Kozubek A (1985) *Acta Aliment Polon* **9**: 185-198
13. Hengtrakul P, Lorenz K, Mathias M (1991) *J Food Comp Anal* **4**: 52-57
14. Mullin WJ, Collins FW (1991) *J Food Comp Anal* **4**: 270-275
15. Reusch RN, Sadoff HJ (1983) *Nature (Lond)* **302**: 268-270
16. Batrakov SG, Pridachina NN, Kruglyak EB, Novogrudskaya ED (1977) *Khim Prirod Soed (USSR)* **494**-499
17. Batrakov SG, Pridachina NN, Kruglyak EB, Novogrudskaya ED, Chekasina EV (1984) *Izv Akad Nauk SSSR Ser Biol* **177**-184
18. Osipov GA, El-Registan GI, Svetlichny VA, Kozlova AN, Duda VI, Kaprelyants AS, Pomazanov VV (1985) *Mikrobiologia* **54**: 180-186
19. Seitz LM (1992) *J Agric Food Chem* **40**: 1541-1546
20. Lorenz K, Hengtrakul P (1990) *Lebensm-Wiss u-Technol* **23**: 208-215
21. Verdeal K, Lorenz K (1977) *Cereal Chem* **54**: 475-483
22. Salek M (1978) *Rocz Państw Zakł Hig* **29**: 205-211
23. Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Takeya K, Lepoittevin J-P, Asakawa Y (1987) *Chem Pharm Bull* **35**: 3016-3020
24. Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Maezuru M, Takeya K, Kondo M, Inamatsu M, Morita H (1989) *Chem Pharm Bull* **37**: 1619-1621
25. Arisawa M, Ohmura K, Kobayashi A, Morita N (1989) *Chem Pharm Bull* **37**: 2431-2431
26. Giannetti BM, Steglich W, Quack W, Anke T, Oberwinkler F (1978) *Z Naturforsch* **33c**: 807-816
27. Komolova GS, Gorskaya IA, Kaverinskaya TV, Sheveleva ID (1989) *Biokhimiya* **54**: 1847-1851
28. Scannell RT, Barr JR, Murty VS, Reddy KS, Hecht SM (1988) *J Am Chem Soc* **110**: 3650-3651
29. Kozasa T, Yamamoto H, Tsunoda N (1990) Patent Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 02.101.036:
30. He S (1990) *Shengwu Huaxue Zazhi* **6**: 428-431
31. Aoyagi T, Yagisawa M, Kumagai M, Hamada M, Okami Y, Takeuchi T, Umezawa H (1971) *J Antibiot* **24**: 855-860
32. Kumagai M, Suhara Y, Aoyagi T, Umezawa H (1971) *J Antibiot* **24**: 870-875
33. Vincieri FF, Vincenzini MT, Vanni P (1981) *Riv Ital EPPOS* **63**: 79-82
34. Kozubek A (1986) *Acta Wratisl* **886**: 122 pp
35. Kaprelyants AS, Sulcimenov MK, Sorokina AD, Deborin GA, El-Registan GI, Stoyanovich FM, Lille YE, Ostrovsky DN (1987) *Biol Membr* **4**: 254-261
36. Nenashchev VA, Pridachina NN, Pronevich LA, Batrakov SG (1989) *Biokhimiya* **54**: 784-787
37. Adam NK (1928) *Proc Roy Soc (Ser. A)* **119**: 628-644
38. Kato T, Seki K, Kaneko R (1990) *Colloid Polym Sci* **268**: 934-937
39. Kozubek A, Demel RA (1981) *Biochim Biophys Acta* **642**: 242-251
40. Hendrich AB, Kozubek A (1991) *Z Naturforsch* **46c**: 423-427
41. Kozubek A, Jezierski A, Sikorski AF (1988) *Biokhimiya* **53**: 465-472
42. Gordeev KY, Bitkov VV, Pridachina NN, Nenashchev VA, Batrakov SG (1991) *Bioorg Khim* **17**: 1357-1364
43. Bitkov VV, Nenashchev VA, Pridachina NN, Batrakov SG (1992) *Biochim Biophys Acta* **1108**: 224-232
44. Kozubek A, Demel RA (1980) *Biochim Biophys Acta* **603**: 220-227
45. Kozubek A (1987) *Acta Biochim Polon* **34**: 357-367
46. Kozubek A (1985) *Z Naturforsch* **40c**: 80-84
47. Kozubek A (1984) *Z Naturforsch* **39c**: 1132-1136
48. Kozubek A (1987) *Acta Biochim Polon* **34**: 387-394
49. Sikorski AF, Michalak K, Bobrowska M, Kozubek A (1987) *Stud Biophys* **121**: 183-191
50. Kieleczawa J, Szalewicz A, Kozubek A, Kullig E (1987) *Progr Photosynth Res* **2**: 585-587
51. Kozubek A, Nietubyc M, Sikorski AF (1992) *Z Naturforsch* **47c**: 41-46
52. Shoji N, Umeiyama A, Takemoto T (1984) *J Nat Prod (Lloydia)* **47**: 530-532
53. Kozubek A, Wróblewski Z (1990) *Stud Biophys* **139**: 177-181
54. Kozubek A (1992) *Z Naturforsch* **47c**: 608-612
55. Struski DGJ, Kozubek A (1992) *Z Naturforsch* **47c**: 47-50
56. Erin AN, Davitashvili NG, Prilipko LL, Bolydyrev AA, Lushchak VI, Batrakov SG, Pridachina NN, Serbinova AE, Kagan VE (1987) *Biokhimiya* **52**: 1180-1185
57. Wagner H, Breu W, Willer F, Wierer M, Remiger P, Schwenker G (1989) *Planta Med* **55**: 566-567
58. Hengtrakul P, Mathias M, Lorenz K (1991) *J Natr Biochem* **2**: 20-24

