POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

postępy biochemii

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 43, NR 4, 1997

Zofia Lassota — Wspomnienia. . 226
Karol Taylor – Wspomnienia. . . 227
Nobel 1997 z dziedzin fizjologii i medycyny. 229
GTPazy typu Rab/Ypt 231
Oksydacyjne uszkodzenia DNA. . 238
Ilościowa technika PCR. 250
Rekombinacja genetyczna (+)RNA wirusów. 257
Tektonika RNA. 267
Efekty pozagenomowe steroidów. 274
Homeostaza miedzi. 281
Regulacja PEPC C4. 287
Komunikaty PTBioch. 296

http://rcin.org.pl

Kwartalnik *„Postępy Biochemii"*
wydawany z pomocą finansową
Komitetu Badań Naukowych oraz
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

http://rcin.org.pl

postępy biochemii

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland
E-mail — ptbioch @ nencki gov. pl.

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
LILIANA KONARSKA
tel. 658-20-99
ANNA SZAKIEL
tel. 823-20-46
IWONA FIJAŁKOWSKA
tel. 658-44-99 w. 1123
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 813-05-15
HANNA LASKOWSKA
pon. i czw. 14-16
tel. 659-85-71 w. 441

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
JAN BARCISZEWSKI (Poznań)
RENATA DĄBROWSKA (Warszawa)
DANUTA HULANICKA (Warszawa)
LESZEK KACZMAREK (Warszawa)
GRAŻYNA PALAMARCZYK (Warszawa)
CEZARY PĄCZKOWSKI (Warszawa)
GRZEGORZ PRZEWŁOCKI (Warszawa)
MARIA RODO (Warszawa)
JANUSZ SIEDLECKI (Warszawa)
DARIUSZ STĘPKOWSKI (Warszawa)
ANNA SZAKIEL (Warszawa)
BARBARA TOMASZEWSKA (Warszawa)
BARBARA TUDEK (Warszawa)
KRZYSZTOF WĘDZONY (Kraków)
TERESA ŻOŁĄDEK (Warszawa)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA „POSTĘPY BIOCHEMII"
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel. (22) 659-85-71 w. 441
poniedziałki, czwartki 14^{00}-16^{00}
fax (22) 22-53-42

SPIS TREŚCI
CONTENTS

Zofia Lassota - Wspomnienia 226

Karol Taylor - Wspomnienia 227

Nobel 1997 z dziedzin fizjologii i medycyny 229

Funkcjonowanie GTPaz typu Rab/Ypt i ich białek eskortujących w regulacji transportu błonowego
Rab/Ypt type of GTPases and their escort proteins (REP) in the regulation of membrane transport
MARTA MIĄCZYŃSKA 231

Oksydacyjne uszkodzenia DNA — wolnorodnikowe modyfikacje zasad i dezoksyrybozy
DNA oxidative damages — free radicals modifications of bases and sugar moieties
TOMASZ HUBERT ZASTAWNY 238

Ilościowa technika PCR i jej zastosowanie w molekularnej diagnostyce hematologicznej
Quantitative PCR and its application in hematologic molecular diagnostics
MAŁGORZATA JUNGERMAN 250

Rekombinacja genetyczna (+) RNA wirusów
Genetic recombination in (+) RNA wiruses
MAREK FIGLEROWICZ, JÓZEF J. BUJARSKI 257

Tektonika RNA
RNA tectonics
MIROSŁAWA Z. BARCISZEWSKA 267

Pozagenomowe działanie steroidów w układzie nerwowym
Non-genomic action of steroids
ELŻBIETA RĘBAS, LILLA LACHOWICZ 274

Zaburzenia homeostazy miedzi są przyczyną groźnych chorób człowieka
Disturbances in copper homeostasis are the main cause of serious diseases in man
JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA, SŁAWOMIR PIKUŁA . . 281

Fotosyntetyczna izoforma karboksylazy fosfoenolopirogronianu — regulacja transkrypcyjna i potranslacyjna
Photosynthetic isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase — transcriptional and posttranslational regulation
SZECHEREZADA KATARZYNA RYDZ 287

Komunikaty Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 296

http://rcin.org.pl

Profesor Zofia Lassota — Wspomnienia

1923–1997

22 sierpnia 1997 roku w Warszawie zmarła, w pełni sił twórczych, profesor doktor habilitowany Zofia z Sobolewskich Lassota — współtwórczyni Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, wybitna specjalistka w dziedzinie biochemii owadów.

Studia wyższe ukończyła w 1950 r. na Wydziale Chemii Politechniki Gdańskiej, uzyskując tytuł magistra chemii. Jeszcze przed ukończeniem studiów rozpoczęła pracę badawczą, pod kierunkiem profesora Ernesta Syma, w Zakładzie Technologii Środków Spożywczych. Dalsza Jej kariera naukowa związana była z Warszawą. Pierwsze lata to asystentura w Zakładzie Chemii Ogólnej, a następnie Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej. W latach tych ściśle współpracowała z Zakładem Biochemii Instytutu Gruźlicy i Państwowego Zakładu Higieny. W 1954 r. rozpoczęła pracę w tworzącym się wówczas, pod kierunkiem profesora Józefa Hellera, Zakładzie Biochemii PAN. Zakład ten przekształcił się następnie w Instytut Biochemii i Biofizyki PAN. Profesor Zofia Lassota była jedną z tych osób, dzięki której powstał nasz Instytut. Związana z nim była do końca swego życia. Stopień doktora nauk przyrodniczych uzyskała w 1959 r. za pracę nad ATP-azą i pirofosfatazą kiełków roślin. Przedmiot Jej rozprawy habilitacyjnej stanowiły badania nad wpływem promieniowania jonizującego na rozwój osobniczy owadów. Po uzyskaniu w 1969 r. stopnia doktora habilitowanego została kierownikiem Pracowni Biochemii Rozwoju Osobniczego w Zakładzie Biochemii Porównawczej. W roku 1974 uzyskała tytuł profesora nadzwyczajnego, a w 1982 r. profesora zwyczajnego.

Profesor Zofia Lassota odbyła kilka staży naukowych w poważnych ośrodkach zagranicznych, między innymi w ośrodku CNRS w Cronenbourgu k. Strasbourga (prof. P. Mandel), Międzyuczelnianym Ośrodku Badań Jądrowych w Liege (prof. Z. Bacq), Międzynarodowym Laboratorium Genetyki i Biofizyki w Neapolu (prof. J. Brachet), oraz w Zakładzie Biologii Rozwoju Instytutu im. Jacques'a Monoda w Paryżu jako profesor wizytujący.

Prace badawcze profesor Zofii Lassoty koncentrowały się wokół problemów związanych z biochemią owadów. Były to badania nad układem cholinergicznym w ontogenezie, syntezą kwasów nukleinowych w embrionalnym i postembrionalnym różnicowaniu się komórek, rolą hormonów w regulacji ekspresji genów owadzich czy też rolą mózgu w regulacji hormonalnej rozwoju owadów. Jej dorobek naukowy obejmuje ponad pięćdziesiąt prac opublikowanych w czołowych czasopismach. Pod Jej redakcją powstał podręcznik „Biologia molekularna — ekspresja genu" (PWN, 1980 r. wydanie pierwsze, 1987 wydanie uzupełnione). W latach 1965-1971 była redaktorem naczelnym „Postępów Biochemii".

W czasie swej wieloletniej działalności naukowej profesor Lassota wychowała wiele pokoleń młodzieży akademickiej i pracowników naukowych. Wypromowała sześciu doktorów, była opiekunką naukową trzech habilitacji.

Oprócz działalności naukowej profesor Zofia Lassota pełniła szereg ważnych funkcji w Instytucie. Była zastępcą Dyrektora do spraw Ogólnych (1970-1972), a także zastępcą Dyrektora do spraw Naukowych (1972-1975). Na oddzielną uwagę zasługuje Jej działalność w Radzie Naukowej Instytutu. Rozpoczynała od sekretarzowania tej Radzie, pełniła funkcję zastępcy przewodniczącego Rady (1981-1983), a od 1993 r. była nieprzerwanie przewodniczącą Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

Była Osobą głęboko rozumiejącą naturę ludzką, umiejącą niezwykle trafnie i racjonalnie oceniać ludzi i motywy ich działania przy życzliwym i prawdziwie przyjacielskim do nich stosunku. Osobą o wielkiej osobistej kulturze, autorytecie i odwadze.

Jej przedwczesna śmierć okryła żałobą wychowanków Instytutu, Jej przyjaciół i znajomych z kraju i zagranicy. Odejście profesor Zofii Lassoty jest ogromną stratą dla nas wszystkich. Pozostanie w naszej pamięci nie tylko jako wybitna uczona, ale również jako serdeczny opiekun i przyjaciel.

Uczniowie i Przyjaciele

http://rcin.org.pl

Wspomnienie o Profesorze Karolu Taylorze

1928–1997

My, uczniowie i współpracownicy Profesora Karola Taylora, głęboko wstrząśnięci Jego przedwczesną śmiercią, chcielibyśmy opowiedzieć o Nim jako o Uczonym i Człowieku. Każdy z nas chciałby opisać swe kontakty z Profesorem i swoje o Nim wspomnienie, lecz na razie jest na to za wcześnie. Wiosną roku przyszłego, osamotnieni Jego odejściem, sami będziemy otwierać nowy budynek Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu i Akademii Medycznej w Gdańsku, do powstania którego tak bardzo przyczynił się Profesor. Wówczas zorganizujemy specjalną sesję naukową poświęconą pamięci profesora Taylora.

Teraz, pragniemy oddać pierwszeństwo jednemu z Jego nauczycieli, profesorowi Wacławowi Szybalskiemu, który nadesłał nam Wspomnienie o Profesorze Karolu Tylorze. We wspomnieniu omówił on Osobowość oraz najważniejsze odkrycia i osiągnięcia naszego Profesora.

Grażyna Konopa, Barbara Lipińska, Anna J. Podhajska, Bogusław i Krystyna Szewczykowie, Grzegorz Węgrzyn, Maciej Żylicz i pozostali pracownicy Wydziału Biologii, Geografii i Oceanologii UG oraz Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG

Mikrobiologia straciła wielkiego uczonego, w Osobie profesora Karola Taylora.

Chciałbym powiadomić wszystkich moich przyjaciół mikrobiologów, że 30-tego sierpnia 1997 zmarł znakomity polski mikrobiolog, wirusolog oraz biochemik, profesor Karol Taylor. Miał 69 lat. Był Rektorem Uniwersytetu Gdańskiego, jak również kierownikiem Katedry Biologii Molekularnej oraz Laboratorium Genetyki Molekularnej. Zmarł w wyniku komplikacji, powstałych po zakażeniu wirusem C żółtaczki, które doprowadziły do niekontrolowanej pooperacyjnej, opornej na antybiotyki bakteremii.

Karol Taylor urodził się 9 lutego 1928 r. w Poznaniu, w znanej rodzinie, wywodzącej się ze Szkocji, a zamieszkałej w Polsce od około trzystu lat. Ukończył Politechnikę w Gdańsku, następnie doktoryzował się z zakresu wirusologii we Wrocławiu. Stopień docenta uzyskał w 1966 r. na podstawie badań, w których wykazał, iż fag Vill koduje enzym, który — poprzez specyficzną deacylację powierzchniowego polisacharydu — odpowiada za pierwszy etap szczególnie specyficznego zakażenia salmonellą. Żona Karola, Alina, jest także wybitnym mikrobiologiem i zajmuje się badaniem funkcji i regulacji białek litycznych, kodowanych przez faga.

Z ważniejszych odkryć doktora Karola Taylora trzeba przypomnieć, że to On pierwszy, w 1966/67 wykazał zjawisko transkrypcji obu nici DNA. Badania te zostały wykonane w moim laboratorium, a ich wyniki były bulwersujące, ponieważ w tamtym czasie przyjmowano powszechnie, że tylko jedna nić, tzw. nić sensowa, ulega transkrypcji. Karol wykrył także kaskadę precyzyjnie regulowanych zdarzeń transkrypcyjnych i opublikował pierwszą mapę transkrypcyjną. W pracy tej posłużył się fagiem λ, przyczyniając się tym do uznania bakteriofaga λ za najlepszy z dostępnych w tym czasie organizm modelowy, nadający się do badań genetycznych i molekularnych. Odnośna praca została opublikowana w 1967 r. w PNAS (**67**; 1618-1625), a później przedrukowana w kilku książkach i czasopismach specjalistycznych.

Po swoim powrocie do Gdańska Karol zorganizował Uniwersytecki Instytut Biologii, obejmujący zakłady mikrobiologii, biochemii, biologii molekularnej

http://rcin.org.pl

i był jego dyrektorem do 1975 roku. W badaniach nad mechanizmami inicjacji replikacji faga λ *in vivo* (w których wykazał dużą niestabilność białka O) i *in vitro* (używając oczyszczonych białek O i P faga λ) wykorzystał komórki normalne oraz pozbawione chromosomów „minikomórki". Badania te kontynuował Karol w roku 1980/1981 w laboratorium profesora Artura Kornberga w Uniwersytecie Stanforda, gdzie wykazał fizyczne oddziaływania białek O i P z faga λ.

Karol został wybrany Rektorem Uniwersytetu Gdańskiego. Jego kadencja we wczesnych latach osiemdziesiątych przypadła na trudny okres stanu wojennego, który wprowadzono wkrótce po powstaniu Solidarności. Jako Rektor wykazał On w tym trudnym czasie swe niezwykłe wyczucie, odwagę i umiejętność obrony studentów i kolegów naukowców. W wyniku jego prodemokratycznej aktywności i publicznego głoszenia prawdy, władze komunistyczne skonfiskowały w odwecie Jego paszport i odwołały Go z funkcji Rektora przed upływem kadencji.

Represje polityczne sprawiły, że Karol podjął bardziej intensywne działania badawcze i w efekcie wykazał: (i) rolę białek DnaA i GroE gospodarza w replikacji faga λ, (ii) znaczną stabilność kompleksu replikacyjnego, która jest dziedziczona tylko przez jedną z potomnych cząsteczek DNA faga λ, w każdym jego replikacyjnym cyklu (dziedziczenie białkowe). Podczas ostatnich siedmiu lat, gdy Polska odzyskała swą pełną niepodległość, Karol opublikował blisko dwadzieścia prac głównie w dobrze znanych zachodnich czasopismach, takich jak: Journal of Bacteriology, J. Molecular Biology, Genetics, Virology, Gene, Molecular and General Genetics i innych.

Gdy odwiedziłem Go w szpitalu w Gdańsku około miesiąca przed Jego śmiercią, Karol był dobrej myśli i redagował wraz z dr Grzegorzem Węgrzynem manuskrypt pracy na temat aktywacji głównego prawostronnego promotora faga λ przez białka DnaA. Odbyliśmy prawdziwie stymulującą dyskusję naukową!

Oprócz swych badań podstawowych Karol promował badania z dziedziny mikrobiologii stosowanej, jak np. ochrona przed zakażeniem bakteriofagowym podczas fermentacji antybiotyku nizyny, zastosowanie genetyki mikrobiologicznej do monitorowania zanieczyszczeń mutagennych czy karcynogennych Morza Bałtyckiego. Karol otrzymał wiele nagród, medali, nagród naukowych i został wybrany na członka-korespondenta Polskiej Akademii Nauk.

Karol był zawsze uprzejmy, zawsze gotowy nieść pomoc; był prawdziwym dżentelmenem o szczególnym poczuciu humoru. Był wspaniałym eksperymentatorem i nauczycielem, głębokim myślicielem, a także zamiłowanym żeglarzem. Był znakomitym organizatorem, który stworzył w Uniwersytecie Gdańskim kilka nowoczesnych zakładów biologicznych o różnej orientacji; a ostatnio przyczynił się wielce do budowy nowego budynku Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG, który będzie otwarty w 1998 roku.

Karol grał ważną rolę zarówno w nauce światowej (w dziedzinie mapowania kaskady zdarzeń transkrypcji oraz replikacji DNA), jak i lokalnie, jako twórca nowoczesnej biologii na Uniwersytecie Gdańskim. Jako Wychowawca kształcił nowe generacje polskich mikrobiologów, biotechnologów oraz biologów molekularnych.

Karola i Jego geniuszu nikt nie zastąpi. Był wyjątkową osobowością. Brak będzie bardzo Jego mądrości, talentów organizacyjnych, a także Jego udziału w tworzeniu europejskiej sieci naukowej.

Bardzo dziękuję profesor Alinie Taylor i dr Grzegorzowi Węgrzynowi za pomoc w redakcji tego wspomnienia.*

Wacław Szybalski
McArdle Laboratory
University of Wisconsin
Medison, WI 53706 USA
e-mail: szybalski@oncology.wisc.edu

* wspomnienie o prof. Karolu Taylorze zostało przygotowane dla AMS News, przekład za zgodą Autora.

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.

http://rcin.org.pl

Nagroda Nobla za priony

Nobel prize for prions

PAWEŁ P. LIBERSKI*)

Przyznanie tegorocznej Nagrody Nobla Stanleyowi B. Prusinerowi, profesorowi Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco [1] (Ryc. 1) zbiegło się z opublikowaniem w ostatnim numerze Nature dwóch prac — Johna Collinge'a z Londynu i Moiry Bruce w Edynburgu, który udowodniły ponad wszelką wątpliwość, że nowy wariant CJD jest wynikiem przepasażowania BSE na człowieka [2–4].

Stanley B. Prusiner sformułował teorię „prionu" [2]. Wirusy są to patogeny zwierząt, owadów, roślin a nawet bakterii. W odróżnieniu od wszystkich organizmów żywych zawierają tylko jeden kwas nukleinowy, DNA lub RNA (wszystkie inne organizmy zawierają zawsze oba kwasy nukleinowe) oraz płaszcz białkowy; najmniejsze wiruso-podobne twory (wiroidy roślin) nie zawierają już białek a tylko kolistą cząsteczkę RNA. Wg Prusinera, który otrzymał Nagrodę Nobla za tą właśnie koncepcję, czynnik infekcyjny scrapie (prion od *proteinaceous infectious particle* z przestawionymi samogłoskami) jest jeszcze prostszy i nie zawiera już nawet kwasu nukleinowego, składając się z patologicznego białka PrP^{sc} o odmiennej konformacji przestrzennej (mówimy o patologicznym „konformerze") od białka komórkowego, PrP^{c}. PrP^{Sc} odkłada się następnie w mózgu pod postacią blaszek amyloidowych lub tzw. „synaptycznych" depozytów PrP. Prusiner i jego proponenci sugerują, że w wyniku zakażenia, PrP^{SC} jako matryca narzucą PrP^{C} swoj patologiczny kształt, innymi słowami, cząsteczka PrP^{SC} zmienia cząsteczkę zdrowego białka PrP^{C} w kolejną cząsteczkę zakaźnego PrP^{SC} (sekwencja PrP^{C} i PrP^{SC} jest jednakowa).

Choroby wywołane przez priony (kuru, CJD, choroba Gerstmanna-Strausslera-Scheinkera i śmiertelna rodzinna bezsenność oraz scrapie i choroba szalonych krów) stanowią część większej grupy tzw. nowotworów białek (ang. *protein cancers*), chorób wywołanych odkładaniem się patologicznych konformerów różnych białek: beta peptydu (Aβ) w chorobie Alzheimera czy, odkrytej kilka tygodni temu, alfa-synukleiny w chorobie Parkinsona [5–7], huntingtiny tworzącej włókna amyloidowe w chorobie Huntingtona [8], czy frataksyny w ataksji Friedreicha [9]. Jedynie choroby wywołane przez priony są wywołane przez czynnik infekcyjny. Co powoduje odkładanie się patologicznych konformerów innych białek — nie wiemy, ale mechanizm jest identyczny, choć etiologia jest różna.

Ryc. 1. Stanley B. Prusiner z autorem artykułu na III Międzynarodowym Sympozjum „Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion diseases". Paryż, Marzec 1996.

Uczestniczyłem w 1984 roku w sympozjum w New Battle Abbey, zorganizowanym celem zdyskredytowania Stanleya B. Prusinera i jego teorii, który praktycznie pojedynczo starał się w ciągu pięciu lat morderczego wręcz wysiłku oczyścić czynnik zakaźny scrapie [10]. W 1982 roku, Stanley wysunął teorię prionu [11], w 1984 we współpracy z Leroy Hoodem zsekwencjonował N-koniec PrP [12], w 1985 wraz z Charlie Weismannem sklonował gen dla PrP [13]. Odkrycia te stały się podstawą Nagrody Nobla dla Prusinera.

Pomimo, że teoria prionu jest teorią dominującą, nie jest jednak teorią powszechnie uznaną. Poważną przeszkodą w jej powszechnej akceptacji jest obecność tzw.

*) Samodzielna Pracownia Biologii Nowotworów Katedry Onkologii Akademii Medycznej w Łodzi.

http://rcin.org.pl

szczepów scrapie — to znaczy izolatów czynnika infekcyjnego (prionu), które zachowują charakterystyczne cechy pomimo przepasażowywania przez organizmy różnych gatunków. Np. szczep, który wywołał nowy wariant choroby Creutzfeldta-Jakoba po przepasażowaniu z krów zakażonych encefalopatią gąbczastą bydła zachowuje te same cechy po przepasażowaniu na koty, świnie i antylopę kudu. Natomiast sekwencja PrP zwierząt wszystkich tych gatunków jest odrębna. Prusiner uważa, że PrP^{SC} może mieć wiele różnych konformacji przestrzennych. Cząsteczki PrP o odmiennej konformacji przestrzennej byłyby właśnie szczepami scrapie.

Laureat Nagrody Nobla, D.C. Gajdusek sądzi inaczej. Zakaźną nie jest według niego pojedyncza cząsteczka PrP^{SC}, lecz jej agregat, „kryształ". Początkowo PrP^{SC} tworzy jądro krystalizacji, (ang. „a seed"), wokół którego odkładają się kolejne cząsteczki PrP^{SC}. Tak, jak z tej samej zamarzniętej wody można stworzyć nieskończenie wiele form płatków śniegu, tak ta sama cząsteczka PrP^{SC} może utworzyć różniące się kształtem kryształy szczepów scrapie. Niestety, nikt nigdy nie obserwował mechanizmu, który umożliwiłby tworzenie takich odmiennych kryształów w komórce, nie znaczy to jednak, że mechanizmu takiego nie ma, może po prostu nie został jeszcze odkryty, a i Prusinger i Gajdusek mają rację. Może ...

Na zakończenie kilku uwag osobistych. Chciałbym przypomnieć, że pole to zostało uhonorowane drugą już Nagrodą Nobla — pierwszą przyznano w 1976 roku dr D. Carletonowi Gajduskowi, z którym miałem zaszczyl pracować — i cały czas pracuję — przez wiele lat. Cieszę się, że pole, któremu poświęciłem swoje zawodowe życie, stało się warte dwóch Nagród Nobla.

Piśmiennictwo

1. Coles H (1997) *Nature* **389**: 529
2. Liberski PP, Bratosiewicz J (1996) *Post Bioch* **42**: 320—330
3. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock C (1997) *Nature* **389**: 498—501
4. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P (1997) *Nature* **389**: 448—450
5. Goedert M (1997) *Nature* **338**: 232—233
6. Heintz N, Zoghbi H (1997) *Nature Gen* **16**: 325—327
7. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubestein J, Boyer R, Steroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson JG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) *Science* **276**: 2045—2047
8. Scheruinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE (1997) *Cell* **90**: 549—558
9. Gray JV, Johnson KJ (1997) *Nature Gen* **16**: 323—325
10. Liberski PP (1986) *Post. Bioch* **32**: 203—223
11. Prusiner SB (1982) *Science* **216**: 136—144
12. Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE (1984) *Cell* **38**: 127—134
13. Oesch B, Westaway D, Walchlii M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, Weissmann C (1985) *Cell* **40**: 735—746

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
e-mail ptbioch@nencki.gov.pl

Dyżury biura Zarządu odbywają się jak dotychczas
we wtorki w godz. 12-18

http://rcin.org.pl

Redakcja Postępów Biochemii zamówiła niniejszy artykuł. Jednocześnie z prawdziwą przyjemnością przedstawia autorkę, życząc Jej wielu sukcesów w tak dobrze rozpoczętej karierze naukowej.

Dr Marta Miączyńska jest absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemii, specjalność biologia molekularna, Uniwersytetu Jagiellońskiego. W roku 1993 otrzymała stypendium doktoranckie im. Berthy von Suttner, ufundowane przez austriackie Ministerstwo Nauki i rozpoczęła pracę w Zakładzie Mikrobiologii i Genetyki Uniwersytetu w Wiedniu. Tematyka pracy dotyczyła charakterystyki produktów genów kodujących białka eskortujące REPw drożdżach. Stopień naukowy doktora otrzymała w roku 1996 a w październiku br. podjęła pracę w Europejskim Laboratorium Biologii Molekularnej w Heidelbergu.

Funkcjonowanie GTPaz typu Rab/Ypt i ich białek eskortujących w regulacji transportu błonowego

Rab/Ypt type of GTPases and their escort proteins (REP) in the regulation of membrane transport

MARTA MIĄCZYŃSKA*

Spis treści:

I. Wstęp
II. GTPazy jako regulatory transportu błonowego
II-1. Białka z rodziny Rab/Ypt i ich lokalizacja wewnątrzkomórkowa
II-2. Czynniki regulujące funkcjonowanie białek Rab/Ypt
II-3. Prenylacja białek Rab/Ypt, białka eskortujące Rab (REP)
III. Cykliczne funkcjonowanie białek Rab/Ypt
IV. REP a choroideremia
V. Ślepe drożdże czyli badania REP u *S. cerevisiae*
VI. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. GTPases as regulators of membrane transport
II-1. Proteins of Rab/Ypt family and their intracellular localisation
II-2. Factors regulating Rab/Ypt function
II-3. Prenylation of Rab/Ypt proteins, Rab escort proteins (REP)
III. Rab/Ypt protein cycling
IV. REP and choroideremia
V. Blind yeast or investigation of REP in *S. cerevisiae*
VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: REP — białko eksortujące Rab, Rab GDI — inhibitor dysocjacji GDP; RabGGPTaza — transferaza geranylogeranylu dla białek Rab; GEF — czynnik przyspieszający wymianę nukleotydu; GAP — białko zwiększające aktywność GTPazową.

I. Wstęp

Transport wewnątrzkomórkowy przebiegający za pośrednictwem pęcherzyków błonowych zapewnia właściwą organizację i funkcjonowanie organelli komórkowych oraz leży u podstaw procesów sekrecji i endocytozy. Ostatnie lata przyniosły olbrzymią ilość doniesień opisujących różne aspekty transportu błonowego. Wynika z nich, że podstawowe etapy i mechanizmy molekularne transportu, takie jak formowanie pęcherzyków (ang. *vesicle budding*), rozpoznanie błony docelowej przez pęcherzyki (ang. *vesicle docking*) i ich fuzja (ang. *vesicle fusion*), zostały zachowane w procesie ewolucji we wszystkich komórkach eukariotycznych [1-3]. Trzy podejścia doświadczalne okazały się szczególnie przydatne w badaniach transportu wewnątrzkomórkowego. Obok eksperymentów biochemicz-

*dr, Cell Biology Programme, EMBL, Meyerhofstr. 1, D-69012, Heidelberg, Germany

http://rcin.org.pl

nych mających na celu analizę składu pęcherzyków synaptycznych w neuronach oraz prób rekonstytucji poszczególnych etapów transportu w warunkach *in vitro* — genetyczne badania drożdży *Saccharomyces cerevisiae* doprowadziły do odkrycia wielu typów białek uczestniczących w procesach transportu w komórce. W niniejszym artykule chciałabym przedstawić jedną z klas białek regulujących transport błonowy we wszystkich komórkach eukariotycznych, jaką reprezentują GTPazy typu Rab/Ypt. Dzięki cyklicznym zmianom konformacji oraz zdolności do krążenia pomiędzy błonami organelli a cytosolem białka Rab/Ypt zapewniają specyficzność i kierunkowość procesów transportu. Prawidłowe funkcjonowanie Rab/Ypt zależy w dużym stopniu od oddziaływań z białkami regulatorowymi, spośród których białka eskortujące, tak zwane REP, odgrywają szczególną rolę.

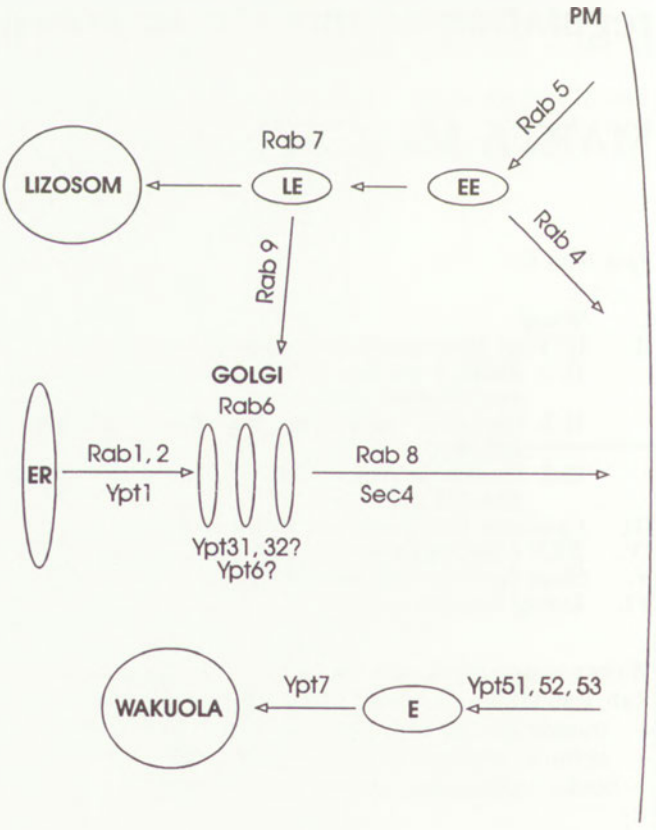
II. GTPazy jako regulatory transportu błonowego

II-1. Białka z rodziny Rab/Ypt i ich lokalizacja wewnątrzkomórkowa

Pierwsze białka wiążące GTP i regulujące sekrecję odkryto w latach osiemdziesiątych w komórkach drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*. Białka Ypt1 i Sec4 wykazywały nie tylko aktywność GTPazową, ale również znaczne podobieństwo strukturalne do produktów onkogenów Ras [4,5]. Z czasem zidentyfikowano kolejne białka G wykazujące homologię do Ypt1 i Sec4 i funkcjonujące w transporcie wewnątrzkomórkowym, które tworzą rodzinę liczącą obecnie ponad 30 członków u ssaków (białka określane nazwą Rab) i około 10 u drożdży (białka Ypt) [6-8]. Obok innych rodzin białek takich jak Ras, Rho/Rac, Ran i Arf, białka Rab/Ypt są klasyfikowane jako małe białka G podobne do Ras (ang. *Ras-like small G proteins*), ponieważ w odróżnieniu od heterotrimerycznych białek G, wszystkie białka należące do tej grupy charakteryzują się masą cząsteczkową w granicach 20-28 kDa [9, 10].

Cechą charakterystyczną białek Rab/Ypt jest ich ściśle określone rozmieszczenie w komórce [11]. Poszczególne białka tej klasy są zlokalizowane w błonach określonych organelli komórkowych i regulują dzięki temu dany etap transportu (Ryc. 1). Przykładowo, białko Ypt1 w komórkach drożdży pośredniczy w transporcie pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego i jest zlokalizowane w błonach tych organelli [12], podczas gdy inne drożdżowe białko typu Ypt, Sec4, „reguluje ruch" między aparatem Golgiego a błoną komórkową [5, 13].

Uważa się, że na poziomie molekularnym rola białek Rab/Ypt w transporcie wewnątrzkomórkowym polega na regulacji oddziaływania między specyficznymi białkami (tak zwanymi SNAREs) obecnymi na błonie pęcherzyka-donora (ang. *vesicle* SNARE, v-SNARE) i na błonie docelowego organellum (ang. *target* SNARE, t-SNARE), które mają połączyć się w procesie fuzji. Omawianie kompleksów SNARE wykracza poza ramy obecnego artykułu [problematyka ta została przedstawiona w artykułach przeglądowych 3, 14-17], należy natomiast wspomnieć, że obecność aktywnego Rab/Ypt związanego z GTP oraz prawdopodobnie jego dalszych efektorów jest jednym z warunków oddziaływania między kompleksami v-SNARE i t-SNARE obecnymi na dwóch kompartmentach błonowych [7, 18]. Komórka musi więc posiadać mechanizmy zapewniające aktywację Rab/Ypt w odpowiednim czasie i miejscu, jak również mechanizmy umożliwiające „recycling" białka Rab/Ypt po zakończeniu fuzji ponownie do błony-donora. W związku z tym oprócz cyklicznych zmian konformacyjnych powodujących aktywację i inaktywację wynikające z rodzaju związanego nukleotydu, białka Rab/Ypt krążą pomiędzy właściwym sobie typem błony a cytosolem. Efektem tego jest występowanie białek Rab/Ypt w komórce w dwóch pulach: dominującej błonowej i mniejszej rozpuszczalnej w cytosolu (por. rozdział III).



Ryc. 1. Schemat lokalizacji wewnątrzkomórkowej wybranych białek Rab w komórkach ssaczych i białek Ypt u drożdży *S. cerevisiae*. Strzałki symbolizują kolejne etapy sekrecji lub endocytozy regulowane przez poszczególne białka Rab/Ypt. Objaśnienia skrótów: PM — błona komórkowa; EE — wczesny endosom (ang. *early endosome*) w komórkach ssaczych; LE — późny endosom (ang. *late endosome*) w komórkach ssaczych; ER — retikulum endoplazmatyczne; E — endosom w komórkach drożdży.

http://rcin.org.pl

II-2. Czynniki regulujące funkcjonowania białek Rab/Ypt

Podobnie do innych GTPaz, białka Rab/Ypt mają zdolność wiązania nukleotydów guaninowych i hydrolizy GTP, jednakże szybkość samoistnej wymiany nukleotydów (GDP na GTP) oraz hydrolizy GTP jest w przypadku białek Rab/Ypt bardzo niska i w związku z tym mogą one istnieć w dwóch stabilnych konformacjach: aktywnej po związaniu GTP i nieaktywnej w kompleksie z GTP [18]. Krążąc pomiędzy tymi dwoma stanami białka Rab/Ypt spełniają rolę „molekularnych przełączników" (ang. *molecular switches*) w procesach sekrecji i endocytozy. Jedynie aktywna forma Rab/Ypt w kompleksie z GTP umożliwia zajście procesów prowadzących do fuzji błon.

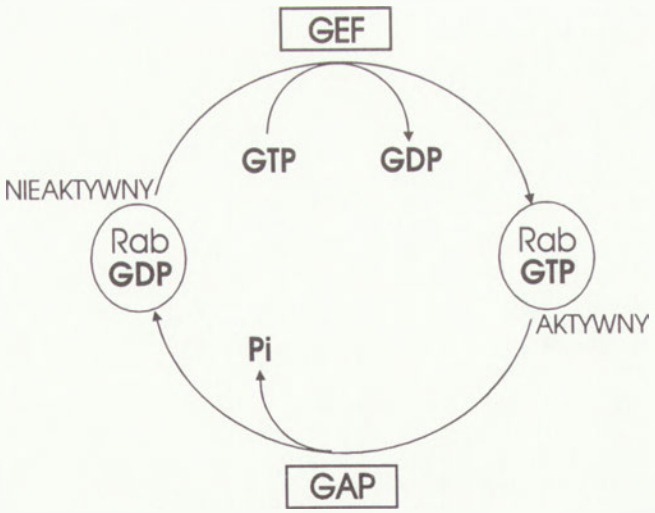
Znane są dwa typy białek regulatorowych ułatwiających białkom Rab/Ypt przybranie odpowiedniej konformacji. Są to czynniki przyspieszające wymianę nukleotydu (ang. *guanine nucleotide exchange factor*; GEF), które ułatwiają dysocjację GDP i związanie GTP i w ten sposób aktywują Rab/Ypt, oraz białka zwiększające aktywność GTPazową (ang. *GTPase activating protein*; GAP), które przyspieszają hydrolizę GTP i inaktywację białka Rab/Ypt [19, 20] (Ryc. 2).

W przeciwieństwie do białek typu GEF i GAP, które są specyficzne dla poszczególnych Rab/Ypt [21, 22], białko zwane Rab GDI (ang. *GDP dissociation inhibitor*) może oddziaływać ze wszystkimi białkami Rab/Ypt w danym momencie związanymi z GDP. Rab GDI jest inhibitorem dysocjacji GDP i stabilizuje w ten sposób nieaktywną konformację białek Rab/Ypt, jak również reguluje ich krążenie między błonami a cytosolem [23-25] (por. rozdział III).

II-3. Prenylacja białek Rab/Ypt, białka eskortujące Rab (REP)

Aby móc regulować procesy transportu pęcherzykowego białka Rab/Ypt muszą być związane z błonami wewnątrzkomórkowymi. Jednakże Rab/Ypt są syntetyzowane jako białka rozpuszczalne i ich zdolność do wiązania się z błonami zależy od prenylacji, nieodwracalnej lipidowej modyfikacji posttranslacyjnej, która nadaje białkom własności hydrofobowe [26]. Prenylacja polega na kowalencyjnym dołączeniu grupy farnezylowej (C_{15}) lub geranylogeranylowej (C_{20}) poprzez wiązania tioeterowe do reszt cysteinowych znajdujących się na C-końcu modyfikowanego białka [27, 28]. Biochemia i znaczenie procesów prenylacji została niedawno szczegółowo opisane na łamach *Postępów Biochemii* [29].

Białka Rab/Ypt są zwykle zakończone sekwencją Cys-Cys lub Cys-X-Cys (X oznacza dowolny aminokwas) [30], gdzie obydwie reszty cysteinowe są modyfikowane przez dodanie geranylogeranylu w reakcji katalizowanej przez enzym określony jako Rab geranylogeranylotransferaza (RabGGPTaza). Enzym ten



Ryc. 2. Cykl GTPazowy białek Rab/Ypt i jego regulacja przez czynniki przyspieszające wymianę nukleotydu (GEF) i białka zwiększające aktywność GTPazową (GAP).

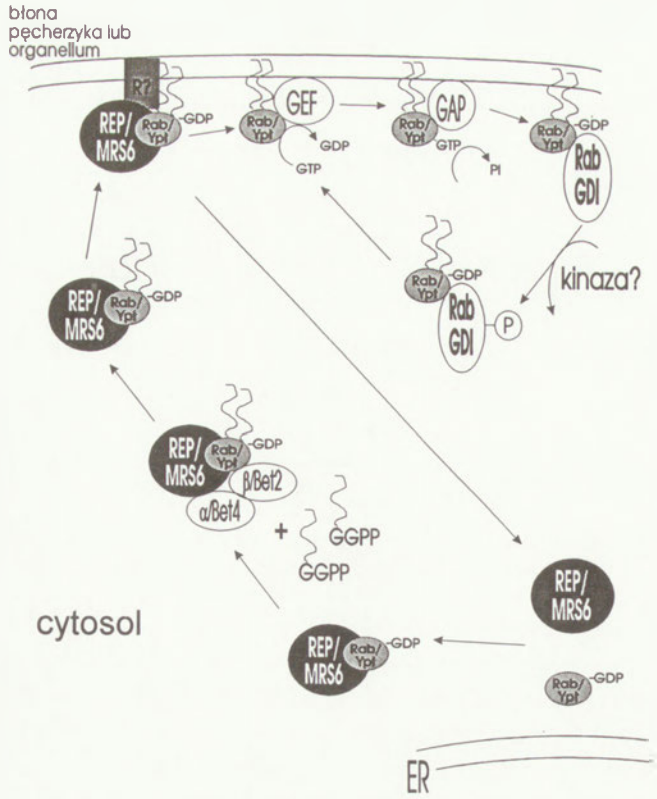
jest heterodimerem składającym się z podjednostek α i β [31]. Cechą odróżniającą RabGGPTazę od innych prenylotransferaz białkowych jest fakt, że jako substrat rozpoznaje ona nie samo białko Rab/Ypt, a jego kompleks z białkiem pomocniczym, tak zwanym białkiem eskortującym Rab (ang. *Rab escort protein*; REP; początkowo określanym również jako komponent A RabGGPTazy), które odgrywa również ważną rolę w dalszych etapach funkcjonowania białek Rab/Ypt [32, 33].

III. Cykliczne funkcjonowanie białek Rab/Ypt w komórce

Liczne doświadczenia, głównie na hodowlach komórek ssaczych, doprowadziły do ustalenia modelu opisującego cykliczne funkcjonowanie białek Rav w komórce i rolę białek pomocniczych takich jak REP i Rab GDI w tym procesie [33-35] (Ryc. 3). Zgodnie z przedstawionym modelem, natywne białko Rab zostaje związane przez białko eskortujące REP. Rozpoznanie kompleksu Ryb-REP przez RabGGPTazę umożliwia podwójną prenylację Rab poprzez dodanie grup geranylogeranylu do obu C-końcowych reszt cysteinowych. Reakcja ta zachodzi w dwu etapach: produktem pierwszego jest kompleks pomiędzy monogeranylogeranylowanym Rabv i REP, którego duża stabilność umożliwia w etapie drugim efektywne dodanie kolejnej reszty prenylowej do białka Rab [36].

Po zakończeniu reakcji prenylacji REP pozostaje w kompleksie ze zmodyfikowanym Rab i „eskortuje" go do błony specyficznego organellum typowego dla danego białka Rab [34]. Szczegóły tego procesu nie są znane, ale sugeruje się, że istnieje specyficzny receptor błonowy dla prenylowanego Rab lub kompleksu Rab-REP. Podczas asocjacji Rab z błoną, REP jest uwalniany do cytoplazmy, gdzie może uczestniczyć w kolejnej rundzie prenylacji, natomiast Rab przechodzi wymianę GDP na GTP stymulowaną przez błonowe

http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Krążenie białek Rab/Ypt między błonami a cytozolem wskutek oddziaływań z REP i Rab GDI. Dokładny opis w tekście (rozdział III). Na schemacie pominięto oddziaływania Rab/Ypt z efektorami i kompleksami białkowymi SNAREs prowadzące do rozpoznania i fuzji błon pęcherzyków i organelli.
Objaśnienie skrótów: REP — białko eskortujące Rab; Rab GDI — inhibitor dysocjacji GDP; ER — retikulum endoplazmatyczne; GGPP — dwufosforan geranylogeranylu; α/Bet2 i β/Bet4 — odpowiednio: podjednostki α i β transferazy geranylogeranylu dla białek Rab (kodowane u drożdży przez geny BET2 i BET4); R — hipotetyczny receptor błonowy dla białek Rab/Ypt lub kompleksu REP-Rab/ypt; GEF — czynnik przyspieszający wymianę nukleotydu; GAP — białko zwiększające aktywność GTPazową.

białko z rodziny GEF. W swej aktywnej konformacji Rab oddziałuje z dalszym efektorem/efektorami, umożliwiając powstanie kompleksów białkowych zaangażowanych w rozpoznawanie i fuzje odpowiednich pęcherzyków. W ten sposób aktywowane białka Rab zapoczątkują i zapewniają czasową koordynację procesów rozpoznania i fuzji błon (ang. *molecular timers*) [37]. Dokładny mechanizm poprzez który białko Rab i jego efektory regulują aktywność kompleksów SNAREs nie jest jednak znany. Dotychczas odkryto dwa bezpośrednie efektory dla białek Rab: rabaptynę-5 (specyficzną dla Rab5) i rabfilinę (specyficzną dla Rab3), które są rekrutowane z cytosolu do odpowiednich błon przez aktywowane Rab związane z GTP [38-40].

Po hydrolizie GTP, następującej przy udziale białek o aktywności GAP i po zakończeniu procesów fuzji, nieaktywne Rab powinno zostać ponownie dostarczone do błony donora. Następuje to dzięki białku Rab GDI, które rozpoznaje prenylowane, związane z GDP Rab i uwalnia je z błon [25]. W związku z tym w komórce istnieje zawsze pula białek Rab w cytosolu w kompleksie z Rab GDI [41]. Rab GDI może dostarczyć Rab ponownie do odpowiedniej błony poprzez mechanizm analogiczny do eskortowania Rab przez REP, rozpoczynając w ten sposób kolejny cykl [42-44]. Niedawno opisano błonowe białko, tak zwany czynnik uwalniający GDI (ang. GDI *displacement factor*, GDF), które ułatwia dysocjację kompleksu GDI-Rab i związanie Rab z błonami [45]. Czynnik ten może więc odgrywać rolę postulowanego receptora błonowego dla Rab. Sugeruje się ponadto, że fosforylacja Rab GDI odgrywa rolę w regulacji krążenia białek Rab między cytosolem i błonami [46]. Zgodnie z tym modelem, białka Rab są związane w cytosolu z fosforylowaną formą Rab GDI, podczas gdy oddziaływanie z błonowymi Rab następuje przez niefosforylowaną formę GDI. Mechanizm ten mógłby wytłumaczyć konieczną równowagę między dwoma przeciwstawnymi procesami (solubilizacji i asocjacji z błonami białek Rab), które przebiegają za pośrednictwem Rab GDI.

Opisany funkcjonalny cykl białek Rab może okazać się w rzeczywistości jeszcze bardziej skomplikowany i regulowany przez dalsze czynniki. Stwierdzono na przykład, że konformacja białka Rab w kompleksie z GDP jest preferowana przy geranylogeranylacji wskutek większego powinowactwa wykazywanego przez REP do Rab w konformacji z GDP w porównaniu z GTP [47]. Ponieważ wewnątrzkomórkowe stężenie GTP jest wyższe niż GDP [48], natywne białka Rab są prawdopodobnie związane z GTP. W związku z tym nie wyklucza się istnienia pomocniczego białka o aktywności GAP, które wiązałoby się z natywnym Rab jeszcze przed utworzeniem kompleksu z REP i wspomagałoby hydrolizę GTP, umożliwiając następnie skuteczną prenylację. Alternatywnie, REP mógłby działać jako białko chroniące (ang. *chaperone*) wiążąc się z Rab już w trakcie uwalnianie z rybosomów i w ten sposób zmuszając Rab do przyjęcia konformacji w kompleksie z GDP. Żaden z tych modeli nie został jak dotąd potwierdzony doświadczalnie.

Liczne podobieństwa strukturalne i funkcjonalne pomiędzy REP i Rab GDI doprowadziły do stwierdzenia, że Rab GDI jest wyspecjalizowaną formą REP. Wiadomo, że oba białka hamują dysocjację GDP z białek Rab, utrzymując je w stanie nieaktywnym, a w komórkach permeabilizowanych oba mogą dostarczać jak i ekstrahować prenylowane Rab z błon [34]. Rab GDI nie rozpoznaje jednak nieprenylowanych Rab i nie może asystować w reakcji geranylogeranylacji [34]. W związku z tym *in vivo* REP dostarcza białka Rab po raz pierwszy do błon bezpośrednio po ich modyfikacji, podczas gdy Rab GDI jest odpowiedzialny za dalsze cykle asocjacji i dysocjacji [35].

Jakie znaczenie biologiczne mają cykliczne zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej białek Rab/Ypt? Wydaje się, że służą przede wszystkim lepszemu wykorzystaniu komórkowej puli tych białek i dzięki temu

http://rcin.org.pl

prawdopodobnie większej wydajności procesów transportu. W przeciwieństwie do asocjacji białek Rab/Ypt z błonami, ich dysocjacja za pośrednictwem Rab GDI nie ma krytycznego znaczenia dla procesów transportu. Wykazano bowiem, że białka Ypt1 i Sec4 mogą funkcjonować w transporcie błonowym u drożdży po zastąpieniu ich prenylowanych C-końców heterologicznymi domenami transbłonowymi [49]. Te zmodyfikowane formy białek nie mogły być usuwane z błon przez Rab GDI i ich funkcjonowanie w komórce było mniej wydaje w porównaniu z normalnymi prenylowanymi odpowiednikami. Oznacza to, że w przypadku białek Rab/Ypt ich asocjacja z błonami poprzez reszty prenylowe stwarza znacznie większe możliwości regulacyjne i jest korzystniejsza dla komórki niż byłoby ich stałe zakotwiczenie w błonie jak ma to miejsce w przypadku białek integralnych.