Sprawozdania

Doroczna konferencja kierowników Katedr Biochemii i Chemii Fizjologicznej Wydziałów Lekarskich A.M.

22 maja 1993 odbyła się w Poznaniu doroczna konferencja kierowników Katedr Biochemii i Chemii Fizjologicznej Wydziałów Lekarskich AM, w której uczestniczyło 21 osób, w tym także prezes i v-prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Gospodarzem spotkania była Katedra Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

W pierwszej części konferencji referaty wygłosili:

- 1) prof. dr hab. Jerzy Sowiński, prodziekan Wydziału Lekarskiego AM w Poznaniu „Program nauczania medycyny we wspólnotach europejskich” oraz
- 2) prof. dr hab. Ryszard Słomski, Zakład Genetyki PAN w Poznaniu „Postęp badań nad molekularnym podłożem chorób człowieka”.

Po referatach odbyła się ożywiona dyskusja. W drugiej części spotkania przeprowadzono dyskusję ogólną, dotyczącą

1) ustawowego uregulowania relacji studenci-nauczyciele akademicy istotnego dla prawidłowego funkcjonowania uczelni. Prowadzący tę dyskusję prof. Mariusz Żydowo zaproponował, aby jako punkt wyjścia przyjąć założenie, w myśl którego w praworządym i demokratycznym państwie każdemu przysługuje tyle prawa do decyzji, ile może ponieść odpowiedzialności za decyzje podejmowane.

W wyniku dyskusji sformułowano 3 postulaty, które przesłano do odpowiednich instancji, kompetentnych dla zainicjowania właściwych korekt w artykule 60 Ustawy o Szkolnictwie Wyższym,

2) programowego rozdziału nauczania następujących przedmiotów: chemia ogólna, biochemia, genetyka. Podkreślono istotne znaczenie tych przedmiotów na studiach medycznych zarówno w aspekcie poznawczym, dagnostycznym jak i terapeutycznym. Stanowisko zebranych przedstawiono w piśmie skierowanym do Rektorów wszystkich Akademii Medycznych w Polsce,

3) ewtl. integracji Akademii Medycznych z Uniwersytetami lub innymi Uczelniami.

Poza tym w dalszej dyskusji poruszono sprawę przeprowadzania w przyszłości egzaminu państwowego po zakończeniu studiów. Zaproponowano, aby odpowiednie uzgodnienia z Departamentem Szkolnictwa Wyższego Ministerstwa Zdrowia, dotyczące zakresu nauk podstawowych zostały przeprowadzone przez prof., prof. Janusza Gregera i Mariusza Żydowo.

W godzinach wieczornych uczestnicy konferencji wzięli udział w spotkaniu towarzyskim.

Następnego dnia odbyła się wycieczka autokarowa trasą „Mickiewicz w Wielkopolsce”.

Prof. dr hab. Halina Karoń

I Ogólnopolska Konferencja „Nauczanie Biochemii i Biotechnologii”

Konferencja odbyła się w dniach 7-8 czerwca 1993 roku w Łodzi w ośrodku konferencyjnym Uniwersytetu Łódzkiego na Rogach. Została zorganizowana przez Katedrę Genetyki Molekularnej UŁ oraz Łódzki Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W Konferencji uczestniczyło 75 osób ze wszystkich ośrodków akademickich w Polsce. Rangę Konferencji podniosło uczestnictwo w niej przewodniczącej Łódzkiego Oddziału PAN — prof. dr hab. Marii Olszewskiej, przewodniczącej Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — prof. dr hab. Lilianny Konarskiej oraz przewodniczącej Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biofizycznego — prof. dr hab. Marii Bryszewskiej.

Na Konferencji wygłoszono 10 referatów:

1. prof. S. Bielecki — „Kształcenie biotechnologów — potrzeby i perspektywy”.
2. prof. R. Pohorecki — „Nauczanie biotechnologii w szkołach technicznych”.
3. doc. K. W. Szewczyk — „Kierunek biotechnologia na Politechnice Warszawskiej”.
4. prof. E. Galas — „Kierunek biotechnologia na Wydziale Chemii Spożywczej i Biotechnologii PŁ”.
5. prof. Z. Walter — „Problemy nauczania biochemii”.
6. dr A. Kocimowska-Badek — „Kształcenia biochemiczne jako podstawa kształtowania postaw proekologicznych”.
7. dr G. Nowak — „O potrzebie 60 godzinowego integrującego wykładu biochemii ogólnej dla studentów biologii”.
8. prof. Z. Zak — „Refleksje o międzyuczelnianym kierunku studiów biotechnologicznych”.
9. dr J. Długoński — „Osiągnięcia współczesnej biotechnologii w ochronie zdrowia ludzi i w rolnictwie”.
10. prof. W. Walerych — „Biochemia i biotechnologia na uczelniach rolniczych”.

Zwraca uwagę fakt, że referaty dotyczyły głównie biotechnologii. Jest to wyraz aktualności kierunku i wielkiego zainteresowania nim szkół wyższych.

Na Konferencji odbyły się również cztery dyskusje okrągłego stołu:

1. Problemy nauczania biochemii i wymiana doświadczeń dydaktycznych. Moderator — prof. Z. Walter.
2. Właściwa ranga dydaktyki przy ocenie i awansach pracowników naukowo-dydaktycznych. Moderator — prof. W. Leyko.
3. Nauczanie biochemii w szkołach wyższych. Moderator — prof. Z. Walter.
4. Nauczanie biotechnologii w szkołach wyższych. Moderator — prof. S. Bielecki.

W wyniku ożywionej dyskusji, świadczącej o aktualności tematu konferencji i wielkiego zainteresowania sprawami dydaktycznymi postanowiono powołać działający stale ogólnopolski zespół koordynujący wymianę doświadczeń dydaktycznych w zakresie biochemii w składzie:

prof. dr hab. Wirgiliusz Duda, Łódź;
prof. dr hab. Antoni Polanowski, Wrocław;
prof. dr hab. Zofia Porębska, Warszawa;
prof. dr hab. Witold Walerych, Poznań;
prof. dr hab. Zofia Walter, Łódź;
prof. dr hab. Zdzisław Żak, Kraków;
dr Antoni Leźnicki, Toruń;
dr Grzegorz Nowak, Lublin.

Skład zespołu traktujemy jako otwarty i chętnie widzimy włączenie się dalszych osób.