IV. REP a choroideremia

Opisano dotychczas dwie formy białka REP w komórkach ssaków oraz jedną w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. REP-1 u ludzi jest produktem genu choroideremii (CHM) znajdującego się na chromosomie X [50, 51]. Delecje w locus CHM wywołują postępującą degenerację siatkówki, która objawia się w wieku młodzieńczym stopniowym ograniczeniem widzenia i prowadzi do całkowitej ślepoty w wieku średnim. Jedna trzecia światowych przypadków tej rzadkiej choroby została opisana w Skandynawii, gdzie pacjenci okazali się potomkami pewnej fińskiej pary żyjącej w siedemnastym wieku (jest to typowy efekt założyciela — ang. *founder effect*) [52, 53].

Limfoblasty pacjentów z choroideremią wykazują znaczny spadek zdolności do prenylacji białek Rab, który jest odwracalny *in vitro* po dodaniu oczyszczonego szczurzego białka REP-1 [54]. Fakt, że kliniczne objawy choroby są ograniczone do dystrofii siatkówki (podczas gdy całkowity brak aktywności RabGGPTazy byłby prawdopodobnie letalny już w rozwoju embrionalnym) sugerował istnienie innego białka REP, które mogłoby kompensować nieobecność REP-1. Ta hipoteza została potwierdzona odkryciem białka REP-2, w 75% identycznego z REP-1 i będącego produktem genu CHML (*choroideremia-like*) na chromosomie 1 [55]. Porównawcze badania REP-1 i REP-2 wykazały, że mają one podobną aktywność w stosunku do większości białek Rab, z wyjątkiem Rab3A (dla którego RabGGPTaza wykazuje niższą v_{max} w obecności REP-2 w porównaniu do REP-1) oraz Rab27, które nie może być efektywnie prenylowane *in vivo* w obecności REP-2 [55, 56]. U pacjentów cierpiących na choroideremię Rab27 jest jedynym wykrywalnym białkiem, które wskutek braku REP-1 nie może wiązać się z błonami i gromadzi się w formie rozpuszczalnej w cytosolu. Rab27 podlega ekspresji w siatkówce i naczyniówce, których degeneracja objawia się w choroideremii, ale również w innych tkankach ciała ludzkiego [56]. Przy założeniu, że Rab27 reguluje specyficzny dla siatkówki i naczyniówki etap transportu błonowego i nie może być w tym zastąpiony przez inne białka Rab — jest możliwe, że właśnie selektywna dysfunkcja Rab27 prowadzi do wystąpienia objawów choroby.

V. Ślepe drożdże czyli badania REP u *S. cerevisiae*

Łatwość przeprowadzania eksperymentów genetycznych i dostępność licznych mutantów, tak zwanych-mutantów *sec*, wykazujących zahamowanie sekrecji na określonym etapie w komórce przyczyniły się do szerokiego zastosowania drożdży *S. cerevisiae* jako systemu modelowego do badania procesów transportu błonowego [57]. Liczba białek Ypt u drożdży jest zdecydowanie mniejsza niż Rab u ssaków. Co ciekawe, tylko niektóre z nich są niezbędne do przeżycia komórek — takie jak Ypt1p lub Sec4p [4, 5] — podczas gdy delecja genów kodujących inne Ypt wywołuje np. upośledzenie transportu, ale nie jest letalna [58--61]. Genami niezbędnymi są za to *BET4* i *BET2* kodujące odpowiednio podjednostki α i β RabGGPTazy [62], gen *MRS6/MSI4* kodujący drożdżowe białko REP [63-66] oraz gen *GDI1* (kodujący Rab GDI), w którym wcześniej odkryto mutację *sec19-1* [67]. Dane te wskazują, że w komórkach drożdży czynniki te są jedynymi formami (w przeciwieństwie do ssaków posiadających co najmniej dwa różne białka REP i kilka izoform Rab GDI [68], co ułatwia badanie relacji pomiędzy nimi. Wykazano na przykład, że *MRS6* nie jest w stanie zastąpić niefunkcjonalnego genu *GDI1*, co świadczy o tym, że zadania tych białek w komórce są częściowo odrębne, mimo funkcjonalnych podobieństw stwierdzonych w systemie ssaczym [68].

Badania nad białkiem Mrs6p, drożdżowym REP, oprócz aspektów czysto poznawczych mają znaczenie również ze względu na patogenezę choroideremii, wywoływanej u ludzi przez niefunkcjonalne białko REP-1. Analiza defektów w locus CHM u pacjentów z choroideremią wykazała, że w większości przyczyną choroby były delecje całej ramki odczytu, zaburzenia w składaniu mRNA lub nonsensowne mutacje prowadzące do delecji na C-końcu białka [69, 70]. Ograniczenia techniczne utrudniają systematyczną analizę mutacyjną białka REP-1 *in vivo*, co jest możliwe bez większych trudności w komórkach drożdży. Jednym z wyznaczników funkcji REP są tak zwane regiony zachowane strukturalnie (ang. *structurally conserved regions*, SCRs), wspólne dla wszystkich form REP i Rab GDI, położone w N-końcowej części białka [71, 72]. Analiza mutacyjna Mrs6p wykazała, że zarówno regiony SCR jak i C-koniec są niezbędne do zapewnienia prawidłowej konformacji białka umożliwiającej wiązanie Ypt i jego dalszą prenylację [73].

Badania lokalizacji wewnątrzkomórkowej Mrs6p

http://rcin.org.pl

wskazują, że funkcjonowanie REP w komórce może być bardziej skomplikowane niż pierwotnie zakładano. Przeważająca część Mrs6p jest rozpuszczalna w cytosolu, gdzie zachodzi prenylacja (katalityczne podjednostki RabGGPTazy są również białkami rozpuszczalnymi), ale istnieje także mniejsza frakcja Mrs6p, związana peryferalnie z błonami mikrosomalnymi, głównie retikulum endoplazmatycznego [74]. Frakcja ta nie powstaje w wyniku oddziaływań REP z błonami na etapie eskortowania Rab/Ypt po prenylacji (REP jest uwalniany do cytosolu w momencie związania Rab z błonami) lecz może reprezentować wcześniejszy etap cyklu i odzwierciedlać rolę Mrs6p jako białka ochronnego (ang. *chaperone*) pomagającego uwalniać natywne Ypt z rybosomów.

Historia odkrycia genu *MRS6/MSI4* wskazuje, że jego produkt może wpływać także na procesy nie będące bezpośrednio związane z transportem wewnątrzkomórkowym. Gen ten został wyizolowany niezależnie jako supresor mitochondrialnego defektu w oddychaniu wywołanego dysrupcją genu *MRS2* [75] oraz jako supresor nadwrażliwości na szok cieplny (ang. *heat shock sensitivity*) spowodowanej przez mutacje wywołujące konstytutywną aktywację ścieżki Ras-cAMP (ang. Ras-cAMP *pathway*) i wysoki wewnątrzkomórkowy poziom cAMP [64]. Z kolei mutacje Mrs6p mogą wywoływać w komórce efekty plejotropowe takie jak zaburzenia pączkowania czy morfologiczne zmiany mitochondriów [U. Białek-Wyrzykowska, wyniki nieopublikowane]. Mechanizm obserwowanych zjawisk nie jest jak dotąd jasny, ale szerokie spektrum procesów, na które może wpływać drożdżowe białko REP wskazuje, że jego funkcja sięga dalej niż tylko bezpośrednie oddziaływania z białkami klasy Rab/Ypt.

VI. Uwagi końcowe

Odkrycie rodziny białek Rab/Ypt udowodniło, że transport błonowy — obok wielu innych procesów w komórce — podlega regulacji poprzez białka G. Oprócz typowego dla białek G cyklu GTPazowego, podstawą działania Rab/Ypt są cykliczne zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Funkcjonowanie białek Rab/Ypt jest jednym z najlepiej opisanych przykładów w jaki sposób modyfikacja lipidowa, jaką jest prenylacja, oraz oddziaływania z białkami pomocniczymi umożliwiają ciągłe krążenie Rab/Ypt pomiędzy specyficznym typem błon wewnątrzkomórkowych a cytosolem. Zadaniem trwających jeszcze badań jest natomiast wyjaśnienie mechanizmów warunkujących ściśle określoną lokalizację białek Rab/Ypt w błonach odpowiednich organelli komórkowych oraz mechanizmów oddziaływania białek Rab/Ypt z kompleksami SNARE.

Podziękowanie

Dziękuję Urszuli Białek-Wyrzykowskiej i Rafałowi Cioskowi za cenne uwagi krytyczne.

Artykuł otrzymano 15 czerwca 1997 r.
Zaakceptowano do druku 9 lipca 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Benett MK, Scheller RH (1993) *Proc Natl Sci USA* **90**: 2559-2563
2. Ferro-Novick S, Jahn R (1994) *Nature* **370**: 191-193
3. Rothman JE (1994) *Nature* **372**: 55-63
4. Gallwitz D, Donath C, Sander C (1983) *Nature* **306**: 704-707
5. Salminen A, Novick PJ (1987) *Cell* **49**: 527-538
6. Touchot N, Chardin P, Tavitian A (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8210-8214
7. Zerial M, Stenmark H (1993) *Curr Biol* **5**: 613-620
8. Zerial M (1995) W: Zerial M, Huber LA (red) Guidebook to the Small GTPases. A Sambrook and Tooze publication at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, str. 295-306
9. Hall A, Zerial M (1995) W: Zerial M, Huber LA (red) Guidebook to the Small GTPases. A Sambrook and Tooze publication at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, str. 3-11
10. Macara IG, Lounsbury KM, Richards SA, McKiernan C, BarSagi D (1996) *FASEB J* **10**: 625-630
11. Simons K, Zerial M (1993) *Neuron* **11**: 789-799
12. Jedd G, Richardson C, Litt R, Segev N (1995) *J Cell Biol* **131**: 583-590
13. Goud B, Salminen A, Walworth NC, Novick P (1988) *Cell* **53**: 753-768
14. Söllner T (1995) *FEBS Lett* **369**: 80-83
15. Benett MK (1995) *Curr Op Cell Biol* **7**: 581-586
16. Rothman JE, Warren G (1994) *Curr Biol* **4**: 220-233
17. Pfeffer SR (1996) *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 441-461
18. Novick P, Brennwald P (1993) *Cell* **75**: 597-601
19. Boguski MS, McCormick F (1993) *Nature* **336**: 643-654
20. Feig LA (1994) *Curr Op Cell Biol* **6**: 204-211
21. Moya M, Roberts D, Novick P (1993) *Nature* **361**: 460-463
22. Strom M, Vollmer P, Tan TJ, Gallwitz D (1993) *Nature* **361**: 736-739
23. Sasaki T, Kikuchi A, Araki S, Hata Y, Isomura M, Kuroda S, Takai Y (1990) *J Biol Chem* **265**: 2333-2337
24. Araki S, Kikuchi A, Hata Y, Isomura M, Takai Y (1990) *J Biol Chem* **265**: 13007-13015
25. Ullrich O, Stenmark H, Alexandrov K, Huber LA, Kaibuchi K, Sasaki T, Takai Y, Zerial M (1993) *J Biol Chem* **268**: 18143-18150
26. Magee T, Newman C (1992) *Trends Cell Biol* **2**: 318-323
27. Cox AD, Der CJ (1992) *Curr Op Cell Biol* **4**: 1008-1016
28. Casey PJ, Seabra MC (1996) *J Biol Chem* **271**: 5289-5292
29. Swieżewska E (1995) *Post Biochem* **41**: 51-58
30. Peter M, Chavrier P, Nigg EA, Zerial M (1992) *J Cell Sci* **102**: 857-865
31. Seabra MC, Goldstein JL, Südhof TC, Brown MS (1992) *J Biol Chem* **267**: 14497-14503
32. Seabra MC, Brown MS, Slaughter CA, Sudhof TC, Goldstein JL (1992) *Cell* **70**: 1049-1057
33. Andres DA, Seabra MC, Brown MS, Armstrong SA, Smeland TE, Cremers FPM, Goldstein JL (1993) *Cell* **73**: 1091-1099
34. Alexandrov K, Horiuchi H, Steele-Mortimer O, Seabra MC, Zerial M (1994) *EMBO J* **13**: 5262-5273
35. Wilson AL, Erdman RA, Maltese WA (1996) *J Biol Chem* **271**: 10932-10940
36. Shen F, Seabra MC (1996) *J Biol Chem* **271**: 3692-3698
37. Rybin V, Ullrich O, Rubino M, Alexandrov K, Simon I, Seabra MC, Goody R, Zerial M (1996) *Nature* **383**: 266-269
38. Stenmark H, Vitale G, Ullrich O, Zerial M (1995) *Cell* **83**: 423-432
39. Shirataki H, Kaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi T, Wada K, Miyazaki M, Takai Y (1993) *Moll Cell Biol* **13**: 2061-2068

http://rcin.org.pl

40. Stahl B, Chou JH, Li C, Südhof TC, Jahn R (1996) *EMBO J* **15**: 1799-1809
41. Regazzi R, Kikuchi A, Takai Y, Wollheim CB (1992) *J Biol Chem* **267**: 17512-17519
42. Dirac-Svejstrup AB, Soldati T, Shapiro AD, Pfeffer S (1994) *J Biol Chem* **269**: 15427-15430
43. Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M (1994) *Nature* **368**: 157-160
44. Soldati T, Shapiro AD, Dirac-Svejstrup AB, Pfeffer SR (1994) *Nature* **369**: 76-78
45. Dirac-Svejstrup AB, Sumizawa T, Pfeffer S (1997) *EMBO J* **16**: 465-472
46. Steele-Mortimer O, Gruenberg J, Clague MJ (1993) *FEBS Lett* **329**: 313-318
47. Seabra MC (1996) *J Biol Chem* **271**: 14398-14404
48. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991) *Nature* **349**: 117-127
49. Ossig R, Laufer W, Schmitt HD, Gallwitz D (1995) *EMBO J* **14**: 3645-3653
50. Fodor E, Lee RT, O'Donnell JJ (1991) *Nature* **351**: 614
51. Cremers FPM, van de Pol DJR, van Kerkhoff LPM, Wieringa B, Ropers H-H (1990) *Nature* **347**: 674-677
52. van Bokhoven H, Schwartz M, Andréasson S, van den Hurk JAJM, Bogerd L, Jay M, Rüther K, Jay B, Pawlowitzki IH, Sankila E-M, Wright A, Ropers H-H, Rosenberg T, Cremers FPM (1994) *Hum Mol Gen* **3**: 1047-1051
53. Sankila E-M, Tolvanen R, van der Hurk JAJM, Cremers FM, de la Chapelle A (1992) *Nature Genet* **1**: 109-113
54. Seabra MC, Brown MS, Goldstein JL (1993) *Science* **259**: 377-381
55. Cremers FPM, Armstrong SA, Seabra MC, Brown MS, Goldstein JL (1994) *J Biol Chem* **269**: 2111-2117
56. Seabra MC, Ho YK, Anant JS (1995) *J Biol Chem* **270**: 24420-24427
57. Novic P, Field C, Schekman R (1980) *Cell* **21**: 205-215
58. Benli M, Döring F, Robinson DG, Yang X, Gallwitz D (1996) *EMBO J* **15**: 6460-6475
59. Li B, Warner JR (1996) *J Biol Chem* **271**: 16831-16819
60. Wichmann H, Hengst L, Gallwitz D (1992) *Cell* **71**: 1-20
61. Singer-Krüger B, Stenmark H, Düsterhöft A, Philippsen P, Yoo J-S, Gallwitz D, Zerial M (1994) *J Cell Biol* **125**: 283-298
62. Jiang Y, Rossi G, Ferro-Novick S (1993) *Nature* **366**: 84-86
63. Ragnini A, Teply R, Waldherr M, Voskova A, Schweyen RJ (1994) *Curr Genet* **26**: 308-314
64. Fujimura K, Kazuma T, Nakano A, Toh-e A (1994) *J Biol Chem* **269**: 9205-9212
65. Jiang Y, Ferro-Novick S (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4377-4381
66. Benito-Moreno RM, Miączyńska M, Bauer BE, Schweyen RJ, Ragnini A (1994) *Curr Genet* **27**: 23-25
67. Garrett MD, Zahner JE, Cheney CM, Novick PJ (1994) *EMBO J* **13**: 1718-1728
68. Pfeffer SR, Dirac-Svejstrup AB, Soldati T (1995) *J Biol Chem 270*: 17057-17059
69. van den Hurk JAJM, van de ŚPL TJR, Molloy CM, Brunsmann F, Rüther K, Zrenner E, Pinckers AJLG, Pawlowitzki IH, Bleeker-Wagemakers EM, Wieringa B, Ropers H-H, Cremers FPM (1992) *Am J Hum Genet* **50**: 1195-1202
70. van den Hurk JAJM, Schwartz M, van Bokhoven H, van de Pol TJR, Bogerd L, Pinckers AJLG, Bleeker-Wagemakers EM, Pawlowitzki IH, Rüther K, Ropers H-H and Cremers FPM (1997) *Human Mutation* **9**: 110-117
71. Waldherr M, Ragnini A, Schweyne RJ, Boguski MS (1993) *Nature Genet* **3**: 193-194
72. Schalk I, Zeng K, Wu S-K, Stura EA, Matteson J, Huang M, Tandon A, Wilson IA, Balch WE (1996) *Nature* **381**: 42-48
73. Bauer BE, Lorenzetti S, Miączyńska M, Minh Bui D, Schweyen RJ, Ragnini A (1996) *Mol Biol Cell* **7**: 1521-1533
74. Miączyńska M, Lorenzetti S, Białek U, Benito-Moreno EM, Schweyen RJ, Ragnini A (1997) *J Biol Chem* **272**: 16972-16977
75. Waldherr M, Ragnini A, Jank B, Teply R, Wiesenberger G, Schweyen RJ (1993) *Curr Genet* **24**: 301-306

Do członków
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

http://rcin.org.pl

Oksydacyjne uszkodzenia DNA — wolnorodnikowe modyfikacje zasad i deoksyrybozy

DNA oxidative damages — free radicals modifications of bases and sugar moieties

TOMASZ H. ZASTAWNY

Spis treści:

I. Wstęp
II. Modyfikacje zasad azotowych w wyniku działania wolnych rodników
II-1. Oddziaływanie rodników hydroksylowych z pirymidynami
II-2. Powstawanie cyklicznych pochodnych pirymidyn
II-3. Oddziaływanie rodników hydroksylowych z purynami
II-4. Powstawanie cyklicznych pochodnych puryn
III. Powstawanie wiązań poprzecznych DNA-białko
IV. Oddziaływanie rodników hydroksylowych z resztą cukrową
IV-1. Reakcja rodnika hydroksylowego z deoksyrybozą w warunkach beztlenowych
IV-2. Reakcja rodnika hydroksylowego z deoksyrybozą w warunkach tlenowych
V. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. Reaction of the free radical with DNA bases
II-1. Reaction of the free radical with pyrimidine bases
II-2. Cyclopyrimidines formation
II-3. Reaction of the free radical with purines bases
II-4. Cyclopurines formation
III. DNA-protein cross-links
IV. Reaction of the hydroxyl radical with sugar moiety
IV-1. Reaction of the hydroxyl radical with sugar moiety under anaerobic condition
IV-2. Reaction of the hydroxyl radical with sugar moiety under aerobic condition
V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: 8-OHAde — 8-hydroksyadenina, dA — deoksyadenozyna, dC — deoksycytydyna, dG — deoksyguanozyna, dT — deoksytymidyna, dU — deoksyurydyna, 5, 6-di-OHUra — 5,6-dihydroksyuracyl, DPC — wiązania poprzeczne DNA-białko, e^-_{aq} — uwodniony elektron, FapyAde — 4,6-diamino-5-formamidopirymidyna, FapyGua — 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna, OHGua — 8-hydroksyguanina*, 5-OHMeUra — 5-hydroksymetylouracyl, $O_2^{\cdot -}$ — rodnik ponadtlenkowy, $^{\cdot}OH$-rodnik hydroksylowy.

I. Wstęp

Działanie promieniowania jonizującego, przy odpowiednio wysokich dawkach, prowadzi w konsekwencji do śmierci komórek. Jeśli jednak dawka promieniowania jest subtelna, to skutki wpływu naświetlania objawiają się indukcją procesów mutagenezy oraz karcynogenezy [1-3]. Promieniowanie jonizujące może oddziaływać bezpośrednio z cząsteczką DNA wywołując jonizację zasad — jest to tzw. efekt bezpośredni (ang. *direct effect*). Lub też działając pośrednio (ang. *indirect effect*) poprzez wzbudzenie cząsteczek wody obecnych w komórce [4]. Niniejsze opracowanie koncentruje się na omówieniu skutków efektu pośredniego.

[1] dr, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej AM im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, 85-094 Bydgoszcz, ul. Karłowicza 24.

Pierwszym etapem jonizacji cząsteczki wody jest powstanie e^-_{aq} i $H_2O^{\cdot +}$, które ulegają szybkiemu rozpadowi tworząc rodnik hydroksylowy.

$$H_2O \rightarrow HO^{\cdot +} + e^-_{aq}$$

$$H_2O^{\cdot +} + H_2O \rightarrow H_3O^+ + {}^{\cdot}OH$$

Kolejnym etapem radiolizy wody jest powstanie $H^{\cdot}$ oraz rodnika hydroksylowego:

$$e^-_{aq} \rightarrow H^{\cdot} + OH^-$$

Zakończeniem tego procesu jest powstanie cząsteczki wodoru oraz nadtlenku wodoru:

$$^{\cdot}H + {}^{\cdot}H \rightarrow H_2$$

$$^{\cdot}OH + {}^{\cdot}OH \rightarrow H_2O_2$$

Promieniowanie gamma uzyskane ze źródła ^{60}Co (energia emitowanych fotonów wynosi $2{,}11 \times 10^{-13}$J) oraz strumień elektronów pochodzący z akceleratora (o energii $4{,}8 \times 10^{-13}$J) wywołują zbliżoną liczbę przemian w przeliczeniu na jednostkę energii. Jeśli więc

* Autor ma pełną świadomość kontrowersji panujących wokół nomenklatury głównego produktu reakcji rodnika hydroksylowego z guaniną. Stąd też stosowaną w niniejszej pracy nazwę „8-hydroksyguanina" oraz jej skrót, należy traktować umownie, pamiętając jednak, że wielu autorów produkt ten określa jako 8-oksoguanina, 7-hydro-8-oksoguanina oraz 7,8-dihydro-8-oksoguanina.

http://rcin.org.pl

wartość G (liczba moli produktów powstających w przeliczeniu na 1 J energii radiacyjnej w każdym emitowanym fotonie), zostanie ustabilizowana na tym samym poziomie, wówczas warunki eksperymentalne są porównywalne. Obydwa wymienione źródła promieniowania indukując radiolizę wody wywołują głównie powstawanie rodnika hydroksylowego i e^-_{aq}.

Mechanizm oddziaływania rodnika hydroksylowego z DNA można badać po naświetlaniu roztworu w atmosferze czystego podtlenku azotu oraz mieszaniny podtlenku azotu z tlenem w stosunku 4:1. Obecność czystego N_2O w środowisku radiacji powoduje przekształcenie e^-_{aq}, powstającego równolegle z $OH^{\cdot}$, w rodnik hydroksylowy, co wydatnie zwiększa sumaryczną ilość tego produktu radiolizy:

$$e^-_{aq} + N_2O \rightarrow {}^{\cdot}OH + N_2 + OH^-$$

Obecność cząsteczek tlenu, powoduje zmiatanie zarówno rodnika $H^{\cdot}$, jak i e^-_{aq}, co prowadzi do powstania rodników ponadtlenkowych $HO^{\cdot}_2$:

$$H^{\cdot}/e^-_{aq} + O_2 \rightarrow HO^{\cdot}_2/O^{\cdot -}_2$$

W związku z powyższym, naświetlanie w atmosferze podtlenku azotu stosuje się jako układ modelowy pozwalający na obserwację uszkodzeń DNA powstających w warunkach anaerobowych. Natomiast mieszanina podtlenku azotu z tlenem (w stosunku 4:1), pozwala na modelowanie działania rodnika hydroksylowego na DNA w warunkach aerobowych [4].