Konferencja postuluje także:

1. poparcie inicjatywy Uniwersytetu Jagiellońskiego o utworzeniu na uniwersytetach kierunku biochemiczno-biofizycznego i włączenia go do katalogu studiów biologicznych;
2. wprowadzenia systematycznego doksztalcania z biochemii dla nauczycieli szkół ponadpodstawowych, w celu zapewnienia właściwego poziomu biologii w szkołach;
3. założenie ogólnopolskiego czasopisma, poświęconego problemom nauczania biochemii typu *Biochemical Education*;
4. stworzenie ogólnopolskiej nagrody im. prof. Antoniego Dmochowskiego, założyciela pierwszej w Polsce uniwersyteckiej Katedry Biochemii, wychowawcy kilku pokoleń biochemików, w celu podniesienia rangi dydaktyki w ocenie pracowników naukowo-dydaktycznych. Nagroda byłaby przyznawana przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne za szczególne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii.

Zdaniem uczestników dyskusji rozwój biotechnologii i techniczna realizacja osiągnięć biochemików i biologów nie jest możliwa bez dziedzin technicznych. Należy zatem:

1. zintensyfikować kształcenie biotechnologów na uczelniach technicznych;
2. umieścić biotechnologię w wykazie dyscyplin technicznych, tak aby można było nadawać odpowiednie stopnie i tytuły naukowe w tej dziedzinie;
3. utworzyć w Komitecie Badań Naukowych odrębną sekcję biotechnologii w zespole nauk technicznych. Umożliwi to właściwe rozpatrywanie i opiniowanie projektów badawczych;
4. stymulować współpracę zespołów z różnych uczelni, zwłaszcza w organizacji studiów podyplomowych w zakresie biotechnologii.

Wspólne konferencje dotyczące nauczania biochemii i biotechnologii powinny być kontynuowane i jednym z celów zespołu koordynującego wymianę doświadczeń dydaktycznych w Polsce byłoby organizowanie konferencji w dalszych latach.

Materiały Konferencji zostaną opublikowane w wydawnictwie Uniwersytetu Łódzkiego.

*Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego
prof. dr hab. Zofia Walter*

Komitet Historii i Nauki PAN

Wydał tom materiałów konferencji nt.

LWOWSKIE ŚRODOWISKO NAUKOWE W LATACH 1939-1945

W IV edycji w/w materiałów opublikowano także zbiór tekstów
„O JAKUBIE KAROLU PARNASIE” opatrzonych licznymi
przypisami historycznymi.

Koszt tomu 35 000 zł

Do nabycia w siedzibie Komitetu w Pałacu Staszica

Krakowskie Przedmieście 72, 00-330 Warszawa, pokój 26

Kronika dotychczasowych konkursów

Rok 1991



Prof. Jerzy Rogulski
„Synteza, sekrecja i mechanizm działania insuliny”



Prof. Aleksandra Kubicz
„Mechanizm działania hormonów w komórce”

Rok 1992



Doc. Jolanta Barańska
„Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce”

Rok 1993



Doc. Katarzyna Anna Nałęcz
„Mechanizmy transportu związków niskocząsteczkowych przez błony biologiczne”



Doc. Jan Barciszewski
„Zależność między strukturą i funkcją kwasów nukleinowych”



Dr Małgorzata Giel
„Strukturalne aspekty oddziaływania białek z DNA”



Dr L. Pawłowska-Ćwiek
„Mechanizm detoksykacji dwutlenku siarki i skutki niewydolności jego unieszkodliwiania”



Dr Maciej Szymański
„Mechanizm inicjacji odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1”

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

Regulamin nagrody

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

ROCZNY SPIS TREŚCI TOM 39, NR 1, 2, 3, 4, 1993

ARTYKUŁY

- Teresa Jakubowicz, Eugeniusz Gąsior** — Od kinazy fosforylasy do tysiąc i jednej białkowej kinazy? 2
- Urszula Piotrowska** — Struktura i funkcja ubikwityny 8
- Barbara Grzelakowska-Sztabert** — Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego 16
- Tomasz Tyrakowski** — Prawidłowa i zaburzona funkcja kanału chlorkowego CFTR — biochemiczna analiza mukowiscydozy 25
- Grzegorz Bartosz** — Metabolizm glutationu 32
- Andrzej Kutner** — Analogi witamin D o działaniu antyproliferacyjnym 39
- Andrzej Kutner** — Analogi witamin D do fotoznakowania białka transportującego i receptora hormonu witaminowego 46
- Aleksander F. Sikorski, Katarzyna Białkowska, Brygida Bisikirska, Jan Szopa** — Spektyny erytrocytarne i nieerytrocytarne — struktura i funkcje 50
- Anna Tukendorf** — Fitochelatyny — roślinne peptydy wiążące metale ciężkie 60
- Zofia Szwejkowska-Kulińska** — Biologiczne funkcje zmodyfikowanych nukleozydów w transferowych RNA 84
- Barbara Tudek** — Utlenianie puryn — źródło mutacji spontanicznych 91
- Małgorzata Sidorkiewicz, Andrzej Płucienniczak** — Organizacja genetyczna wirusa zapalenia wątroby typu B 99
- Barbara Kludkiewicz, Krystyna Grzelak** — Białka jedwabiu *B. mori* — charakterystyka, biosynteza i regulacja ekspresji genów . . . 105
- Bożena Rempoła** — Sekrecja heterologiczna białek z *S. cerevisiae* 111
- Małgorzata Manteuffel-Cymborowska** — Nowy aspekt metabolizmu poliamin — posttranslacyjne, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy 118
- Anna Filipek** — Białka wiążące wapń występujące w układzie nerwowym 126
- Ewa Kulczykowska** — Rola azotocyny argininowej i melatoniny w fizjologicznych mechanizmach adaptacji ryb kostnoszkieletowych do zmian zasolenia środowiska 134
- Przemysław Wojtaszek** — Fenolowe metabolity wtórne jako sygnały roślin w oddziaływaniach międzygatunkowych 139
- Joanna Rytko, Grażyna Palamarczyk** — Drożdże modelowym organizmem eukariotycznym w biologii molekularnej 150
- Ewa Anna Grzybowska, Andrzej Migdalski, Marek Zagulski** — Sekwencjonowanie genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Cele, strategie, rezultaty 154
- Iwona Smaczyńska, Marek Skoneczny** — Funkcja i biogeneza peroksysomów w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* 163
- Anna Chełstowska, Joanna Rytko** — Biosynteza hemu w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* 171
- Anna Szkopińska** — Wykorzystanie mutantów drożdży do badań wspólnego szlaku biosyntezy dolicholi, steroli i ubichinonów . . . 183
- Grażyna Palamarczyk, Joanna Kruszewska** — Genetyczne regulacje N-glikozylacji białek drożdży 190
- Jan Paweł Wornczak, Jolanta Barańska** — Cykliczna ADP-ryboza — modulator uwalniania Ca²⁺ z magazynów wewnątrzkomórkowych 210
- Ewa Sikora** — Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek 212
- Arkadiusz Szklarczyk** — Oligodeoksyrybonukleotydy jako narzędzie specyficznej regulacji transkrypcji genów 221

Michał Milewski, Jerzy Bal — Mutacje dynamiczne. Rola niestabilnych sekwencji DNA w niektórych chorobach genetycznych człowieka 228

Anna Kowalska — Polimorfizm genu alfa₁-antytrypsyny (*locus* Pi: alpha₁-inhibitor proteazy) 236

Katarzyna Nałęcz — Transport białek przez błony biologiczne 242

Anna Puka — Rola proteolitycznego systemu kalpainowego w komórkach zwierzęcych . . 251

Hanna Szpilewska, Dorota Kuczyńska-Wiśniak — Wielofunkcyjne białko RecA *Escherichia Coli* — budowa i funkcje 259

Arkadiusz Kozubek — Aktywność biologiczna lipidów rezorcynolowych 264

WSPOMNIENIA

Janina Kwiatkowska — Profesor Tadeusz Baranowski — Wspomnienia 82

Uczniowie i przyjaciele — Profesor Eugeniusz Gąsior — Wspomnienie 150

INDEKS AUTORÓW PRAC PRZEGLĄDOWYCH TOM 39, 1993

B

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

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

Bartosz G — Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Białkowska K — Instytut Biochemii, Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

Bisikirski B — Instytut Biochemii, Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