W oparciu o liczne dane eksperymentalne stwierdzono, że rodnik hydroksylowy jest główną, aktywną formą tlenu odpowiedzialną za powstawanie większości oksydacyjnych uszkodzeń cząsteczek DNA [5]. Silnie elektrofilowy charakter rodnika hydroksylowego powoduje, że jest to związek wysoce reaktywny. Może w związku z tym wywołać oderwanie atomu wodoru ($k = 10^9 M^{-1}s^{-1}$ w przypadku izopropanolu), szybciej jednak może rozszczepić wiązania podwójne ($k = 10^{10} M^{-1}s^{-1}$) [6]. Natomiast reakcja rodnika hydroksylowego z grupą fosforanową obecną w DNA przebiega znacznie wolniej ($k < 10^7 M^{-1}s^{-1}$) [7]. W związku z powyższym przyjmuje się, że rodnik hydroksylowy indukuje dwa podstawowe typy przemian składowych cząsteczki DNA:

1. reakcję addycji z wiązaniami π zasad azotowych
2. dehydratację cząsteczek deoksyrybozy.

Nagromadzenie w DNA komórkowym produktów tak zapoczątkowanych przemian, prowadzi do efektów biologicznych, takich jak mutageneza i karcynogeneza (Ryc. 1.).

II. Modyfikacje zasad azotowych w wyniku działania wolnych rodników

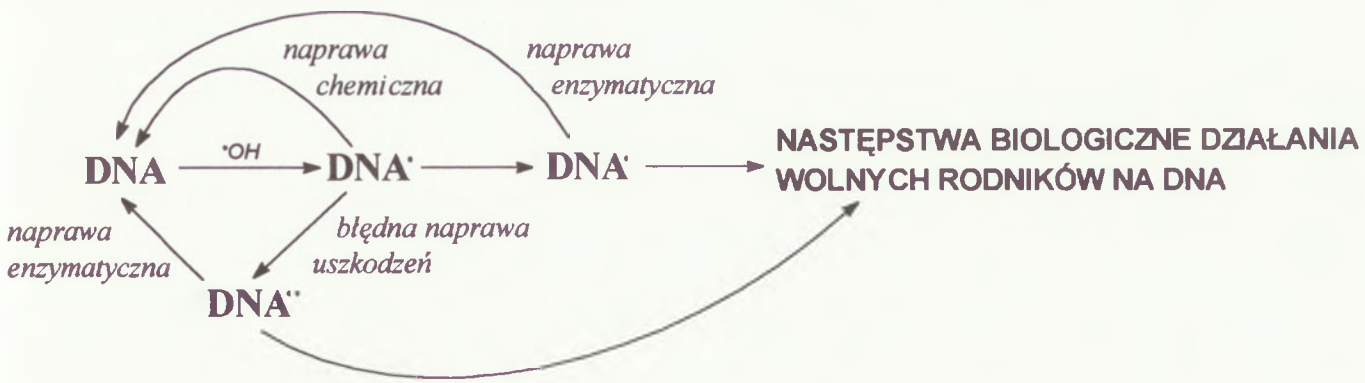
Jak wynika z powyższych rozważań, zdecydowana większość rodników hydroksylowych reaguje z zasadami azotowymi. W przypadku wolnych zasad azotowych proces ten przebiega przy stałej szybkości $k = 4{,}5-9 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ [7], dla nukleotydów wartość stałej szybkości wynosi $4 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ [4, 7]. W przeważającej większości reakcje te mają charakter addycji z wiązaniami π pomiędzy C-5 i C-6 w przypadku pirymidyn oraz C-4 i C-8 w przypadku zasad purynowych. Jeśli reakcja przebiega w warunkach tlenowych, to powstający produkt posiadający niesparowany elektron zlokalizowany na atomie węgla w pierścieniu, może przekształcić się w rodnik ponadtlenkowy. W przypadku niektórych procesów końcowym produktem wolnorodnikowym przemian puryn jest forma wyjściowa związku.

II-1. Oddziaływanie rodników hydroksylowych z pirymidynami

Tymina

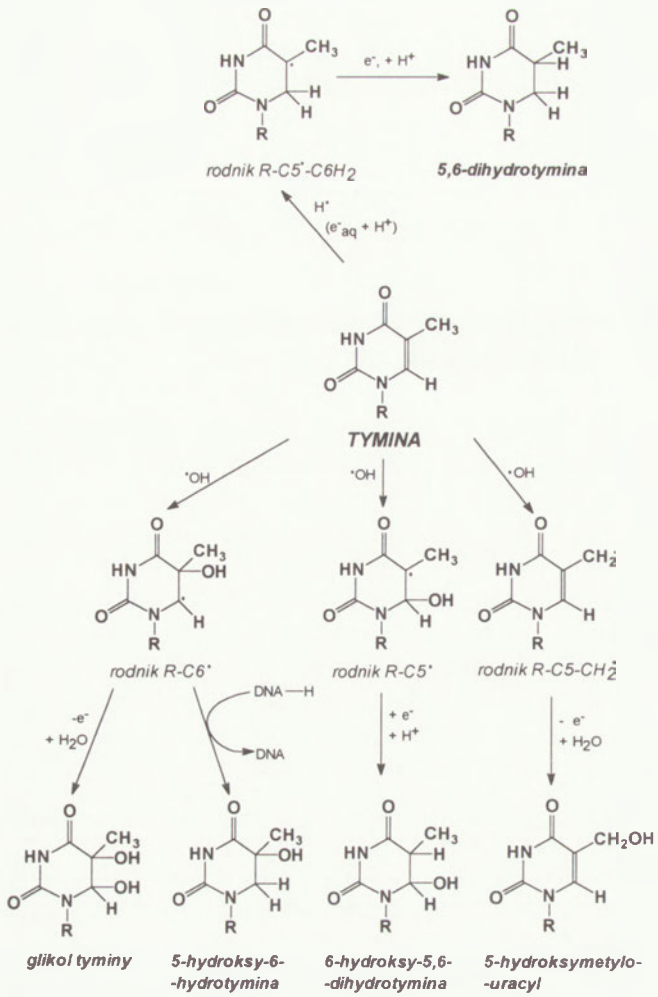
Z czterech zasad azotowych budujących natywną cząsteczkę DNA, przemiany wolnorodnikowe tyminy są najlepiej udokumentowane w literaturze. Pierwszy etap reakcji rodnika hydroksylowego z tyminą może przebiegać dwiema drogami:

1) reakcja addycji z atomami węgla w pierścieniu, tworzącymi wiązanie podwójne C5 = C6,
2) oderwanie atomu wodoru od grupy metylowej związanej z C5.



Ryc. 1. Schemat indukcji biologicznych następstw działania wolnych rodników na DNA.
DNA• — cząsteczka DNA zawierająca uszkodzenie oksydacyjne, DNA•• — błędnie naprawiona cząsteczka DNA. (Przez naprawę chemiczną należy w tym przypadku rozumieć nieenzymatyczne przemiany zasad azotowych, których końcowym produktem jest zasada która była substratem. Dobrym przykładem takiego procesu mogą być przemiany cytozyny przedstawione na Ryc. 4).

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Przemiany wolnorodnikowe tyminy w warunkach beztlenowych.

Produkty tych reakcji, przedstawione na rycinie 2. powstają w następujących stosunkach ilościowych: R-C5' — 60%, R-C6' — 31%, R-C5-$CH_2^{\cdot}$ — 9% [8]. Związki te identyfikowano bezpośrednio *in situ* w DNA [9], oligonukleotydach oligo(dT) [10] oraz wolnych nukleotydach [11], przy zastosowaniu spinowej spektroskopii rezonansu elektronowego (ESR — *electron spin resonance spectroscopy*). Rodniki zasad R-C5' i R-C6' ze względu na swoją wysoką reaktywność i krótki czas półtrwania, wymagają utrwalenia poprzedzającego analizę. Możliwe jest to przy zastosowaniu metody tzw. pułapki spinowej (*spin-trapping*) [11, 12]. Produkt R-C5-$CH_2^{\cdot}$ jest stosunkowo stabilny, stąd też ustalenie jego struktury nie było obarczone tym problemem [11, 12]. Dalsze przemiany tyminy przebiegają odmiennie w zależności od obecności tlenu bądź jego braku w środowisku reakcji.

a) wolnorodnikowe przemiany tyminy w warunkach beztlenowych

W warunkach anaerobowych intermedianty R-C5' i R-C6' mogą ulegać redukcji [8] lub hydratacji (w tym przypadku atom wodoru pochodzi od cząsteczki cukru sąsiadującego nukleotydu [13–15]. I tak, produkt pierwszego etapu przemian R-C' w wyniku utlenienia może przekształcić się w *cis*- lub *trans*-5,6, dihydroksy--5,6-dihydrotyminę (glikol tyminy — Ryc. 3.), lub też hydratacji, która prowadzi do 5-hydroksy — 5,6--dihydrotyminy (Ryc. 3.). Natomiast rodnik R-C5', redukuje się do 6-hydroksy-5,6-dihydrotyminy. Reakcja tyminy z innym produktem radiolizy wody — H', również prowadzi do powstania wysoce reaktywnej formy wolnorodnikowej R-C6', która następnie redukowana jest do 5,6-dihydrotyminy. Elektrony uwalniane podczas radiolizy wody także mogą być wychwytywane przez tyminę, co prowadzi do powstania anionorodnika z ładunkiem zlokalizowanym w pozycji C6, która następnie przekształca się w 5,6-dihydrotyminę [4]. Końcowe produkty opisanych przemian izolowano i identyfikowano po naświetlaniu, zarówno DNA, jak i chromatyny promieniami jonizującymi w warunkach beztlenowych [16-19].

b) przemiany tyminy w warunkach tlenowych

Produkty pierwszego etapu przemian wolnorodnikowych tyminy w obecności tlenu są takie same jak w środowisku anaerobowym: R-C5', R-C6' i R-C5--CH2'. Również ostateczne produkty przemian rodników R-C5' i R-C6' są identyczne — glikol tyminy [20] i 5-hydroksymetylouracyl [17, 21]. Rodniki I etapu R-C5', R-C6 i R-C5-CH2' mogą również ulegać redukcji tworząc niestabilne wodoronadtlenki R-C5--OOH, R-C6-OOH i R-C5-CH-OOH [22, 23]. Procesy te zachodzą w wyniku bezpośredniego przeniesienia elektronu (np. z anionorodnika ponadtlenkowego), względnie rodniki peroksylowe tyminy mogą ulegać hydratacji. *In vivo* donorem wodoru w tych procesach są nośniki grup tiolowych lub podjednostki strukturalne DNA (np. deoksyryboza) [24, 25].

Wodorotlenki powstałe w II etapie aerobowych przemian tyminy ulegają następującym procesom:

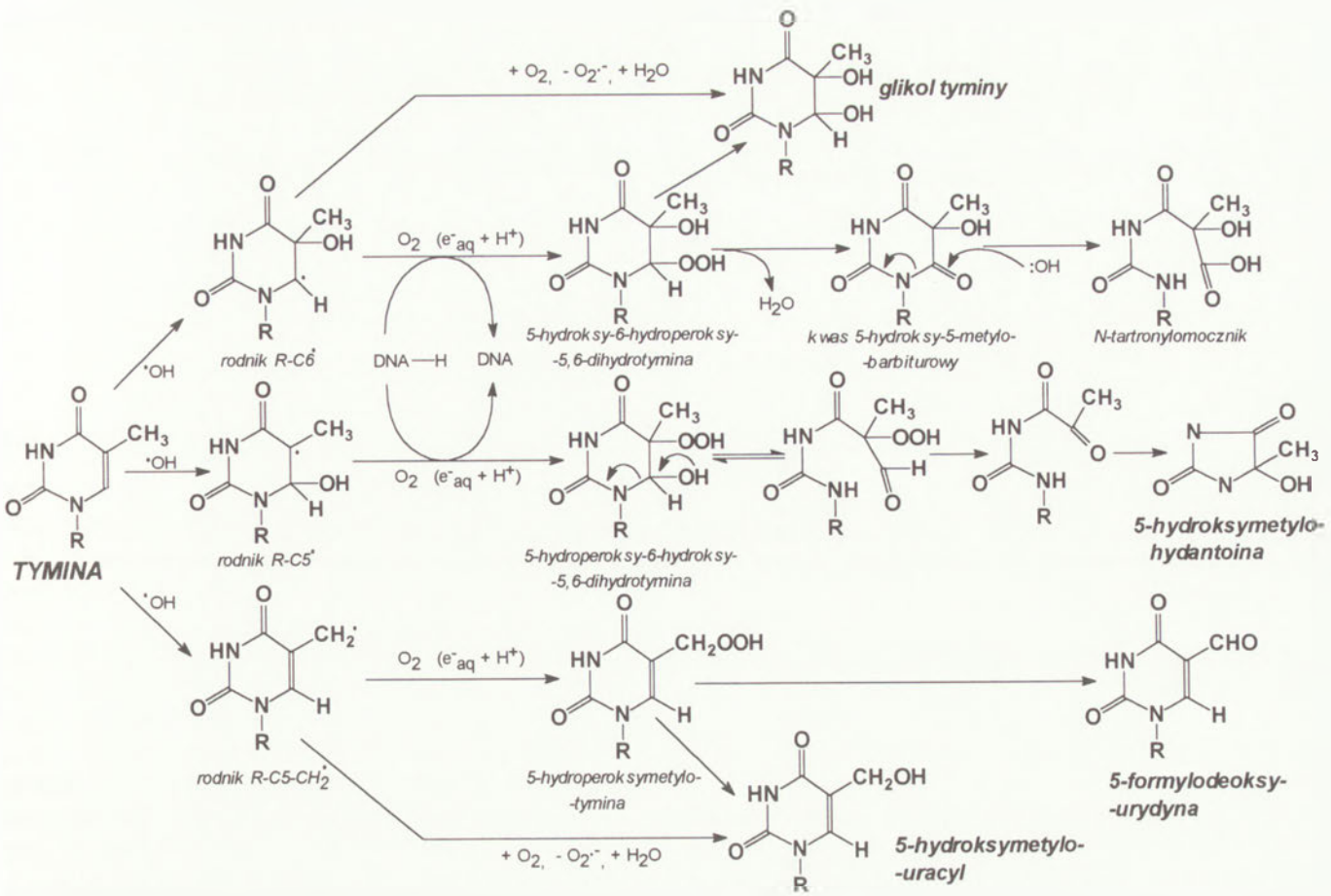
a) rodnik ponadtlenkowy 5-hydroperoksy-6-hydroksy-5,6-dihydrotymidyna przekształca się w kwas 5-hydroksy-5-metylobarbiturowy, a następnie pierścień pirymidynowy ulega rozerwaniu i powstaje N-tartronylomocznik [26, 27].

b) pierścień 5-hydroperoksy-6-hydroksy-5,6-dihydrotymidyna ulega również rozerwaniu, powstaje niestabilna forma łańcuchowa, która szybko cyklizuje tworząc pochodną imidazolową — 5-hydroksy-5-metylohydantoinę. Jest to główny produkt (ok. 75%) przemian wolnorodnikowych tyminy w warunkach tlenowych [20, 27].

c) w warunkach tlenowych niewielkie ilości tyminy tworzą rodnik ponadtlenkowy R-C-CH_2-OOH, który częściowo przekształca się w 5-formylodeoksyurydynę, częściowo natomiast w 5-hydroksymetylodeoksyurydynę [28].

Powstawanie niektórych z wymienionych powyżej końcowych produktów przemian tyminy w warunkach tlenowych wykazano również *in vivo* w DNA komórkowym. Na przykład, obecność glikolu tyminy i tymidyny stwierdzono w komórkach HeLa [21, 29, 30], 5-hydroksymetylouracyl w hodowlach komórek białaczkowych naświetlanych promieniami gamma oraz 5-OHMetUra i pochodne hydantoiny w komór-

http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Przemiany wolnorodnikowe tyminy w warunkach tlenowych

kach wątrobowych myszy również po działaniu promieniowania gamma [31].

Cytozyna

Szlaki wolnorodnikowych przemian cytozyny, dotychczas nie zostały w pełni poznane. Jedną z przyczyn niewielkiego stanu wiedzy o tych procesach jest wysoka niestabilność produktów pierwszych etapów przemian wolnorodnikowych.

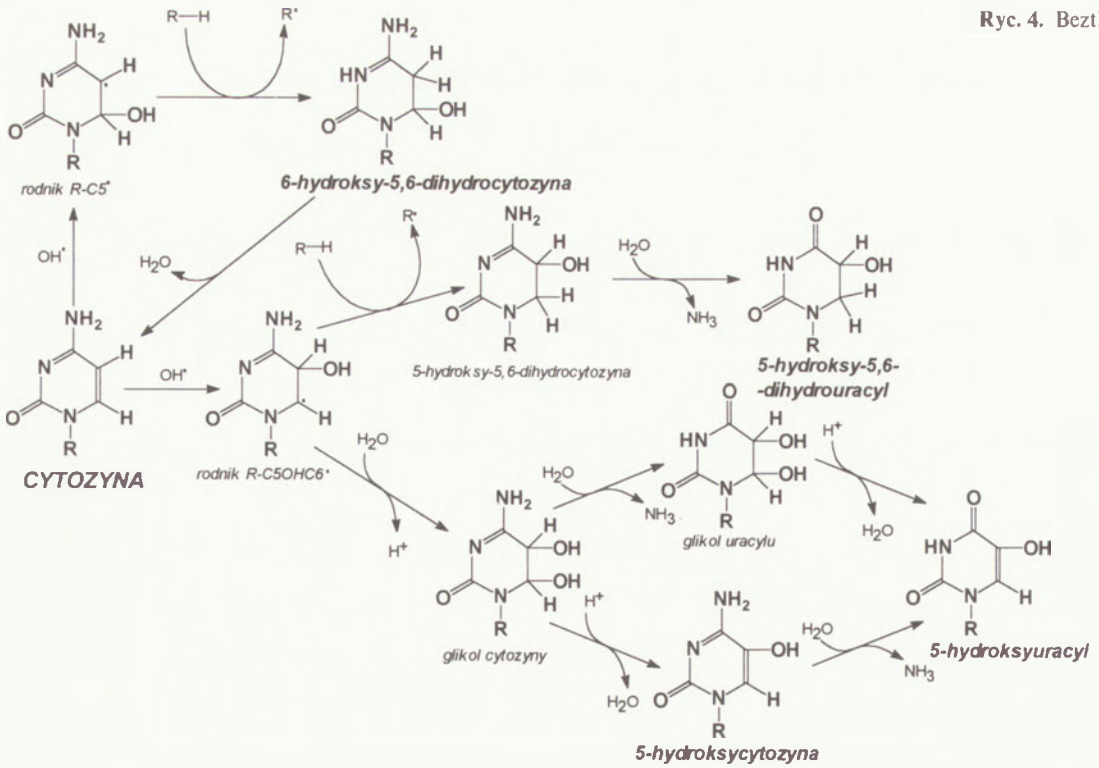
Wiadomo jednak, że w reakcji z cytozyną rodnik hydroksylowy przyłącza się w pozycji C-5 i C-6 tworząc formy R-C5˙-OH i R-C6˙-OH [32, 33]. Dalsze reakcje przebiegają odmiennymi drogami, w zależności od obecności tlenu w środowisku reakcji lub jego braku. Wspólnym, zarówno dla warunków anaerobowych, jak i aerobowych jest jedynie proces prowadzący do powstania 5-hydroksycytozyny i 5-hydroksyuracylu, (Ryc. 4 i 5) [34]. W warunkach beztlenowych, podobnie jak w przypadku tyminy, rodnik R-C6˙-OH ulega redukcji, przekształcając się w 5-hydroksy-5,6-dihydrocytozynę, która po deaminacji daje 5-hydroksy-5,6-dihydrouracyl. Redukcja rodnika R-C5˙-OH prawdopodobnie prowadzi do 6-hydroksy-5,6-dihydrocytozyny. Jednak, jak dotąd, nie udało się potwierdzić tego eksperymentalnie, co być może, jest spowodowane tym, że w środowisku kwaśnym podczas hydrolizy, 6-hydroksy-5-6-dihydrocytozyna ulega dehydratacji do cytozyny [17, 18]. Przypuszczalnie w środowisku wodnym również dochodzi do przekształcenia 5-hydroksy-5,6-dihydrocytozyny do cytozyny. Powstawanie glikolu, uracylu, 5-hydroksycytozyny i 5-hydroksyuracylu stwierdzono zarówno po naświetlaniu wolnych zasad azotowych [35] i DNA *in vitro*, jak i po naświetlaniu komórek [16-18] i zwierząt laboratoryjnych [34].

W obecności tlenu, rodniki R-C5˙-OH i R-C6˙-OH przekształcają się w formy ponadtlenkowe 5-hydroperoksy-6-hydroksy-5,6-dihydrocytozynę i 6-hydroperoksy-6-hydroksy-5,6-dihydrocytozynę (Ryc. 5). Dalszy proces przebiega najprawdopodobniej, analogicznie jak w przypadku przemian tyminy. 5-hydroperoksy-6-hydroksy-5,6-dihydrocytozyna po dehydratacji daje niestabilną dihydroksycytozynę, która ulega deaminacji do 5,6-dihydroksyuracylu. Natomiast przemiany 6-hydroperoksy-6-hydroksy — 5,6-dihydrocytozyny prowadzą do 5-hydroksyhydantoiny [26] (Ryc. 5). Obecność końcowych produktów przemian tlenowych cytozyny stwierdzono także po działaniu promieniowania gamma na wodne roztwory tej zasady [36], jak również po naświetlaniu chromatyny i hodowli komórek eukariotycznych [17, 31].

II-2. Powstawanie cyklicznych pochodnych pirymidyn

W wyniku reakcji rodnika hydroksylowego z pirymidynami mogą powstać również cykliczne pochodne nukleotydów. Struktury takie tworzą się jeśli rodnik rybozy C5˙ połączy się z 6 atomem węgla cytozyny lub

http://rcin.org.pl



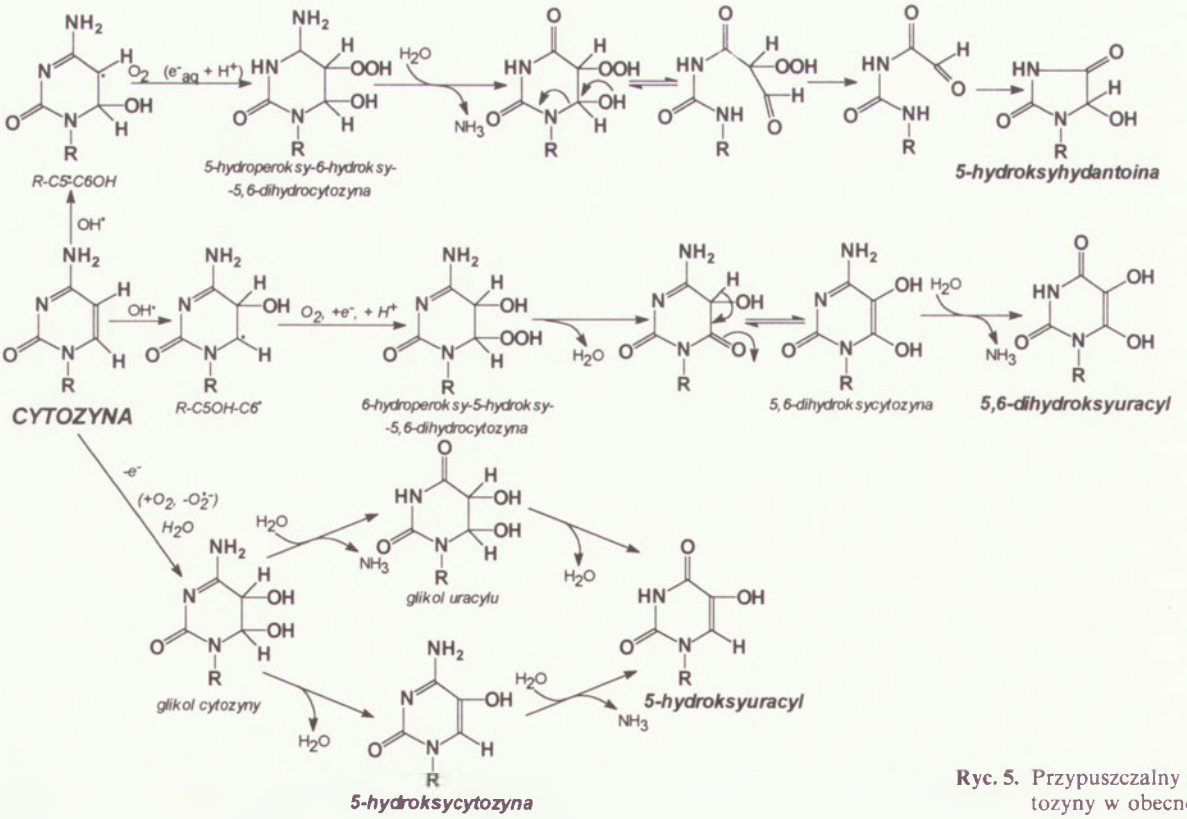
Ryc. 4. Beztlenowe przemiany cytozyny.

tyminy. Powstanie wówczas nietrwały rodnik cykliczny, który po hydratacji przekształca się w stabilny produkt końcowy, w przedstawionym na rycinie 6 przypadku — 5', 6-cyklo-5,6-dihydro-2'-deoksyurydyna [37].

II-3. Oddziaływanie rodników hydroksylowych z purynami

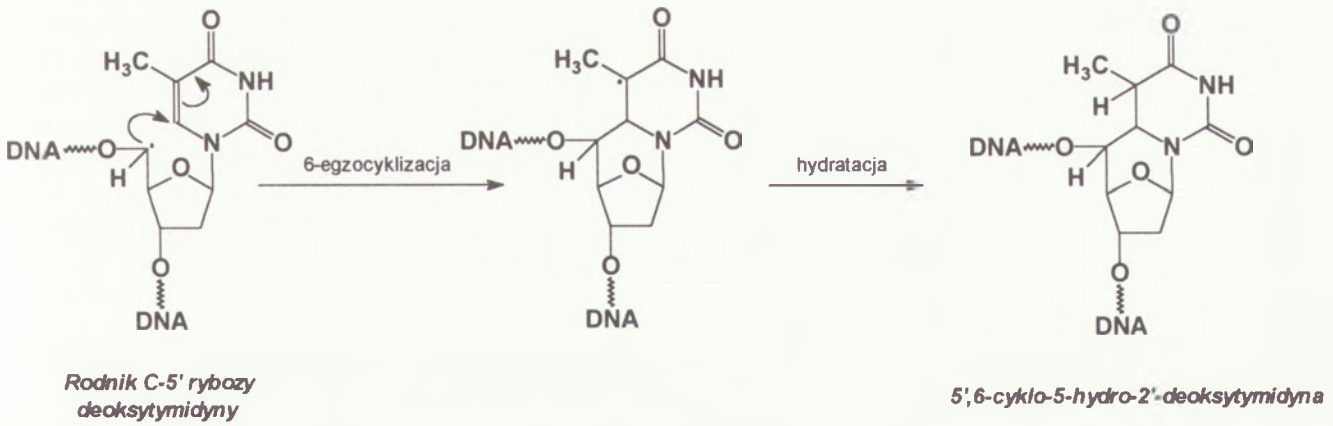
Guanina

Dane literaturowe wskazują, że z czterech zasad azotowych guanina najbardziej efektywnie reaguje z rodnikiem hydroksylowym [4, 38]. Pierwotnymi produktami reakcji rodnika hydroksylowego są trzy rodniki; G-C4OH•, G-C5OH• i G-C8OH• (Ryc. 7), z których najistotniejszym zdaje się być występujący w dwóch formach rezonansowych G-C8OH• (Ryc. 7.). Może on ulegać zarówno redukcji, jak i utlenieniu [8]. W pierwszym przypadku reakcja prowadzi do otwarcia pierścienia imidazolowego puryny, w wyniku czego powstaje FapyGua [8]. Była to jedna z pierwszych oksydowanych zasad azotowych zidentyfikowana



Ryc. 5. Przypuszczalny szlak przemian cytozyny w obecności tlenu.

http://rcin.org.pl



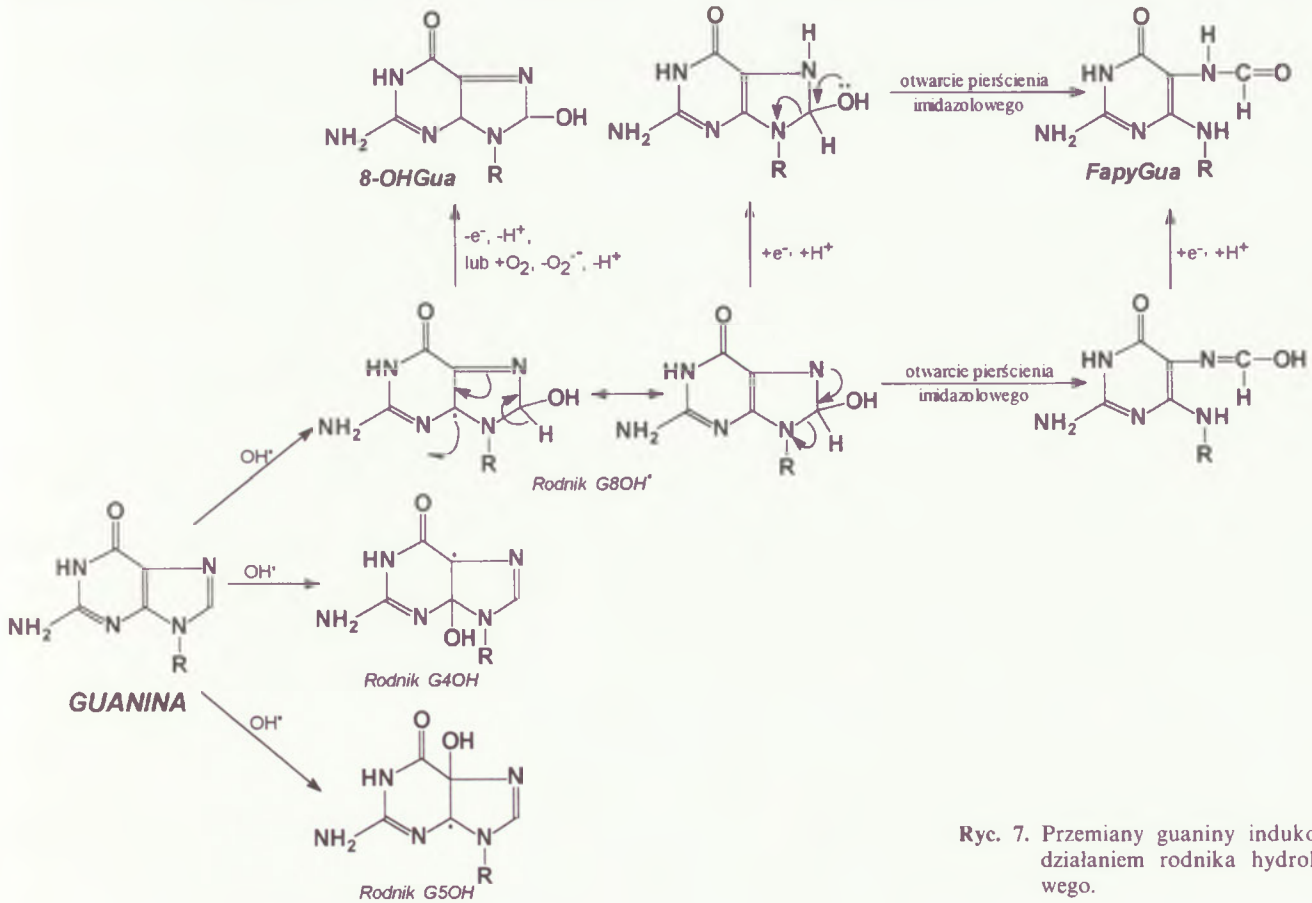
Ryc. 6. Przykładowa reakcja powstawania cyklicznych pochodnych pirymidyn.

w DNA po działaniu promieniowania gamma w warunkach tlenowych, opisana przez Herasa w 1960 r [39]. Utlenienie rodnika G-C8OH$^{\cdot}$ prowadzi do powstania, chyba najczęściej oznaczanej w laboratoriach pochodnej, jaką jest 8-hydroksyguanina. Nazewnictwo tej pochodnej nie zostało jak dotąd jednoznacznie ustalone, a zażarte spory dotyczące tej kwestii, toczą się często przy okazji konferencji naukowych poświęconych wolnorodnikowym produktom oksydacji DNA. W literaturze spotyka się również następujące nazwy tego produktu: 7,8-dihydro-8-oksoguanina, 7-hydro-8-oksoguanina oraz 8-okso-guanina.

Powstawanie końcowych produktów oksydacji guaniny — FapyGua i 8-OHGua stwierdzono zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, po działaniu promieniowania gamma na DNA [18, 40, 41], chromatynę [17], komórki hodowli tkankowych [31, 42] oraz zwierzęta laboratoryjne [35, 42].

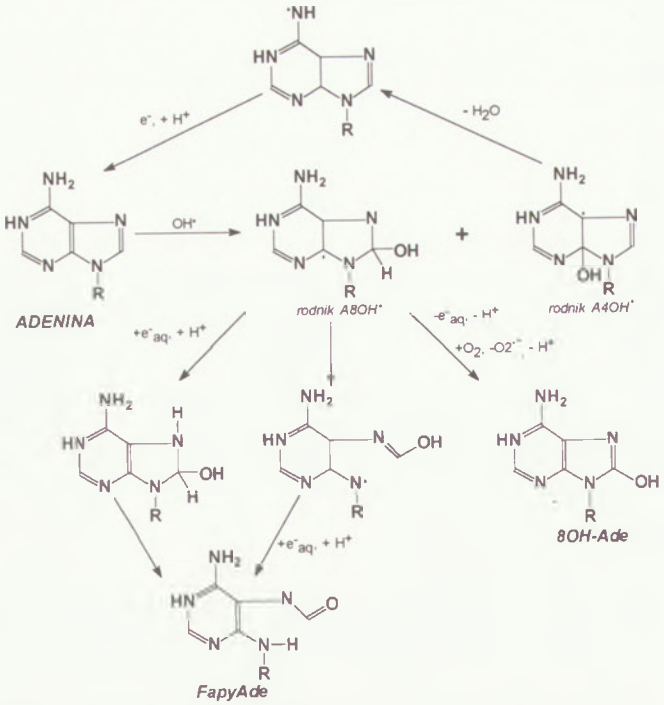
Adenina

Przemiany wolnorodnikowe adeniny w znacznym stopniu przebiegają podobnie, jak w przypadku guaniny. Pierwotnym produktem ataku rodnika hydroksylowego są dwa rodniki adeniny A8OH$^{\cdot}$ i A4OH$^{\cdot}$ [43]. Podobnie jak w przypadku rodnika G8OH$^{\cdot}$, występuje tu ambiwalencja oksydo-redukcyjna rodnika A-C8OH$^{\cdot}$, który może ulegać zarówno utlenieniu co prowadzi do 8-hydroksyadeniny, jak i redukcji, czego produktem jest ostatecznie FapyAde (Ryc. 8). W warunkach tlenowych 8-OHAde jest preferowanym produktem tego procesu [44]. Podobnie jak w przypadku guaniny, powstawanie końcowych produktów przemian adeniny obserwowano po naświetlaniu DNA, chromatyny, komórek eukariotycznych i zwierząt laboratoryjnych [17, 18, 31, 35, 40-42].



Ryc. 7. Przemiany guaniny indukowane działaniem rodnika hydroksylowego.

http://rcin.org.pl



Ryc. 8. Przemiany adeniny indukowane działaniem rodnika hydroksylowego.

II-4. Powstawanie cyklicznych pochodnych puryn

Lokalizacja rodnika na węglu C-5' deoksyrybozy może prowadzić do powstania cyklicznych pochodnych puryn. Końcowy produkt powstaje poprzez niestabilny cykliczny rodnik nukleozydu (Ryc. 9.). Powstawanie cyklicznych pochodnych puryn wykazano po naświetleniu nukleozydów i DNA promieniami gamma [45].

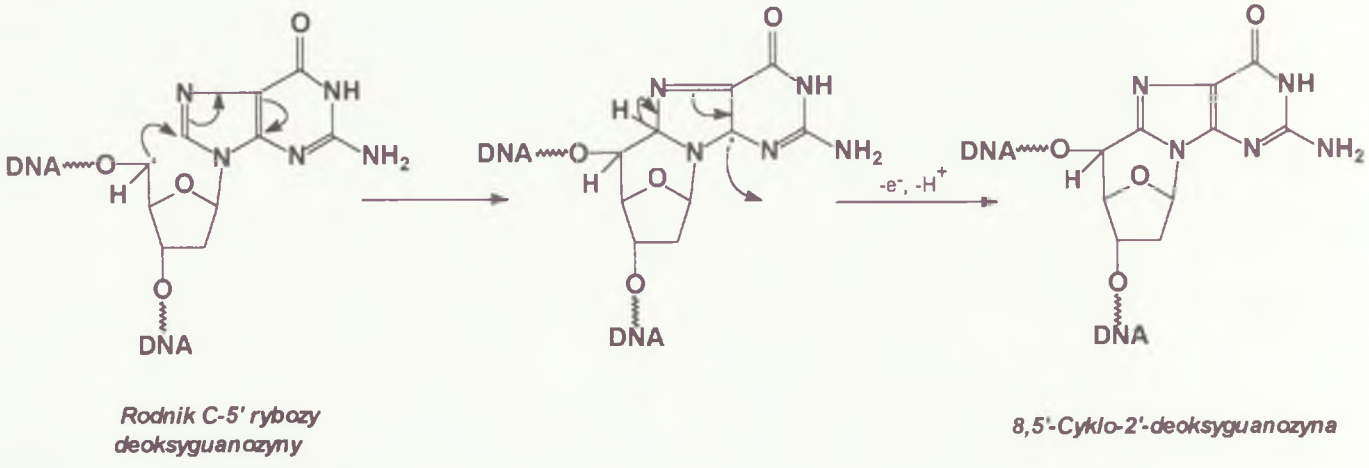
Istnienie większości oksydowanych pochodnych zasad azotowych, oraz nietrwałe intermedianty poprzedzające ich powstanie, potwierdzono eksperymentalnie. O pozostałych (np. 6-hydroksy-5,6-dihydrotymina, glikol cytozyny, 5,6-dihydrocytozyna) można przypuszczać na podstawie hipotetycznych szlaków przemian. Szlaki przemian oksydacyjnych zasad azotowych, rodzaje powstałych produktów końcowych oraz ich wzajemne stosunki uzależnione są ściśle od rodzaju czynnika oksydującego i warunków reakcji. W związku z tym badania prowadzone obecnie zmierzają w kierunku opracowania porównywalnych nieinwazyjnych metod analitycznych pozwalających na jednoczesne wykrywanie dużej ilości produktów. Również, jak dotąd, nierozwiązaną pozostają kwestie fizjologicznego poziomu zmodyfikowanych zasad w DNA jąder, mitochondriów i plastydów oraz prawdopodobieństwo zawyżania wyników analiz na skutek artefaktów powstających podczas preparatyki DNA.

III. Powstawanie wiązań poprzecznych DNA-białko

Generowanie wolnych rodników w bezpośrednim sąsiedztwie chromatyny może poza oksydacją zasad azotowych, prowadzić do adduktów powstających, zarówno przy udziale DNA, jak i białek jądrowych — wiązań poprzecznych DNA-białko [46]. Dane eksperymentalne również w tym przypadku wykazują, że rodnik hydroksylowy, jest głównym czynnikiem indukującym powstawanie tych uszkodzeń [46-49]. Wiązania poprzeczne DNA-białko tworzą się jako produkty reakcji następujących substratów:

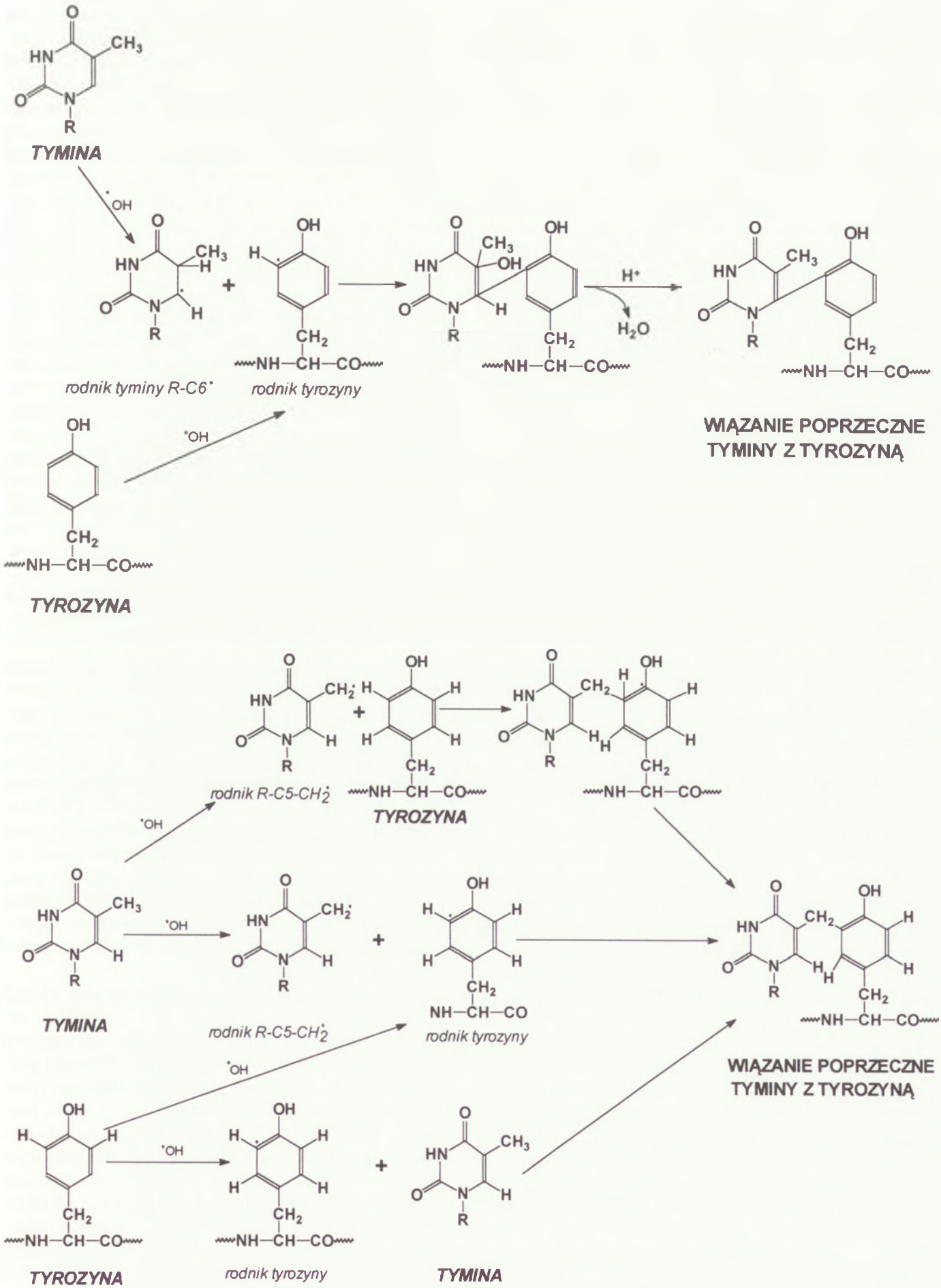
1. dwóch rodników zlokalizowanych w cząsteczce DNA i białka,
2. wolnorodnikowej pochodnej zasady azotowej z niezmodyfikowanym aminokwasem,
3. rodnika aminokwasowego z natywną zasadą azotową.

Powstania wiązań poprzecznych DNA-białko można oczekiwać w wyniku działania promieniowania jonizującego, UV, oraz szeregu innych czynników o działaniu kancerogennym. Tworzenie się takich adduktów obserwowano, zarówno podczas eksperymentów prowadzonych *in vivo* na hodowlach komórek eukariotycznych [50-53], jak i *in vitro*, po działaniu rodników hydroksylowych na chromatynę [47, 54-57]. Prace prowadzone przy zastosowaniu spektrometrii masowej oraz spektrometrii ^{13}C-NMR, pozwoliły na ustalenie struktury chemicznej niektórych adduktów DNA-białko, powstających w wyniku działania rodnika hydroksylowego [47, 54-57]. W oparciu o uzyskane wyniki zaproponowano molekularny mechanizm two-



Ryc. 9. Przykładowa reakcja powstawania cyklicznych pochodnych puryn.

http://rcin.org.pl



Ryc. 10. Powstawanie wiązania poprzecznego DNA-białko w wyniku interakcji tyminy z tyrozyną
a) mechanizm powstawania wiązania poprzecznego Thy-Tyr bezpośrednio pomiędzy pierścieniami obu związków,
b) powstawania wiązania poprzecznego Thy-Tyr w wyniku dehydratacji grupy metylowej tyminy.

http://rcin.org.pl

rzenia się tych uszkodzeń (Ryc. 10) [56, 58]. W pierwszym etapie badań eksperymenty prowadzono na układach modelowych, w których mieszaniny różnych aminokwasów i zasad azotowych naświetlano promieniami gamma, a następnie powstałe addukty badano metodą GC/MS. Wykazano w ten sposób, które z aminokwasów i zasad azotowych są szczególnie predysponowane do tworzenia adduktu typu zasada azotowa-AA. Kolejnym etapem były badania prowadzone na chromatynie naświetlanej promieniami gamma generującymi powstawanie rodnika hydroksylowego. Stwierdzono, że głównym adduktem odpowiedzialnym za powstawanie wiązań poprzecznych DNA-białko jest kowalencyjne połączenie tyminy z tyrozyną (Ryc. 10). [54]. Ponadto wykazano możliwość występowania wiązań poprzecznych DNA-białko pomiędzy zasadami; tyminą oraz cytozyną a aminokwasami Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Thr, Lys, Tyr [17, 54, 56, 57].

Po inkubacji komórek K562 z H_2O_2 lub naświetlaniu ich promieniami gamma, izolowano kowalencyjne addukty tyrozyny z tyminą, reprezentujące wiązanie DNA-białko [52]. Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej typowego zmiatacza wolnych rodników DMSO lub związku chelatującego *o*-fenatroliny zdecydowanie obniżało poziom wiązań poprzecznych. Preinkubacja komórek z silnym inhibitorem katalazy komórkowej — cyjankiem potasu wywoływała efekt przeciwny [52].

Badania nad mechanizmem powstawania wiązań poprzecznych DNA-białko wykazały, że poziom DPC jest wyższy po naświetlaniu komórek w warunkach beztlenowych [59]. Późniejsze badania pozwoliły na ustalenie, że w środowisku tlenowym powstaje przede wszystkim addukt Thy-Tyr [47], natomiast w środowisku N_2O wiązania DNA-białko reprezentowane są przez addukty Thy-Tyr, Thy-Lys i Cyt-Tyr [47]. Sugeruje to, że rodniki powstające w cząsteczce DNA regulują szybciej z tlenem niż ze zjonizowanymi białkami. Interesujące byłoby wyjaśnienie czy istnieją różnice strukturalne pomiędzy adduktami powstającymi w warunkach tlenowych i beztlenowych. Jest bardzo prawdopodobnie, że modyfikacje chromatyny w komórkach beztlenowych mogą prowadzić do obecności specyficznych sekwencji DNA wysoce podatnych na powstawanie w ich obrębie wiązań poprzecznych DNA-białko. Takie zjawisko obserwowano po napromieniowaniu komórek w warunkach różnej siły jonowej [60]. Naświetlając komórki V79 w roztworze hipertonicznym stwierdzono zjawisko kondensacji chromatyny, przy czym poziom DPC był niższy niż w roztworze izotonicznym. W środowisku hipotonicznym, które pozwala na relaksację skondensowanej chromatyny poziom DPC był zdecydowanie wyższy, ponadto obserwowano również więcej wiązań poprzecznych w odcinkach DNA aktywnych transkrypcyjnie [60].