C

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

F

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

G

Gąsior E — Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Grzelak K — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

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

Grzybowska E A — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

J

Jakubowicz T — Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

K

Kłudkiewicz B — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Kowalska A — Zakład Genetyki Człowieka, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Kozubek A — Instytut Biochemii, Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

Kruszewska J — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Kuczyńska-Wiśniak D — Uniwersytet Gdański, Katedra Biochemii, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Kulczykowska E — Centrum Biologii Morza PAN, ul. Św. Wojciecha 5, 81-347 Gdynia

Kutner A — Instytut Farmaceutyczny, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa

M

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

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

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

N

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

P

- Palamarczyk G** — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
Piotrowska U — Instytut Hematologii, ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa
Plucienniczak A — I Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii, AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź
Puka A — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

R

- Rempoła B** — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
Rytka J — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

S

- Sidorkiewicz M** — Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii, AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź
Sikora E — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Sikorski AF — Instytut Biochemii, Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław
Skoneczny M — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
Smaczyńska I — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

- Szklarczyk A** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Szkoپیńska A — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
Szopa J — Instytut Biochemii, Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław
Szpilewska H — Uniwersytet Gdański, Katedra Biochemii, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk
Szwejkowska-Kulińska Z — Uniwersytet im. A. Mickiewicza, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

T

- Tudek B** — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
Tukendorf A — Zakład Fizjologii Roślin UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
Tyrakowski T — Zakład Patofizjologii PAM, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

W

- Wojtaszek P** — Instytut Chemii Bioorganicznej, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań
Wronczak JP — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Z

- Zagulski M** — Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1994 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie

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

Prenumerata krajowa dla instytucji:
480 000 zł.

Prenumerata krajowa indywidualna:
240 000 zł, (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

Prenumerując „Postępy Biochemii” wspierasz swoje czasopismo!

APARATURA LABORATORYJNA

CONTI GLASS Sp. z o.o.

Zarząd:
ul Filtrowa 54/58
02-057 Warszawa
tel. 658-1168; fax/tel. 658-11-08

Zakład:
Sade Budy 54
96-316 Międzyborów
tel. 25-39 Żyrardów k/W-wy

Światowej jakości
aparatura laboratoryjna, ze szkła borokrzemowego o I klasie odporności hydrolitycznej, zgodna z normami DIN i ISO.

- * wszystkie typy szlifowanych złącz szklanych, kolb, chłodnic, ekstraktorów, ekspansji, przedłużaczy, kolumn, chłodnic powietrznych itp.;
- * nasadki do destylacji;
- * odbieralniki ze szlifem;
- * aparaty Soxhlet'a, Parnasa-Wagnera i inne;
- * uniwersalny zestaw LE-100 do syntezy związków organicznych;
- * aparaty do podwójnej destylacji wody, do fenoli, do destylacji rozpuszczalników, do destylacji parą wodną itp.;
- * wyroby wg wzorów lub rysunków klienta;

Wykonujemy
wszystko to, czego inni nie chcą, nie mogą
lub nie umieją wykonać.

PRODUKUJEMY + KOMPLETUJEMY WYPOSAŻENIE + IMPORTUJEMY + EXPORTUJEMY

APARATURA LABORATORYJNA

Pokwitowanie dla wpłacającego

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....
podpis przyjmującego

Wskazówki dla autorów

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

Prace przeznaczone do publikacji w „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 ściśłość podawanych informacji oraz poprawność cytowania piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienie zilustrowane za pomocą tabel, rycin, (wykresy, schematy, reakcje), wzorów i fotografii.

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazań szczegółowych:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

UWAGA

BIOLOGDZY, CHEMICY, BIOCHEMICY, IMMUNOLOGDZY, LEKARZE

Pomożemy w realizacji interesujących pomysłów z dziedziny biologii, chemii, biochemii, immunologii, diagnostyki medycznej.

Kupimy technologie, wzory użytkowe, projekty wdrożeń.

Doświadczonym immunochemikom i biochemikom zlecimy opracowanie technologii wytwarzania preparatów diagnostycznych.