Powstawanie wiązań poprzecznych DNA-białko wykazano również w komórkach eksponowanych na działanie metali ciężkich [53]. Stwierdzono, że jony Fe(II) indukują powstawanie wiązań poprzecznych pomiędzy tyminą i tyrozyną w chromatynie komórek kultur tkankowych. Przypuszczalnie w komórkach traktowanych Fe(II) dochodzi do powstania rodnika ponadtlenkowego, który następnie ulega dysmutacji do H_2O_2. Nadtlenek wodoru natomiast może przenikać przez błony otoczki jądrowej i w reakcji z metalami związanymi z chromatyną tworzyć wysoce reaktywny rodnik hydroksylowy [61]. Nie zaobserwowano podobnego zjawiska w przypadku jonów Cu(II), co przypuszczalnie wynikało z wysokiego stanu walencyjnego miedzi, który zapobiega redukcji cząsteczki tlenu koniecznej do generowania $O_2^{\cdot-}$. Ewentualnie za zjawisko to mogły być odpowiedzialne białka komórkowe specyficznie wiążące miedź [53].

Jak dotąd niewiele jest danych literaturowych dotyczących biologicznej roli wiązań poprzecznych powstających jako produkt reakcji wolnorodnikowych. Brak jest również doniesień stwierdzających ich naprawę w komórkach. Przypuszcza się jednak, że mogą one zarówno zaburzać strukturę chromatyny, jak i efektywność procesów związanych z ekspresją genów.

IV. Oddziaływanie rodników hydroksylowych z resztą cukrową

Reakcja rodników hydroksylowych z pierścieniem deoksyrybozy może prowadzić do powstania w DNA pojedynczych i podwójnych pęknięć. Pojedyncze pęknięcia (SSB — *single strand breaks*) z reguły nie są letalne dla komórki [62-64], jeśli jednak nie zostaną naprawione przez odpowiednie mechanizmy, mogą prowadzić do zmian struktury cząsteczki DNA. Natomiast nagromadzenie w DNA podwójnych pęknięć (DSB — *double strand breaks*) może prowadzić do śmierci komórki. Powstają one, jeśli pęknięcia pojedynczej nici zlokalizowane są naprzeciwlegle w bliskiej odległości [4, 65]. Ten typ uszkodzeń DNA obserwowany jest szczególnie w przypadku działania wysokich dawek radiacji.

Dane eksperymentalne dowodzą, że reakcja addycji zasad azotowych z rodnikiem hydroksylowym zachodzi z wyższą częstością niż proces dehydratacji rybozy, będący pierwszym etapem powstawania pęknięć DNA. W badaniach nad uszkodzeniami rybonukleotydów poliU, stwierdzono, że jedynie 7% rodników hydroksylowych reaguje z rybozą, reszta natomiast modyfikuje zasady azotowe [66]. Interesującym jest, że rodnik hydroksylowy reaguje zdecydowanie szybciej z resztami cukrowymi dwuniciowych struktur DNA lub RNA, niż w przypadku struktur jednoniciowych. Zjawisku renaturacji DNA towarzyszy jednoczesny wzrost ilości rodników hydroksylowych reagujących z resztą cukrową do około 20% [67]. Za zmiany te odpowiedzialny jest efekt sferyczny struktury dwuniciowej, w której reszty cukrowe zlokalizo-

http://rcin.org.pl

wane są na zewnątrz helisy, zasady natomiast skierowane są do wnętrza [7, 67]. Rodnik hydroksylowy może indukować oderwanie każdego atomu wodoru związanego z cząsteczką deoksyrybozy. Prowadzi to do powstania rodnika wodorowęglanowego, co stanowi pierwszy etap rozszczepiania łańcucha polinukleotydowego. Tego typu formy rodnikowe deoksyrybozy identyfikowano po działaniu promieniowania gamma zarówno na mono- jak i oligonukleotydy [10, 33, 68]. Przypuszcza się, że wolnorodnikowa dehydratacja deoksyrybozy w pozycji C4, po działaniu promieniowania gamma na DNA jest procesem faworyzowanym w stosunku do pozostałych możliwości. Wynika to stąd, że w natywnej cząsteczce DNA pozostającej w konformacji β, węgiel C4 deoksyrybozy jest fragmentem najsilniej wyeksponowanym na zewnątrz helisy [69]. W związku z tym zdecydowana większość ostatecznych produktów wolnorodnikowych przemian deoksyrybozy powstaje w wyniku przemian tej formy przejściowej [4, 70-73].

IV-1. Reakcja rodnika hydroksylowego z deoksyrybozą w warunkach beztlenowych

W środowisku wodnym w warunkach beztlenowych przemiany rodnikowe deoksyrybozy mogą prowadzić do uwolnienia reszty ortofosforanowej (Ryc. 11). Wartości stałych szybkości tych reakcji wskazują na to, że forma wolnorodnikowa deoksyrybozy C4$^{\cdot}$ prowadzi przede wszystkim do uwolnienia reszty ortofosforanowej połączonej z C-3' ($k \approx 10^6 s^{-1}$, dla C-5' wartość ta wynosi $k \approx 10^3 s^{-1}$) [74].

Poza oderwaniem reszty ortofosforanowej możliwe są również drogi przemian prowadzące do powstania w cząsteczce miejsc wrażliwych na alkalia. Na szczególną uwagę zasługuje tu oderwanie atomu wodoru z pozycji C-1'. Zapoczątkowane w ten sposób przemiany prowadzą do oderwania wolnej zasady azotowej i powstania laktonu (Ryc. 12).

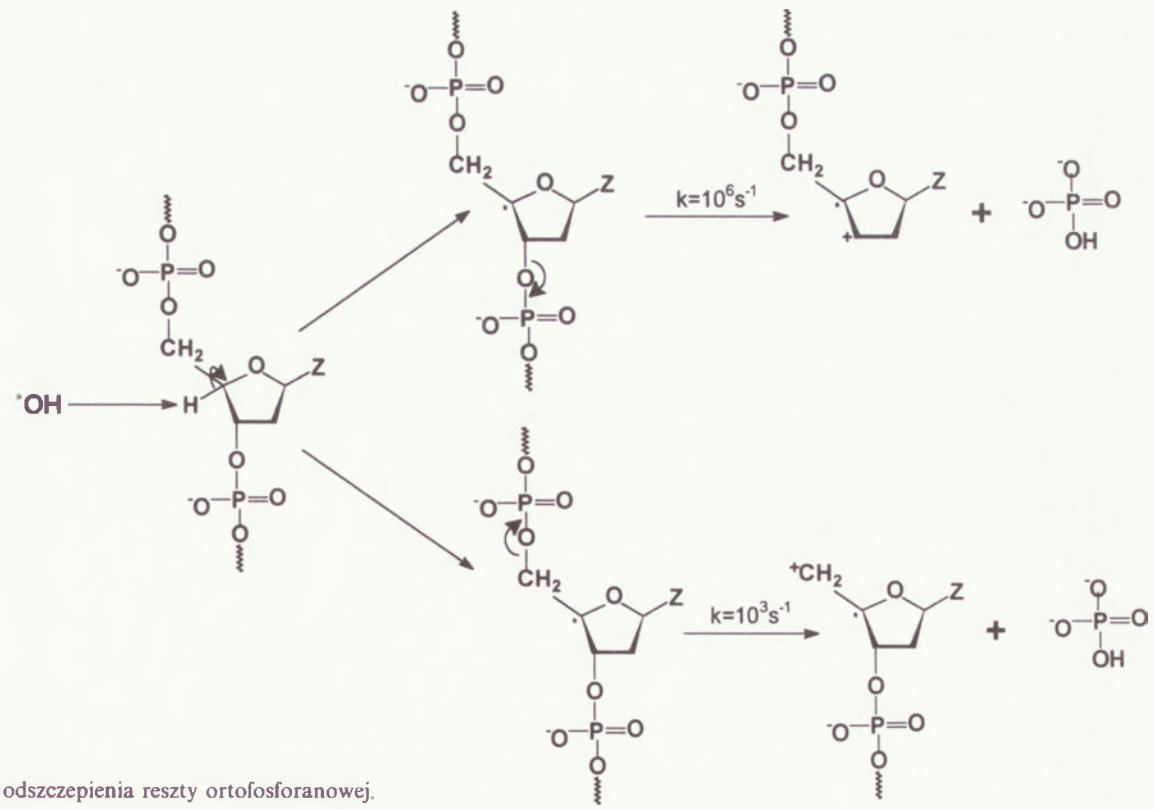
IV-2. Reakcja rodnika hydroksylowego z deoksyrybozą w warunkach tlenowych

Zdecydowana większość rodników zlokalizowanych na atomie węgla w obecności tlenu przekształca się w odpowiadający im rodnik ponadtlenkowy (RO$^{\cdot}$) [4]. Ich czas półtrwania przy stężeniu tlenu 0,2 mM (w mieszaninie N_2O/O_2) wynosi ok. 2,5 μs. W związku z tym po oderwaniu atomu wodoru w pierwszym etapie przemian tlenowych, następuje tworzenie się rodnika ponadtlenkowego cukru. Związki te charakteryzują się stosunkowo długim czasem półtrwania wynoszącym od 0,3 do 1,6 s [75]. Dążą one do przyłączenia wodoru tworząc w ten sposób wodorotlenki. Donorami wodoru w tym procesie mogą być zarówno związki tiolowe znajdujące się w jądrze, białka oraz sąsiadujące cząsteczki reszt deoksyrybozy [75].

Możliwa jest również inna droga przemian rodników peroksylowych deoksyrybozy. Mogą one ulegać dimeryzacji tworząc czterotlenki, które ulegają dekompozycji:

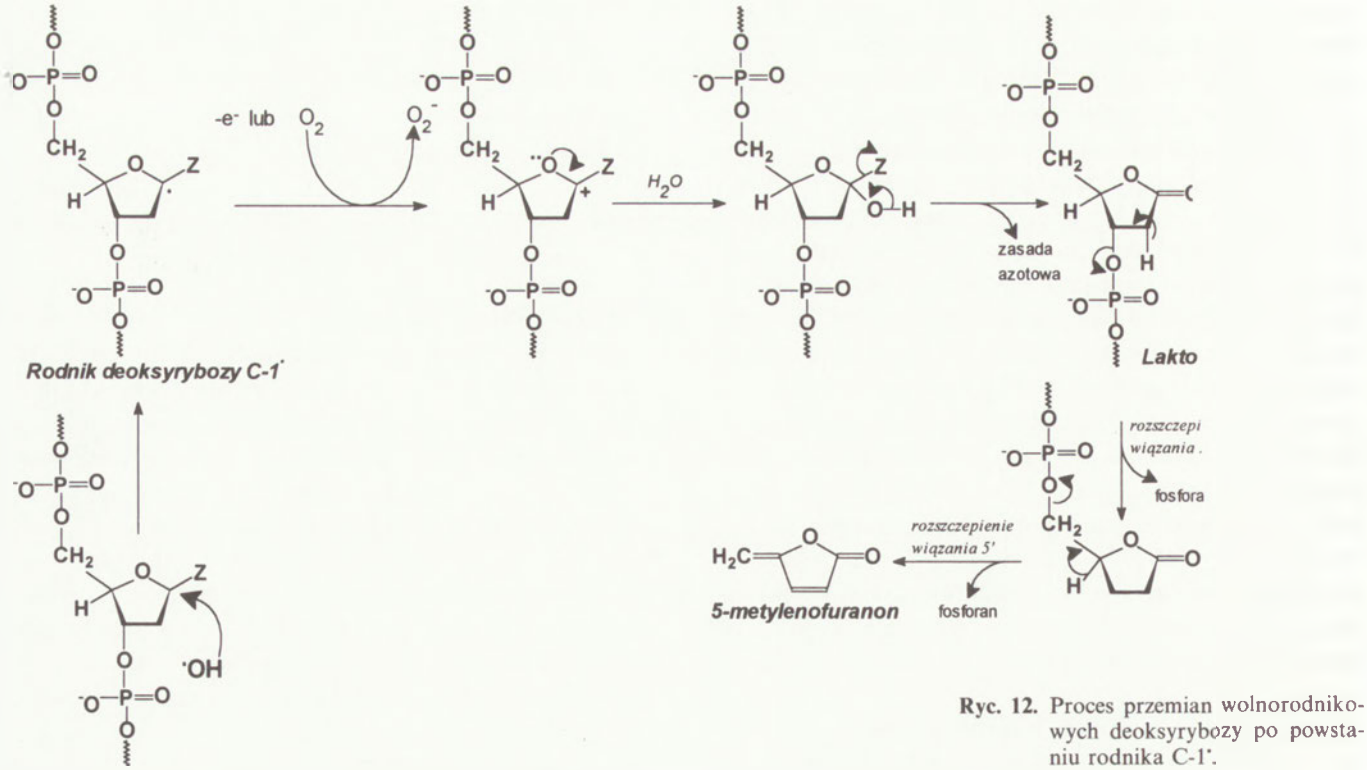
a) homolitycznej tworząc cząsteczkę tlenu i dwa rodniki alksylowe [76],
b) heterolitycznej, zgodnie z mechanizmem zaproponowanym przez R u s e l l a, dając tlen, alkohol i keton [76].

W przemianach wolnorodnikowych deoksyrybozy istotne jest również to, że nie wszystkie uszkodzenia



Ryc. 11. Mechanizm odszczepienia reszty ortofosforanowej.

http://rcin.org.pl



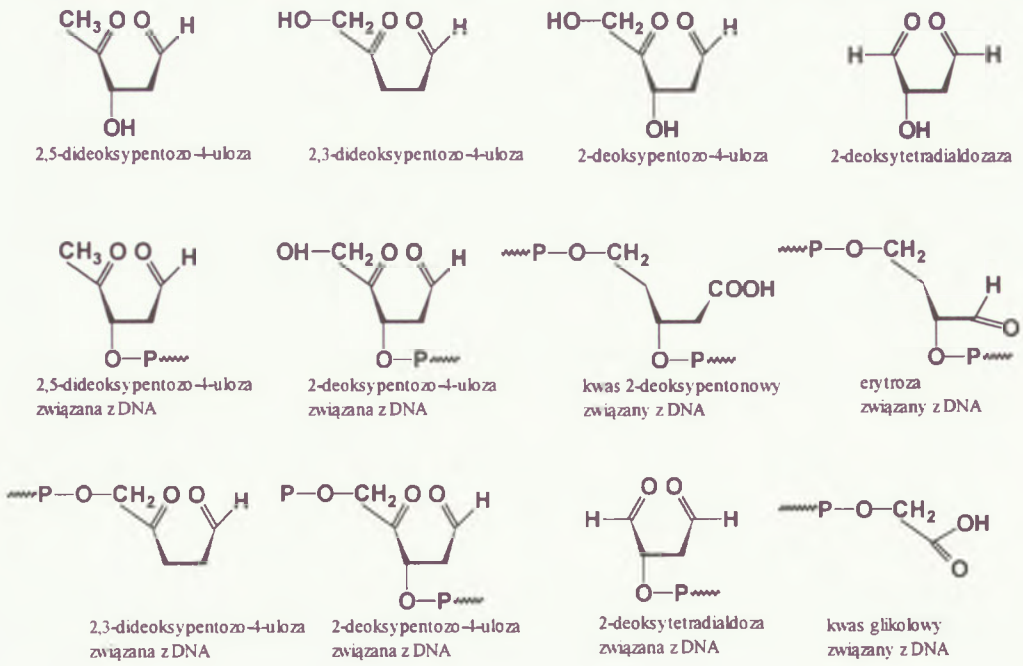
Ryc. 12. Proces przemian wolnorodnikowych deoksyrybozy po powstaniu rodnika C-1'.

pierścienia cukrowego są wynikiem bezpośredniej reakcji rodnika hydroksylowego z cząsteczką. Część uszkodzeń powstaje na skutek oderwania atomu wodoru od cząsteczki cukru przez rodnik zasady azotowej (Ryc. 13.).

Badania nad pęknięciami DNA po wolnorodnikowej modyfikacji pierścienia deoksyrybozy, zmierzają do poznania mechanizmów ich powstawania przy udziale wielu czynników egzogennych, w tym również środków farmakologicznych, których działanie związane jest z indukcją wolnych rodników [76-79].

V. Uwagi końcowe

Oksydacja cząsteczek DNA komórkowego następuje zarówno pod wpływem czynników egzo-, jak i endogennych. Prawidłowość funkcjonowania genomu w zasadniczym stopniu uzależniona jest od efektywności mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie ilości uszkodzeń DNA na stałym, niskim poziomie. Do nich należą enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy eliminacji reaktywnych form tlenu z komórki oraz enzymy naprawiające powstające uszkodzenia DNA. Mimo to, w warunkach szoku tlenowego dochodzi do znacznego wzrostu ilości uszkodzeń oksydacyjnych. Stosunkowo niedawnego opracowano metodologię pozwalającą na identyfikację i analizę uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Pozwoliło to w następnych latach na opublikowanie wielu prac dotyczących wpływu licznych czynników egzodennych na stopień oksydacji



Ryc. 13. Główne produkty końcowe przemian wolnorodnikowych deoksyrybozy.

http://rcin.org.pl

DNA. Również intensywnie badane są procesy naprawy tych uszkodzeń. Ciągle jednak nie są do końca poznane szlaki przemian wolnorodnikowych elementów budujących cząsteczkę DNA. Wynika to przede wszystkim z ciągłej niedoskonałości metod, które nie pozwalają na identyfikację i oznaczenie intermediantów przemian, których czas półtrwania jest niezwykle krótki. Nawet końcowe produkty tych przemian często są na tyle niestabilne, że ich obecność można stwierdzić jedynie w oparciu o wyniku obliczeń kwantowo-mechanicznych. Również nadal brak jest wystarczających danych eksperymentalnych pozwalających na jednoznaczne określenie związków pomiędzy oksydacją DNA a rozwojem stanów patologicznych organizmów wyższych, takich jak mutageneza, karcynogeneza, czy też procesy starzenia.

Podziękowanie
Praca finansowana w ramach grantu 4.PO5A.003.12

Artykuł otrzymano 12 czerwca 1997 r.
Zaakceptowano do druku 4 września 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Halliwel B, Gutteridge JMC (1989) Free radicals in biology and medicine, Oxford: Second Edition, Clarendon Press
2. Breimer LH (1990) *Mol. Carcinogenesis* **3**: 197
3. Cross C (1987) *Ann. Intern. Med* **107**: 526-545
4. von Sonntag, C (1987) The chemical basis of radiation biology, New York.: Taylor & Francis
5. Michaels HB, Hunt JW (1973) *Radiat. Res.* **53**: 57-70
6. Pryor WA (1988) *Free Rad. Biol. Med.* **4**: 219-223
7. Masuda T, Shinohara H, Eda M, Kondo M (1980) *J. Radiat. Res.* **21**: 173-179
8. Fujita S, Steenken S (1981) *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 2540-2545
9. Kuwabara M, Inanami O, Endoh D, Sato F (1987) *Biochemistry* **26**: 2458-2465
10. Kuwabara M, Ohshima H, Sato F, Ono A, Matsuda A (1993) *Biochemistry* **32**: 10599-10606
11. Hinton RD, Janzen EG (1992) *J. Org. Chem.* **57**: 2646--2651
12. Arya P, Stephens JC, Griller D, Pou S, Ramos CL, Pou WS, Rosen GM (1992) *J. Org. Chem.* **53**: 2297-2301
13. Deeble DJ, Schultz D, von Sonntag C (1986) *Int. J. Radiat. Biol.* **49**: 915-926
14. Karam LR, Dizdargolu M, Simic MG (1984) *Int. J. Radiat. Biol.* **46**: 715-724
15. Deeble DJ, von Sonntag C (1984) *Int. J Radiat. Biol.* **46**: 247-260
16. Dizdaroglu M, Bergtold DS (1986) *Anal. Biochem.* **156**: 182-188
17. Gajewski E, Rao G, Nackerdien Z, Dizdaroglu M (1990) *Biochemistry* **29**: 7876-7882
18. Fuciarelli AF, Wegher BJ, Blakely WF, Dizdaroglu M (1990) *Int. J. Radiat. Biol.* **58**: 397-415
19. Téoule R, Bonicel A, Bert C, Fouque B (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**: 6749-6750
20. Téoule R, Bonicel A, Bert C (1977) *Radiat. Res.* **72**: 190-200
21. Frankel K, Cummings A, Solomon J, Cadet J, Steinberg JJ, Teebor GW (1985) *Biochemistry* **24**: 4527-4533
22. Téoule R, Cadet (1978) W: HCtterman J, Knhnlein W, Téoule R, Bertinchamps Aj (red.) Springer-Verlag, str. 171-203 Effects of Ionizing Radiation on DNA
23. Téoule R, Cadet J (1975) *Int. J Radiat. Biol.* 211-222
24. Schulte-Frohlinde D, Bothe E (1984) *Z. Naturforsch* **39c**: 315-319
25. Deeble DJ, von Sonntag C (1986) *Int. J Radiat. Biol.* **49**: 927-936
26. Wagner A, van Lier JE, Johnsoin LJ (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* **116**: 2235-2242
27. Téoule R, Bonicel A, Bert C (1974) *Radiat. Res.* **57**: 46-58
28. Kasai H, Iida A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Tanooka H (1990) *Mutat. Res.* **243**: 249-253
29. Frankel K, Goldstein MS, Teebor G (1981) *Biochemistry* **20**: 7566-7571
30. Teebor GW, Frankel K, Goldstein MS (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 318-321
31. Nackerdien Z, Olinski R, Dizdaroglu M (1992) *Free Radical Res. Commun.* **16**: 259-272
32. Hazra DK, Steenken S (1987) *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 4380-4386
33. Hiraoka W, Kuwabara M, Sato F, Matsuda A, Ueda T (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**: 1217-1223
34. Ekert B, Monier R (1960) *Nature* **188**: 309-310
35. Mori T, Hori Y, Dizdaroglu M (1993) *Int. J. Radiat. Biol.* **64**: 645-650
36. Polvereli M, Téoule R (1974) *Z. Naturforsch.* **29c**: 12-15
37. Sugawara T, Otter BA, Ueda TA (1988) *Tetrahedron Lett.* **29**: 75
38. Steenken S (1989) *Chem. Reviews* **89**: 503-520
39. Heras G (1960) *Nature* **186**: 710-712
40. Kasai H, Tanooka H, Nishimura S (1984) *Gann.* **75**: 1037-1039
41. Dizdaroglu M (1985) *Biochemistry* **24**: 4476-4481
42. Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H (1986) *Carcinogenesis* **7**: 1849-1851
43. Sagripanti JL, Kraemer KH (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 1729-1734
44. Vieira AJSC, Steenken S (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 6986-6994
45. Dirksen ML, Blakely WF, Holwitt E, Dizdaroglu M (1988) *Int. J. Radiat. Biol.* **54**: 195-204
46. Olejnik NL, Chiu S, Ramakrishan N, Xue L (1987) *Br. J Cancer Suppl.* **55**: 135-140
47. Nackerdien Z, Rao G, Cacciuttolo MA, Gajewski E, Dizdaroglu M (1991) *Biochemistry* **30**: 4873-4879
48. Lesko SA, Drocourt JL, Yang SU (1982) *Biochemistry* **21**: 5010-5015
49. Mee LK, Adelstain SJ (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2194-2198
50. Chiu SM, Xue LY, Friedman LR, Oleinick NL (1992) *Radiat. Res.* **129**: 184-191
51. Oleinick NL, Chiu S, Ramakrishnan N, Xue L (1987) *Brit. J. Cancer* **55** (Suppl. VIII): 135-140
52. Olinski R, Nakerdien Z, Dizdaroglu M (1992) *Archiv. Biochem. Biophys.* **297**: 139-143
53. Altman SA, Zastawny TH, Randers-Eichhorn L, Cacciuttolo MA, Akman SA, Dizdaroglu M, G (1995) *Free Rad. Biol. & Med.* **19**: 897-902
54. Margolis SA, Caxon B, Gajewski E, Dizdaroglu M (1988) *Biochemistry* **27**: 6353-6359
55. Gajewski E, Fuciarelli AF, Dizdaroglu M (1988) *Int. J. Radiat. Biol.* **54**: 445-459
56. Dizdaroglu M, Gajewski E (1989) *Cancer Res.* **49**: 3463-3467
57. Gajewski E, Dizdaroglu M (1990) *Biochemistry* **29**: 977-980
58. Dizdaroglu M (1990) W: Hancock, W.S.J. (red) High--Performance Liquid Chromatography in Biotechnology, Wiley & Sons, New York, str. 263-278
59. Fornace Jr AJ, Little BW (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **447**: 343-355
60. Chiu SM, Friedman LR, Xue LY, Oleinick NL (1986) *Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **12**: 1529-1538
61. Halliwell B, Aruoma OI (1993) DNA and free radicals, Ellis Horwood, New York
62. Téoule R (1987) *Int. J. Radiat. Biol.* **51**: 573-589
63. Demple B, Levin J (1991) W: Sies H (red) Oxidative stress:

http://rcin.org.pl

Oxidants and antioxidants, Academic Press, London str. 119--154
64. Ward JF, Blakely WF, Joner EI (1985) *Radiat. Res.* **103**: 383-392
65. Ward JF, Webb CF, Limoli CL, Miligan JR (1990) W: Wallace SS, Painter RB, (red) Ionizing radiation damage to DNA: Wiley-Liss, New York, str. 43-50
66. Kuwabara M, Hiraoka W (1990) *Kyoto Daigaku Gensh Jikken.* **338**: 1-11
67. Prigodich RV, Martin CT (1990) *Biochemistry* **29**: 8017-8019
68. Kuwabara M (1991) *Radiat. Phys. Chem.* **37**: 691-704
69. Pardo L, Osman R, Banfelder J, Mazurek AP, Weinstein H (1991) *Free Rad. Res. Commun.* **12**: 461-463
70. Dizdaroglu M, von Sonntag C, Schulte-Frohlinde D (1975) *J. Amer. Chem. Soc.* **97**: 2277-2278
71. Dizdaroglu M, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag (1977) *Int. J. Radiat. Biol.* **32**: 481-483
72. Dizdaroglu M, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag (1977) *Z. Naturforsch.* **32c**: 1021-1022
73. Beesk F, Dizdaroglu M, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag C (1979) *Int. J. Radiat. Biol.* **36**: 565-577
74. Stelter L, von Sonntag C, Schulte-Frohlinde D (1974) *Int. J Radiat. Biol.* **25**: 515-519
75. Schulte-Frohlinde D, Behrens G, Onal A (1986) *Int. J. Radiat. Biol.* **50**: 103-110
76. Russell GA (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 3871-3877
77. Murphy JA, Griffiths JA (1993) *Nat. Prod. Rep.* **10**: 551-564
78. Stubbe J, Kozarich J (1987) *Chem. Rev.* **87**: 1107-1136
79. Goldberg IH (1991) *Acc. Chem. Res.* **24**: 191-196

Ilościowa technika PCR i jej zastosowanie w molekularnej diagnostyce hematologicznej

Quantitative PCR and its application in hematologic molecular diagnostics

MAŁGORZATA JUNGERMAN*

Spis treści:

I. **Wstęp**
II. **Ilościowa technika PCR**
III. **Kinetyka reakcji amplifikacji**
IV. **Rodzaje ilościowej techniki PCR**
  IV-1. **Pomiar ilości produktu PCR**
  IV-2. **Rozcieńczenie ograniczające**
  IV-3. **Równoczesna amplifikacja genu badanego i kontrolnego**
  IV-4. **Reakcja kompetytywnej amplifikacji**
V. **Oznaczanie ilości produktów transkrypcji sekwencji *BCR-ABL* u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową**

Contents:

I. **Introduction**
II. **Quantitative PCR**
III. **Kinetics of amplification by PCR**
IV. **Quantitative PCR methods**
  IV-1. **Measurement of the amount of PCR product**
  IV-2. **Limiting dilution**
  IV-3. **Co-amplification of target and control genes**
  IV-4. **Competitive PCR**
V. **Quantification of *BCR-ABL* transcripts in patients with chronic myeloid leukemia**

Wykaz skrótów: PCR — ang. *polymerase chain reaction* (reakcja łańcuchowa polimerazy); RT-PCR — ang. *reverse transcription polymerase chain reaction* (PCR połączony z odwrotną transkrypcją); CCD — ang. *charged coupled device* (rodzaj kamery); ALL — ang. *acute lymphoblastic leukemia* (ostra białaczka limfoblastyczna); CML — ang. *chronic myeloid leukemia* (przewlekła białaczka szpikowa); *ABL* — ang. *Abelson murine leukemia* (onkogen odkryty po raz pierwszy u wirusa mysiej białaczki Abelsona); *BCR* — ang. *breakpoint cluster region* (specyficzny region chromosomu 22); Ph — chromosom Filadelfia.

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

I Wstęp

Minęło już ponad 10 lat od czasu, gdy po raz pierwszy opisano reakcję łańcuchową polimerazy (PCR; ang. *polymerase chain reaction*) [1]. Od tego momentu opracowano w oparciu o PCR liczne warianty metody amplifikowania kwasów nukleinowych i manipulowania nimi, które stosowane są m.in do identyfikowania obecności specyficznych sekwencji DNA lub RNA w badanej próbie. Możliwe jest obecnie rutynowe wykrywanie pojedynczych cząsteczek matrycy DNA zawierających wybraną sekwencję w oparciu o niezwykle czułą technikę wewnętrznego PCR (ang. *nested PCR*), gdzie produkt wstępnej amplifikacji poddawany jest ponownie reakcji PCR z zastosowa-

http://rcin.org.pl

niem oligonukleotydów położonych wewnętrznie w stosunku do pary starterów użytych do wstępnej reakcji. Obecność specyficznych RNA może być identyfikowana metodą PCR po wstępnym przepisaniu go na cDNA z zastosowaniem odwrotnej transkrypcji (technika znana jako RT-PCR; ang. *reverse-transcription polymerase chain reaction*). W wielu przypadkach samo stwierdzenie obecności lub braku poszukiwanej sekwencji nukleotydów nie jest wystarczające; ważniejsze jest poznanie jej ilości. Służy temu ilościowa technika PCR (ang. *quantitative PCR*), której celem jest oszacowanie liczby cząsteczek matrycy w próbie.

Ciekawym przykładem zastosowania ilościowej techniki PCR jest monitorowanie choroby szczątkowej u pacjentów po transplantacjach szpiku kostnego. Przeszczepianie szpiku kostnego jest często leczeniem z wyboru u chorych na różnego typu białaczki. Mianem choroby szczątkowej określa się zjawisko występowania pewnej ilości komórek nowotworowych (białaczkowych) u osób będących w remisji po zastosowaniu odpowiedniej terapii, np. po przeszczepieniu szpiku. Na tym etapie samo stwierdzenie obecności niewielkiej liczby komórek nowotworowych nie ma znaczenia prognostycznego, natomiast określenie, czy i w jaki sposób ich ilość zmienia się w czasie pozwala przewidzieć możliwość nawrotu choroby i włączyć w odpowiednim momencie leczenie zapobiegawcze.

II. Ilościowa technika PCR

Celem ilościowej techniki PCR jest oszacowanie liczby cząsteczek matrycy w próbie. Wyróżnić można cztery główne rodzaje ilościowej techniki PCR. Są nimi: 1/. pomiar ilości produktu PCR; 2/. rozcieńczenie ograniczające; 3/. równoczesna amplifikacja genu badanego i kontrolnego; 4/. reakcja kompetytywnej amplifikacji. Decyzja o wyborze danej techniki zależy od kilku czynników; tzn. od rodzaju matrycy, której ilość chcemy zbadać, od przewidywanej szacunkowo ilości tej matrycy, od wymaganej dokładności oznaczenia oraz od tego, czy ilość cząsteczek matrycy należy oznaczyć w sposób bezwzględny, czy względem standardu. By rezultaty były wiarygodne i powtarzalne, wszystkie rodzaje ilościowej techniki PCR wymagają zastosowania wielu dokładnych kontroli. Ponadto, z wyjątkiem metody ograniczającego rozcieńczenia (ang. *limiting dilution*), konieczne jest przeprowadzenia pomiaru ilości produktu PCR. Można w tym celu zastosować szereg różnych metod, np.: bezpośredni pomiar w żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny przy pomocy densytometru laserowego [2] bądź też kamery typu CCD (ang. *charged coupled device*) [3]; densytometrię żeli lub ich fotografii [4]; pomiar scyntylacji znakowanych produktów PCR [5]; wbudowanie do produktu PCR znacznika fluorescencyjnego i odczyt laserowy przy pomocy automatycznego sekwenatora DNA [6]; oznaczenie kolorymetryczne po hybrydyzacji produktów PCR unieruchomionych na filtrze z oligonukleotydami znakowanymi digoksygeniną [7, 8] czy wreszcie wizualne porównanie z wzorcami [9, 10].

III. Kinetyka reakcji amplifikacji

Poznanie kinetyki reakcji PCR jest istotne w przypadku zastosowania jej do oznaczeń ilościowych. Produkty kolejnych cykli reakcji stają się substratami w następnych cyklach, stąd ilość produktów PCR wzrasta wykładniczo. Ilość nagromadzonych cząsteczek produktu (N) określa równanie: $N = N_0 (1 + E)^n$, gdzie N_0 oznacza wyjściową ilość cząsteczek matrycy, E — wydajność reakcji (tzn. frakcję cząsteczek matrycy ulegającą amplifikacji w każdym cyklu), a n — liczbę cykli reakcji. Równanie to uwzględnia fakt, iż amplifikacja nie jest procesem doskonałym, tzn. nie wszystkie cząsteczki matrycy obecne w próbie biorą udział w reakcji, a tylko ich część oznaczona tu symbolem E. Na wydajność reakcji mogą wpływać takie czynniki, jak: sekwencja nukleotydów oraz długość amplifikowanej matrycy, warunki reakcji czy sekwencja oligonukleotydowych starterów. Ponadto stwierdza się różnice w wydajności reakcji pomiędzy poszczególnymi próbami nawet wówczas, gdy amplifikacja przeprowadzana jest w tych próbach równocześnie w identycznych warunkach [11]. W końcowych cyklach reakcja amplifikacji nie przebiega już wykładniczo, jej wydajność spada i pojawia się efekt *plateau*. Przejście z fazy wykładniczej do *plateau* może odbyć się na różnym etapie reakcji w zależności od szczególnego układu matrycy i starterów, a także w zależności od wyjściowej liczby cząsteczek matrycy. Uważa się, że w większości przypadków efekt *plateau* zaczyna pojawiać się około dwudziestego cyklu reakcji.

IV. Rodzaje ilościowej techniki PCR

IV-1. Pomiar ilości produktu PCR

Pomiar ilości produktu PCR przez porównanie ze standardem jedną z metod wymienionych wcześniej (patrz: Rozdział II) jest najprostszym, lecz zarazem najmniej dokładnym rodzajem ilościowej techniki PCR. Metoda ta polega na równoległym prowadzeniu reakcji amplifikacji w próbie badanej oraz w serii prób kontrolnych zawierających znaną ilość matrycy. Określenie ilości badanej sekwencji w próbie następuje poprzez porównanie z zewnętrznym standardem, jakim są w tym przypadku produkty amplifikacji prób będących serią rozcieńczeń znanej ilości tejże sekwencji matrycowej. Zakłada się, że w próbach (badanej i kontrolnej) zawierających takie same ilości matrycy powstaną takie same ilości produktów PCR. Założenie takie jest przybliżone ze względu na wspomniane powyżej różnice w wydajności reakcji w różnych próbkach, nawet amplifikowanych w identycznych warunkach. Ponadto porównanie ilości produktów

http://rcin.org.pl

PCR w próbach badanych i kontrolnych przeprowadzić należy wtedy, gdy reakcja przebiega jeszcze w sposób wykładniczy, ponieważ ilość produktu powstającego w fazie *plateau* nie jest bezpośrednio zależna od początkowej ilości matrycy. Metoda ta służy więc jedynie do przybliżonego oszacowania ilości matrycy, jednak mimo wszystko jest przez wielu badaczy stosowana ze względu na łatwość wykonania. W badaniach hematologicznych zastosowano ją na przykład do oznaczenia poziomu choroby szczątkowej po terapii u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL), gdzie amplifikowano sekwencje DNA specyficzne dla określonych rearanżacji genów łańcuchów ciężkich immunoglobulin oraz genów dla łańcuchów gamma i delta receptorów na limfocytach T [10, 12].

IV-2. Rozcieńczenie ograniczające

Metoda ta polega na przygotowaniu serii rozcieńczeń znanej ilości matrycy w taki sposób, że ostatnia, najbardziej rozcieńczona próba w serii nie zawiera już wystarczającej dla powstania produktu PCR ilości DNA. Krotność rozcieńczenia służy następnie do obliczenia wyjściowej ilości matrycy. W tym przypadku bardzo ważne jest dobranie warunków reakcji zapewniające wysoki stopień powtarzalności wyników. Optymalnym rozwiązaniem jest tu opracowanie warunków umożliwiających amplifikację pojedynczej cząsteczki lub kilku cząsteczek matrycy [13], na przykład przy pomocy wewnętrznego PCR.

IV-3. Równoczesna amplifikacja genu badanego i kontrolnego

Metoda ta polega na równoczesnej amplifikacji sekwencji badanej oraz kontrolnej jako wewnętrznego standardu na matrycy tego samego DNA w tej samej probówce. Zastosowanie wewnętrznego standardu pozwala na monitorowanie zmiennych parametrów, takich jak: ilość DNA w próbie; „amplifikowalność" DNA, tzn. wydajność tego DNA jako matrycy w reakcji amplifikacji; a także różnice w wydajności amplifikacji występujące pomiędzy poszczególnymi próbami w termocyklerze. Oznaczenie ilości sekwencji badanej w próbie następuje dzięki porównaniu intensywności produktów PCR sekwencji badanej i kontrolnej powstających na danej matrycy. Metoda ta spełnia swoje zadanie w przypadku, gdy obie te sekwencje amplifikowane są ze zbliżoną wydajnością, co powinno być ustalone empirycznie przy pomocy różnych kombinacji oligonukleotydowych starterów; a także gdy ilości tych sekwencji w matrycy są zbliżone. Metoda ta jest szczególnie użyteczna do wykrywania niewielkich delecji, na przykład w genie dystrofiny [14]; do identyfikowania utraty allelu [15] oraz do wykrywania większych aberracji chromosomowych, jak trisomie [6] lub aneuploidie [16]. W przypadku amplifikacji polimorficznych sekwencji minisatelitarnych oznaczenie ilościowe może być przeprowadzone poprzez pomiar względnej intensywności prążków odpowiadających poszczególnym produktom PCR, na przykład celem oszacowania stopnia chimeryzmu mieszanego u pacjentów po przeszczepach szpiku kostnego [17] lub ilościowej oceny utraty heterozygotyczności [18].

IV-4. Reakcja kompetytywnej amplifikacji

Reakcja kompetytywnej amplifikacji (ang. *competitive PCR*) przypomina nieco opisaną w poprzednim podrozdziale metodę równoczesnej amplifikacji genu badanego i kontrolnego w tym znaczeniu, iż standardowa sekwencja odniesienia jest amplifikowana równocześnie w tej samej próbie, co sekwencja badana. W przypadku kompetytywnej reakcji PCR rolę standardu spełnia odpowiednio skonstruowana syntetyczna matryca, a nie jak w przypadku poprzedniej metody, endogenna sekwencja odniesienia w obrębie badanego DNA [19, 20, 21]. Amplifikacji metodą PCR (zwykłą lub przez wewnętrzny PCR) poddaje się serię prób zawierających taką samą ilość badanego DNA oraz różne ilości (seryjne rozcieńczenie) sekwencji standardowej (kompetytora). Sekwencja badana i kontrolna amplifikowane są przy pomocy tej samej pary oligonukleotydowych starterów i współzawodniczą ze sobą w mieszaninie reakcyjnej o wszystkie jej składniki. Jeśli spełniony jest podstawowy warunek dotyczący jednakowej wydajności amplifikacji sekwencji badanej i kontrolnej, wówczas stosunek ilościowy tych sekwencji znajduje odzwierciedlenie w stosunku ilościowym odpowiednich produktów PCR przez cały czas trwania reakcji. Ilość sekwencji badanej jest równa ilości sekwencji kontrolnej w tej próbie w serii, w której powstaną jednakowe ilości produktów PCR na obu matrycach. W tak dobranych warunkach doświadczenia różnice w wydajności amplifikacji występujące pomiędzy poszczególnymi próbami nie mają wpływu na wynik końcowy. Przy pomocy tej metody możliwe jest oznaczenie szerokiego zakresu ilości badanej sekwencji bez konieczności ograniczania badania do fazy wykładniczej reakcji; oznaczenie może być dokonane także wtedy, gdy reakcja osiągnęła już *plateau*. Z powodu tych zalet reakcja kompetytywnej amplifikacji jest najczęściej stosowaną odmianą ilościowej techniki PCR.

Rolę sekwencji kontrolnej (tzw. kompetytora) spełnia zwykle sztucznie skonstruowana matryca utworzona drogą modyfikacji sekwencji identycznej z badaną poprzez dodanie lub usunięcie niewielkiego fragmentu restrykcyjnego lub wprowadzenie nowego miejsca restrykcyjnego metodą mutagenezy *in vitro*. Po reakcji PCR i, jeśli to konieczne, po zastosowaniu enzymu restrykcyjnego, sekwencję badaną i kontrolną można odróżnić dzięki różnicy wielkości odpowiednich produktów PCR lub metodą hybrydyzacji ze specyficznymi sondami molekularnymi. Zastosowanie kom-

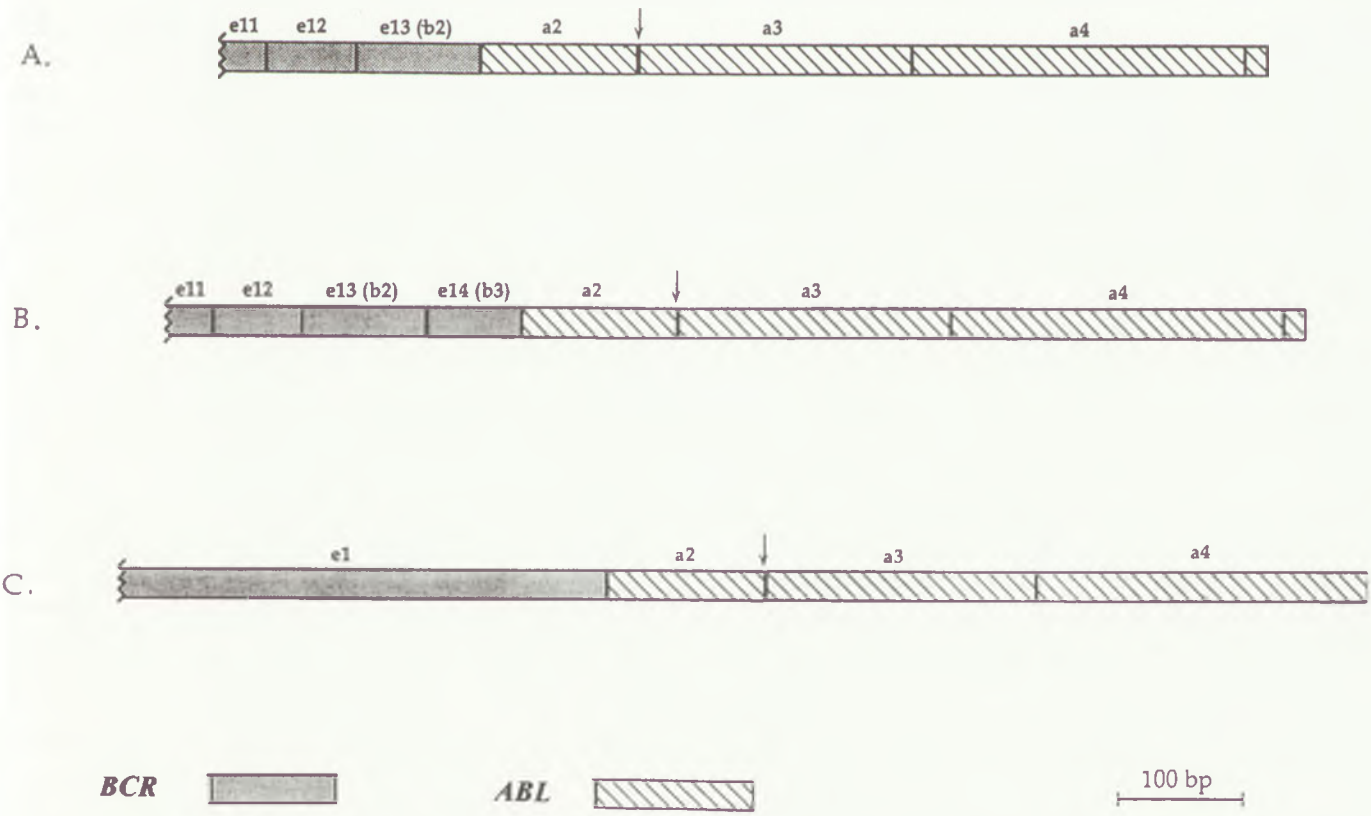
http://rcin.org.pl

petytora różniącego się wielkością od sekwencji badanej znacznie upraszcza analizę, gdyż eliminuje konieczność późniejszej hybrydyzacji z sondami molekularnymi lub stosowania enzymów restrykcyjnych. W przypadku zastosowania kompetytywnej reakcji PCR do oznaczeń ilościowych RNA (w celu badania poziomu ekspresji genu) etapem wstępnym oznaczeń jest uzyskanie cDNA metodą odwrotnej transkrypcji, który jest następnie amplifikowany w reakcji PCR. Część badaczy stosuje w tego typu oznaczeniach kontrolny RNA jako kompetytor w reakcji, co umożliwia kontrolowanie wydajności etapu odwrotnej transkrypcji [19]. Przygotowanie takiego kompetytora jest jednak dość trudne, ponadto cząsteczki RNA są nietrwałe i łatwiej niż DNA ulegają zdegradowaniu. Właściwsze wydaje się w związku z tym zastosowanie odpowiedniego DNA jako kompetytora i przeprowadzenie równolegle dwóch serii reakcji kompetytywnej amplifikacji: jednej serii w celu zidentyfikowania poziomu transkrypcji sekwencji badanej, a drugiej w celu oznaczenia poziomu transkrypcji innej sekwencji w tym samym materiale badanym; istotne jest, by ekspresja tej ostatniej była stała (konstytutywna) [22]. Zastosowanie takiej serii kontrolnej efektywnie eliminuje parametry zmienne, jak na przykład wydajność odwrotnej transkrypcji czy jakość preparatów RNA.

Przygotowanie kompetytora jest na ogół procesem dość żmudnym i czasochłonnym. W związku z tym reakcja kompetytywnej amplifikacji znajduje zastosowanie przede wszystkim w laboratoriach przeprowadzających większą liczbę analiz ilościowych danej sekwencji w wielu różnych próbach. Przykładowo, metodę tę wykorzystuje się między innymi do detekcji wirusów w próbkach klinicznych [7, 8], do oszacowania stopnia amplifikacji onkogenów w guzach litych [23] oraz do oznaczenia różnic w poziomie ekspresji genów po zadziałaniu różnych czynników stymulujących [24]. Innym przykładem jej zastosowania jest oznaczenie ilościowe choroby szczątkowej u pacjentów z białaczkami po różnego rodzaju terapii; w tym przypadku amplifikowane są sekwencje będące produktami specyficznych dla danego typu białaczki translokacji i fuzji genów, np. *BCR-ABL* w przewlekłej białaczce szpikowej [25, 26]. Metodę oznaczania ilości specyficznych dla przewlekłej białaczki szpikowej produktów transkrypcji omówiono szczegółowo poniżej.