Oferty z adresem oraz ogólnym opisem oferowanego produktu (technologii) lub oferty współpracy zawierające życiorys zawodowy prosimy przesłać na adres:

L A M A R Sp. z o.o.
11-Listopada 28/22
03-436 WARSZAWA

Gwarantujemy pełną dyskrecję.

Mamy przyjemność zawiadomić członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i osoby zainteresowane, że Oddział Szczeciński P.T.Bioch. przyjął statutowy obowiązek zorganizowania dorocznego Zjazdu Towarzystwa. Jubileuszowy, XXX, Zjazd odbędzie się w Szczecinie w dniach 14, 15, 16 września 1994 r.

Program naukowy Zjazdu został opracowany przez członków Towarzystwa i sympatyków.

Obrady będą się toczyć w 12 sesjach tematycznych:

1. Molekularne mechanizmy w karcinogenezie (organizatorzy: prof. A. Krygier-Stojałowska i prof. Jan Lubiński, Szczecin)
2. Regulacja wytwarzania energii w komórce (organizator: prof. M. M. Żydowo, Gdańsk)
3. Molekularne i biochemiczne aspekty wirusowych i bakteryjnych chorób zwierząt (prof. A. Furowicz, Szczecin)
4. Molekularne i regulacyjne aspekty systemów transportu jonów (organizator: prof. T. Tyrakowski, Szczecin)
5. Biologiczne zagrożenia związkami fluoru (organizator: prof. Z. Machoy, Szczecin)
6. Metabolizm lipoprotein (organizator: prof. M. Naruszewicz, Szczecin)
7. Składniki łącznotkankowe ściany naczyniowej (organizatorzy: prof. M. Drózd, Katowice i prof. E. Bańkowski, Białystok)
8. Pierwiastki śladowe w organizmach i środowisku (organizator: prof. M. Protasowicki, Szczecin)
9. Biochemia mięśnia (organizator: prof. M. Pytasz, Szczecin)
10. Wolne rodniki w medycynie i biologii (organizator: dr med. K. Ciechanowski, Szczecin)
11. Fitoaglutyniny i ich inhibitory (organizator: prof. Z. Sagan, Szczecin)
12. Tematy różne (organizator: dr Teresa Wesołowska)

Prezentacja prac w sesjach odbywać się będzie w formie ustnej lub plakatowej.

Serdecznie zapraszamy do udziału w obradach Zjazdu, wizyty w stoiskach wystawowych, uczestnictwa w imprezach towarzyszących Zjazdowi.

Informacji udziela Sekretarz Komitetu Organizacyjnego dr Dorota Samujło, Zakład Biochemii PAM, ul. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, tel. 82-40-57.

Do zobaczenia w Szczecinie!

Zarząd Oddziału
Dr n.przyr. Teresa Wesołowska
Dr n.przyr. Barbara Millo

Komitet Organizacyjny
Prof. dr hab. Zygmunt Machoy
dr n.chem. Dorota Samujło

W odpowiedzi Profesorowi Jackowi Kuźnickiemu

Usunięcie w 1993 r. Acta Biochimica Polonica po przeszło 30 latach z listy czasopism których treść jest podawana w Current Contents jest niewątpliwie dotkliwym ciosem nie poprzedzonym żadną informacją.

Bezpośrednią przyczyną tego faktu było 6 tygodni opóźnienia w wydaniu Nr 1/1993 spowodowane zmianami w redagowaniu i publikowaniu pisma (inny format, zmiany graficzne). Prawdą jest jednak spadek współczynnika cytowań z 0.7 w latach 70-tych do 0.4 w 1987 i 0.08 w 1991. Przyczyna polega z jednej strony na ogromnie zwiększonej liczbie czasopism o tematyce biochemicznej jak również z faktu, że jakkolwiek Acta promowało w swojej historii niemal wszystkich znaczących polskich biochemików to obecnie badacze ci i ich uczniowie nie nadsyłają, lub bardzo rzadko, swoje prace do polskiego czasopisma.

Podjęliśmy wszelkie możliwe działania aby przywrócić cytowanie Acta Biochimica Polonica w Current Contents. Nasze pismo nadal jest indeksowane w Excerpta Medica, Chemical Abstracts, Current Awareness in Biological Sciences, BioScience Information. Niemniej jednak Current Contents stanowi najbardziej poczytną i powszechną informację o pracach naukowych prowadzonych na całym świecie. Stąd ogromna waga powrotu Acta na listę Current Contents. Otrzymaliśmy zapewnienie, że sprawa będzie rozpatrywana przez kolegium Current Contents/Life Science Biomedical Group w niedługim czasie.

Mamy nadzieję, że werdykt będzie pomyślny, nie zwalnia to jednak całej polskiej społeczności biochemicznej i redakcji od podejmowania wspólnych starań o zapewnienie pismu dobrego poziomu i zwiększenie jego poczytności. Wszelkie propozycje i uwagi są oczekiwane i będą wnikliwie rozpatrzone.

Najistotniejszą jednak sprawą jest napływ dobrych prac, gdyż najczęstszą oceną wystawianą przez recenzentów jest ocena zadowolająca a bardzo rzadko bardzo dobra. Niewątpliwie niekorzystna jest utrzymująca się opinia o wyższości prac drukowanych za granicą. Miarą ważności pracy powinien być poziom pisma a nie miejsce jego wydania. Tak więc **SOS** prof. Kuźnickiego musi dotrzeć do świadomości wszystkich, tylko wówczas bowiem starania i praca redaktorów dadzą wyniki.

Los pisma zależy od polskich biochemików.

Acta Biochimica Polonica
Redaktor Naczelny
prof. dr Konstancja Raczyńska-Bojanowska

Howard Hughes Medical Institute

International Program of Research Grants

Selected Countries of Eastern Europe and the Former Soviet Union

The Howard Hughes Medical Institute announces a program of biomedical research grants for the following selected countries: Belarus, Czech Republic, Estonia, Latvia, Lithuania, Hungary, Poland, Russia, Slovak Republic, and Ukraine. The total program budget will be about \$3 million annually for five years, with two types of research grants awarded: (1) grants for the research of scientists at their own institutions in the selected countries, and (2) grants for the joint research of scientists in the selected countries and collaborating scientists in other countries.

Research at the Scientist's Own Institution

About 40–60 grants will be awarded for research by eligible scientists at their own institutions in the selected countries of Eastern Europe and the Former Soviet Union. The five-year grants will be in the range of \$10,000–\$75,000 (U.S.) annually. The research must probe basic biological processes and disease mechanisms, in such fields as cell biology and regulation, genetics, immunology, neuroscience, and structural biology. Clinical trials and research on health education, health care delivery, or health services are not eligible for support under this initiative.

To be considered eligible, scientists (1) must reside in a selected country (or, if they currently live abroad, must plan to return to assume academic or research appointments at institutions in the selected countries), (2) must have made significant contributions to fundamental biomedical research, (3) must have published at least one scientific article in a peer-reviewed international English language journal or must provide a preprint in English of a publication arising from recent collaborative research with an established laboratory abroad, and (4) must not have major administrative responsibilities.

Research Involving International Collaboration

About 40–60 grants will be awarded for collaborative research conducted jointly by an eligible scientist in one of the selected countries and a collaborating scientist in another country. The five-year grants will be in the range of \$10,000–\$75,000 (U.S.) annually. The research must probe basic biological processes and disease mechanisms, as noted above.

For collaborative research awards, the applicant in the eligible country must meet the eligibility criteria described above for research at the scientist's own institution. The collaborating scientist must be an established researcher at an institution that is in a country other than the selected countries of Eastern Europe and the Former Soviet Union. The application must be submitted jointly.

Applications and Awards

Awards, which will be announced in the fall of 1994, will be based on peer review of submitted applications. The deadline for application is December 1, 1993.

To request the program announcement and application, provide to the Institute your name, address, telephone number (including country code), fax number, and e-mail address:

Howard Hughes Medical Institute
Office of Grants and Special Programs
International Program
4000 Jones Bridge Road
Chevy Chase, MD 20815-6789
United States of America
Telephone: 1-301-215-8884
Fax: 1-301-215-8888
Internet: hhmigfil@class.org

The Howard Hughes Medical Institute welcomes applications from all qualified candidates and encourages women and members of minority groups to apply.