V. Oznaczanie ilości produktów transkrypcji sekwencji *BCR-ABL* u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową

U ponad 90% chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (CML — ang. *chronic myeloid leukemia*) oraz u 5% dzieci i 20% dorosłych chorych na ostrą



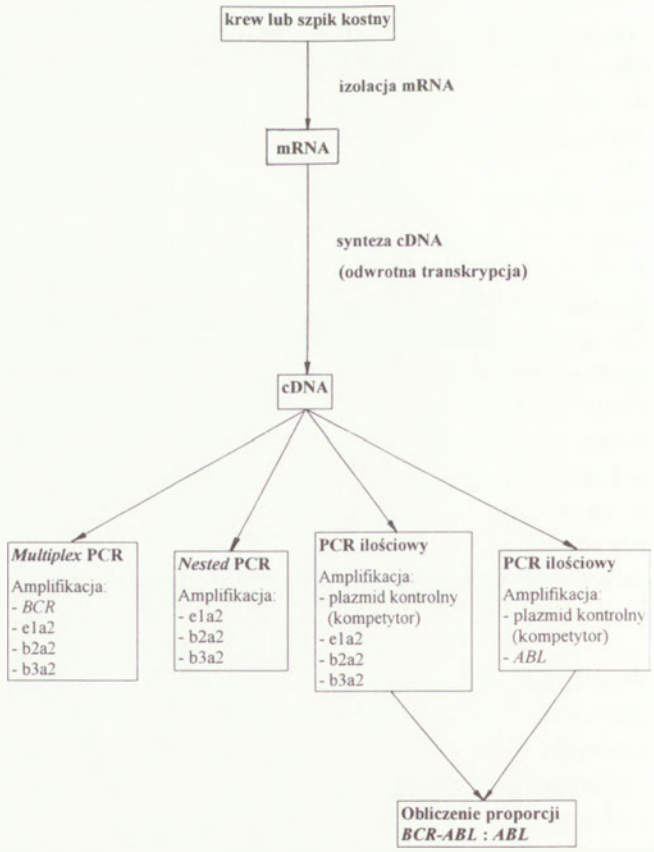
Ryc. 1. Schemat fragmentu mRNA *BCR-ABL*, produktu transkrypcji hybrydowego genu *BCR-ABL* w chromosomie Filadelfia, w miejscu połączenia sekwencji obu genów. Plazmid stosowany jako kompetytor w oznaczeniach ilościowych *BCR-ABL* zawiera odcinek DNA o sekwencji odpowiadającej przedstawionym tu fragmentom mRNA z dodatkową sekwencją DNA faga lambda o wielkości około 200 par zasad, wprowadzoną w miejscu wskazanym przez strzałkę.
A. Produkt transkrypcji b2a2.
B. Produkt transkrypcji b3a2.
C. Produkt transkrypcji e1a2.
Litery a, b oraz e z odpowiednimi numerami oznaczają eksony genów *BCR* i *ABL*.

http://rcin.org.pl

białaczkę limfoblastyczną (AML — *ang. acute lymphoblastic leukemia*) stwierdzono występowanie tzw. chromosomu Filadelfia (Ph). Chromosom ten, opisany po raz pierwszy w 1960 roku [27], powstaje w wyniku translokacji zrównoważonej t(9;22)(q34;q11) pomiędzy długimi ramionami chromosomów 22 i 9 [28]. Badania molekularne wykazały, że złamanie chromosomu 22 następuje w obrębie tzw. regionu *BCR* w chromosomie 22 (ang. *breakpoint cluster region*), którego łączna długość wynosi 6 tysięcy par zasad, a chromosomu 9 — na końcu 5' genu *ABL*. Połączony produkt fuzji obu genów *BCR-ABL* jest aktywny transkrypcyjnie, a produktem jego ekspresji jest białko hybrydowe o właściwościach transformujących [29]. Pierwotny produkt transkrypcji jest składany u większości chorych na CML w taki sposób, że w dojrzałym mRNA ekson b2 lub b3 genu *BCR* sąsiaduje z eksonem a2 genu *ABL* (produkty transkrypcji odpowiednio b2a2 lub b3a2) [29]. W obu przypadkach produktem translacji jest białko BCR-ABL o wielkości 210 tysięcy daltonów. Z kolei u około 70% pacjentów z ALL-Ph(+) w wyniku fuzji połączeniu ulega ekson e1 genu *BCR* z eksonem a2 genu *ABL*, a produktem translacji jest mniejsze białko o wielkości 190 tysięcy daltonów (Ryc. 1). U pozostałych 30% chorych na ALL-Ph (+) produktem translacji jest białko o wielkości 210 tysięcy daltonów [30], tak jak w przypadku CML.

Połączony gen *BCR-ABL* ze względu na specyficzne występowanie wyłącznie w komórkach białaczkowych jest doskonałym markerem do identyfikowania choroby szczątkowej. Badacze z kilku różnych grup wykazali możliwość specyficznego i efektywnego wykrywania mRNA *BCR-ABL* metodą odwrotnej transkrypcji RNA izolowanego z leukocytów i amplifikacji uzyskanego cDNA (RT-PCR). Technika ta pozwala na wykrycie pojedynczej komórki CML na tle 10^5 do 10^6 prawidłowych komórek. U wielu pacjentów obecność komórek CML, a więc również hybrydowego mRNA *BCR-ABL*, jest wykrywana wiele miesięcy po transplantacji szpiku kostnego, gdzie nie stwierdza się nawrotu choroby podstawowej. O niebezpieczeństwie nawrotu choroby świadczy nie tyle samo występowanie komórek CML po transplantacji, ile wzrost ich liczby w pewnym odcinku czasu. W związku z tym zastosowanie techniki jakościowej umożliwiającej jedynie zidentyfikowanie braku lub obecności mRNA *BCR-ABL* ma ograniczoną wartość prognostyczną [9, 31, 32]. Wprowadzając reakcję kompetytywnej amplifikacji do oznaczania ilości produktów transkrypcji genu *BCR-ABL* wykazano, że wzrost ilości tego mRNA poprzedza nawrót choroby, który na późniejszym etapie można wykazać metodami cytogenetycznymi [25, 33]. Dane uzyskane przy pomocy testu ilościowego umożliwiają bardzo wczesne włączenie terapii w postaci transfuzji leukocytów pochodzących od pierwotnego dawcy szpiku kostnego [22].

Test zmierzający do oznaczenia ilości transkryptów *BCR-ABL* u pacjenta składa się z kilku etapów (Ryc. 2). Po wstępnym przygotowaniu materiału do badań, obejmującym ekstrakcję RNA i syntezę cDNA, przeprowadza się serię kilku reakcji PCR (omówionych poniżej) z udziałem prób badanych i kontrolnych. Materiałem wyjściowym do badań jest krew obwodowa lub szpik kostny badanej osoby, z których wyodrębnia się leukocyty metodą wirowania. Wybór krwi lub szpiku nie ma większego wpływu na wydajność oznaczenia [26, 34]. Leukocyty poddawane są następnie lizie w odpowiednim buforze, po czym z uzyskanego lizatu wyodrębniana jest mieszanina wszystkich RNA występujących w komórce. Kolejnym etapem jest synteza cDNA z zastosowaniem niespecyficznych heksamerów (ang. *random hexamers* — pdN_6). Uzyskany cDNA jest matrycą we wszystkich kolejnych etapach analizy jakościowej i ilościowej sekwencji *BCR-ABL* z zastosowaniem reakcji amplifikacji. Pierwsze dwie reakcje (typu *multiplex* oraz wewnętrzny PCR) służą wyłącznie analizie jakościowej; tzn. pozwalają zidentyfikować obecność lub brak odpowiednich produktów transkrypcji w materiale pochodzącym od pacjenta. W reakcji *multiplex* kilka par oligonukleotydowych starterów obecnych w mieszaninie reakcyjnej umożliwia równoczesną amplifikację fragmentu prawidłowej sekwencji *BCR* oraz jednej z re-



Ryc. 2. Schemat ilościowego oznaczenia mRNA *BCR-ABL* przy pomocy reakcji kompetytywnej amplifikacji (objaśnienia w tekście). Reakcje *multiplex* PCR oraz wewnętrzny (*nested*) PCR służą jakościowemu zidentyfikowaniu obecności hybrydowych sekwencji e1a2, b2a2 i b3a2, których ilość jest następnie oznaczana w obecności odpowiedniego kompetytora.

http://rcin.org.pl

kombinowanych sekwencji e1a2, b3a2 lub b2a2, w zależności od tego, która z nich występuje u danego pacjenta. Amplifikację fragmentu genu *BCR* przeprowadza się tu wyłącznie w celu sprawdzenia jakości wyizolowanego RNA i wydajności etapu odwrotnej transkrypcji — obecność odpowiedniego produktu PCR jest potwierdzeniem, że wstępne przygotowanie materiału było prawidłowe. U tych pacjentów, u których poziom mRNA będącego produktem transkrypcji genu *BCR-ABL* na chromosomie Filadelfia jest wysoki, pojawi się również produkt zawierający jedną z wymienionych powyżej rekombinowanych sekwencji. Brak takiego produktu na tym etapie badania odzwierciedla brak odpowiedniego produktu transkrypcji w próbie badanej bądź też jego obecność w stosunkowo niewielkiej ilości. W celu zweryfikowania, która z tych opcji jest prawdziwa, przeprowadza się badanie metodą wewnętrznego PCR. Reakcja taka jest złożona z dwóch następujących kolejno po sobie amplifikacji; w pierwszej stosuje się jako matrycę cDNA danego pacjenta oraz odpowiednią parę oligonukleotydowych starterów umożliwiających syntezę sekwencji *BCR-ABL*, w drugiej rolę matrycy spełnia produktu pierwszej reakcji, a oligonukleotydowe startery są położone wewnętrznie (w kierunku 3') w stosunku do pary stosowanej w pierwszej amplifikacji. Reakcja typu wewnętrznego charakteryzuje się znacznie wyższą wydajnością w stosunku do zwykłej amplifikacji. W związku z tym pozwala ona wykryć obecność poszukiwanego mRNA *BCR-ABL* także u tych pacjentów, u których poziom tego mRNA jest niski i detekcja opisaną powyżej metodą *multiplex* PCR nie jest możliwa. Z kolei brak produktu wewnętrznego PCR dowodzi faktycznego braku mRNA *BCR-ABL* u danego pacjenta.

Oznaczenie ilościowe metodą kompetytywnej amplifikacji opiera się na równoczesnym zastosowaniu w reakcji PCR dwóch matryc w jednej próbie: jedną z nich jest sekwencja badana, drugą — sekwencja wzorcowa, której ilość w reakcji jest dokładnie znana. Amplifikacji poddaje się równocześnie serię prób, z których każda zawiera taką samą ilość sekwencji badanej oraz odpowiednie seryjne rozcieńczenie sekwencji wzorcowej. W przypadku oznaczeń mRNA *BCR-ABL* rolę sekwencji wzorcowych pełnią odpowiednio skonstruowane plazmidy, który zawierają odcinek DNA o sekwencji nukleotydowej odpowiadającej połączonym eksonom b3 i a2 albo e1 i a2 genu *BCR-ABL* na chromosomie Filadelfia (Ryc. 1). Wybór odpowiedniego plazmidu wzorcowego zależy od rodzaju zidentyfikowanej u danego pacjenta zrekombinowanej sekwencji *BCR-ABL*, co następuje w wyniku opisanych wyżej reakcji *multiplex* oraz *nested* PCR. W obręb fragmentu *BCR-ABL* w plazmidzie dodatkowo wprowadzony jest krótki odcinek DNA faga lambda. Dzięki tej modyfikacji powstający na matrycy tego plazmidu produkt PCR różni się wielkością od analogicznego produktu syntetyzowanego na matrycy badanego cDNA, dzięki czemu oba fragmenty można następnie rozdzielić stosując elektroforezę w żelu agarozowym. Oznaczenie ilościowe badanej sekwencji możliwe jest dzięki jednakowej wydajności amplifikacji tej sekwencji w przypadku cDNA i plazmidu jako matrycy z zastosowaniem tych samych oligonukleotydowych starterów, o które obie matryce współzawodniczą ze sobą. Proporcje ilości odpowiednich produktów PCR w próbach będą takie, jak proporcje ilości obu matryc. Ilość badanego cDNA będzie równa ilości kontrolnego plazmidu użytego do reakcji w tej próbie, w której proporcje odpowiednich produktów PCR będą wynosiły 1:1.

Oprócz oznaczeń mRNA *BCR-ABL* w badanych preparatach pochodzących od pacjentów przeprowadza się również w analogiczny sposób oznaczenie ilościowe *ABL*. Ostatecznym wynikiem badania jest obliczenie proporcji ilości *BCR-ABL* do *ABL*. Dzięki zastosowaniu *ABL* jako wewnętrznego standardu wynik końcowy nie jest zależny od wydajności etapów izolacji mRNA i odwrotnej transkrypcji. Ilości *BCR-ABL* i *ABL* oznaczane są w tym samym preparacie cDNA uzyskanym metodą odwrotnej transkrypcji na matrycy mRNA badanego pacjenta. Ponadto do oznaczeń *ABL* stosowane są te same oligonukleotydowe startery oraz ten sam plazmid jako kompetytor w reakcji, jak w przypadku oznaczeń *BCR-ABL*. Oznaczanie ilości *ABL* stanowi wygodną kontrolę wewnętrzną dla całości złożonej procedury oznaczania ilościowego *BCR-ABL*.

Końcowy wynik oznaczenia ilościowego podawany jest w procentach i oznacza on proporcję ilości *BCR-ABL* do *ABL*. Wartość poniżej 0.02% uważana jest za wskaźnik niskiego poziomu *BCR-ABL* i stanowi wskazanie do kolejnego badania po około czterech tygodniach. Wartość pomiędzy 0.02% i 0.5% sugeruje możliwość wznowy choroby. W tym przypadku konieczne jest badanie kolejnej próby od pacjenta w możliwie jak najszybszym terminie celem zweryfikowania wyniku i monitorowania wznowy na poziomie molekularnym. Z kolei wartość pomiędzy 0.5% a 14% oznacza wysoki poziom transkrypcji *BCR-ABL*. U takich pacjentów w badaniu cytogenetycznym stwierdza się w znacznej ilości metafaz obecność chromosomu Filadelfia. Wartość ponad 14% występuje u pacjentów, u których większość lub wszystkie metafazy wykazują obecność tego chromosomu w badaniu cytogenetycznym.

Na każdym etapie kompetytywnej reakcji PCR bardzo ważne jest stosowanie odpowiednich prób kontrolnych. Kontrole negatywne nie zawierające matrycy, w których nie powinno dojść do syntezy żadnego produktu PCR, umożliwiają zidentyfikowanie zanieczyszczeń, a kontrole pozytywne zawierające matrycę izolowaną z odpowiednich linii komórkowych informują o prawidłowym przebiegu całej procedury oznaczania *BCR-ABL*.

U pacjentów badanych metodą kompetytywnej rea-

http://rcin.org.pl

kcji PCR nawrót choroby jest zawsze poprzedzony wzrostem ilości mRNA *BCR-ABL*, który znacznie wyprzedza pojawienie się odpowiednich markerów cytogenetycznych [9, 33]. Podwyższenie poziomu transkrypcji genu *BCR-ABL* wynika z wykładniczego wzrostu ilości komórek białaczkowych w okresie poprzedzającym nawrót choroby. Samo stwierdzenie obecności tego mRNA ma natomiast niewielkie znaczenie prognostyczne, ponieważ występuje on często u pacjentów w okresie do jednego roku po transplantacji i potem zanika. Wprowadzenie oznaczeń ilościowych metodą kompetytywnej amplifikacji umożliwiło odróżnienie tych pacjentów, u których poziom mRNA *BCR-ABL* wzrasta sygnalizując zbliżający się nawrót choroby od tych, u których ilość tego mRNA nie zmienia się, bądź maleje. U tych pierwszych możliwe jest wczesne zastosowanie odpowiedniej terapii zapobiegającej wznowie białaczki. Reakcja kompetytywnej amplifikacji sekwencji *BCR-ABL* z zastosowaniem dodatkowych kontrolnych oznaczeń ilościowych sekwencji *ABL* jest wydajną i wiarygodną metodą monitorowania choroby szczątkowej u pacjentów po transplantacjach szpiku kostnego.

Artykuł otrzymano 24 kwietnia 1997 r.
Zaakceptowano do druku 18 września 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N (1985) *Science*, **230**: 1350-1354
2. Lyttelton M P A, Hart S, Ganeshaguru K, Hoffbrand A V, Mehta A B (1994) *Br. J. Haematol.*, **86**: 540-546
3. Sutherland J C, Sutherland B C, Emrick A, Monteleone D C, Ribeiro E A, Trunk J, Son M, Serwer P, Poddar S K, Maniloff J (1991) *Biotechniques*, **10**: 492-497
4. Lion T, Izraeli S, Henn T, Gaiger A, Mor W, Gadner H (1992) *Leukemia*, 6: 495-499
5. Clifford S C, Thomas D J, Neal D E, Lunec J (1994) *Br J. Cancer*, **69**: 690-686
6. von Eggeling F, Freytag M, Fahsold R, Horsthemke B, Calussen U (1993) *Human Genetics*, **91**: 567-570
7. Kohsaka H, Tangiguchi A, Richman D D, Carson D A (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**: 3469-3472
8. Lehtovaara P, Uusi Oukari M, Buchert P, Laaksonen M, Bengtstrom M, Ranki M (1993) *PCR Methods and Applications*, **3**: 169-175
9. Cross N C P, Hughes T P, Feng L, O'Shea P, Bungey J, Marks D I, Ferrant A, Martiat P, Goldman J M (1993) *Br. J. Haematol.* **84**: 67-74
10. Potter M N, Steward C G, Oakhill A (1993) *Br. J. Haematol.* **83**: 412-418
11. Wiesner R J (1992) *Nucleic Acids Res.* **51**: 5863-5846
12. Nizet Y, Van Daele S, Lewalle P, Vaerman J L, Philippe M, Vermylen C, Cornu G, Ferrant A, Michaux J L, Martiat P (1993) *Blood*, **82**: 1618-1625
13. Sykes P J, Neoh S H, Brisco M J, Hughes E, Condon J, Morley A A (1992) *Biotechniques*, **13**: 444-449
14. Abbs S, Bobrow M (1992) *J. Med. Genet.*, **29**: 191-196
15. Neubauer A, Neubauer B, Liu E (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**: 993-998
16. Mutter G L, Pomponio R J (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**: 4203-4207
17. Lawler M, Humphries P, McCann S R (1991) *Blood*, **77**: 2504-2514
18. Silly H, Chase A, Mills K I, Apfelbeck U, Sormann S, Goldman J M, Cross N C P (1994) *Leukemia*, **8**: 1923-1928
19. Becker A M, Hahlbrock K (1989) *Nucleic Acids Res.*, **17**: 9437-9446
20. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn H F (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2725-2729
21. Siebert P D, Larrick J W (1992) *Nature*, **359**: 557-558
22. van Rhee F, Lin F, Cullis J O, Spencer A, Cross N C P, Chase A, Garicochea B, Bungey J, Barrett J A, Goldman J M (1994) *Blood* **83**: 3377-3383
23. Sestini R, Orlando C, Zentilin L, Gelmini S, Pinzani P, Bianchi S, Selli C, Giacca M, Pazzagli M (1994) *Clin. Chem.* **40**: 630-636
24. Fandrey J, Bunn H F (1993) *Blood*, **81**: 617-623
25. Cross N C P, Lin F, Chase A, Bungey J, Hughes T P, Goldman J M (1993) *Blood*, **82**: 1929-1936
26. Lin F, Goldman J M, Cross N C P (1994) *Br. J. Haematol.*, **86**: 683-685
27. Nowell P C, Hungerford D A (1960) *Science* **132**: 1497
28. Rowley J D (1973) *Nature* **243**: 290-293
29. Groffen J, Heisterkamp N (1987) *Baillieres Clin. Haematol* **1**: 983-999
30. Mauer J, Janssen J W G, Thiel E, van Denderen J, Ludwig W D, Aydemir U, Heinze B, Fonatsch C, Harbott J, Reiter A, Riehm H, Hoelzer D, Bartram C R (1991) *Lancet* **337**: 1055-1058
31. Delage R, Soiffer R J, Dear K, Ritz J (1991) *Blood*, **78**: 2759-2767
32. Roth M S, Antin J H, Ash R, Terry V H, Gotlieb M, Silver S M, Ginsburg D (1992) *Blood*, **79**: 276-282
33. Lion T, Henn T, Gaiger A, Kahls P, Gadned H (1993) *Lancet*, **341**: 275-276
34. van Rhee F, Marks D I, Lin F, Szydlo R M, Hochhaus A, Treleaven J, Delord C, Cross N C P, Goldman J M (1995) *Leukemia*, **9**: 329-335

Acta Biochimica Polonica

Uprzejmie informujemy, że nasze pismo *Acta Biochimica Polonica* jest indeksowane przez Biochemistry & Biophysics Citation Index (ISI, U.S.A.), BIOSIS (U.S.A.), Chemical Abstract (Columbus, U.S.A.), Current Awareness in Biological Sciences (England), Excerpta Medica (Elsevier, Holland), Medline (U.S.A.).

http://rcin.org.pl

Rekombinacja genetyczna (+) RNA wirusów

Genetic recombination (+) RNA viruses

MAREK FIGLEROWICZ[1]
JÓZEF J. BUJARSKI[2]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Typy rekombinacji
III. Systemy doświadczalne umożliwiające badanie rekombinacji genetycznej RNA wirusów
III-1. Pikornawirusy
III-2. Koronawirusy
III-3. Karmowirusy
IV. Rekombinacja genetyczna bromowirusów
V. Strukturalne uwarunkowania rekombinacji BMV
V-1. Rekombinacja niehomologiczna
V-2. Rekombinacja homologiczna
VI. Podsumowanie

Contents:

I. Introduction
II. Types of recombination
III. Experimental systems for the study of genetic recombination in RNA wiruses
III-1. Picornaviruses
III-2. Coronaviruses
III-3. Carmoviruses
IV. Genetic recombination in bromoviruses
V. Structural reqiurements for BMV recombination
V-1. Nonhomologous recombination
V-2. Homologous recombination
VI. Summary and conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: FMDV — wirus pryszczycy bydlęcej; MHV — wirus mysiego zapalenia wątroby; TCV — wirus kędzierzawki rzepy; BMV — wirus mozaiki stokłosy; CCMV — wirus żółtej chlorowatości wspięgi chińskiej.

I. Wstęp

Jak powszechnie wiadomo, jedną z cech charakterystycznych RNA wirusów jest ich duża niestabilność genetyczna. Przez długi czas przyczyny tego zjawiska upatrywano głównie w znacznej ilości błędów, jakie popełniać może polimeraza RNA podczas replikacji wirusowego genomu [1, 2]. Badania dotyczące ewolucji RNA wirusów wykazały jednak, iż istnieje dodatkowy proces umożliwiający rearanżację ich informacji genetycznej. Jest nim rekombinacja zachodząca pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA [3, 4]. Jeszcze na początku lat 90-tych uważano, iż proces ten zachodzić może tylko w obrębie niektórych grup wirusów [5]. Sądzono tak, gdyż w stabilnie utrzymujących się warunkach naturalnych produkty rekombinacji są z reguły trudne do zaobserwowania. Z jednej strony rekombinacja homologiczna pomiędzy identycznymi cząsteczkami RNA jest niezauważalna, gdyż prowadzi do odtworzenia cząsteczek rodzicielskich. Z drugiej strony zmiany w genomie wprowadzone w wyniku rekombinacji niehomologicznej nie pozwalają zazwyczaj nowopowstałemu wirusowi konkurować z typem dzikim (wt) przez co zostaje on wyeliminowany ze środowiska. W ostatnich latach częstość z jaką identyfikowane i izolowane są rekombinanty RNA uległa jednak wyraźnemu zwiększeniu. Fakt ten wiązany jest głównie z coraz szerszym stosowaniem nowoczesnych metod inżynierii genetycznej szczególnie ekspresji fragmentów genomów wirusowych w różnych organizmach [6, 7] (metody wykorzystywane w medycynie dla potrzeb terapii genowej czy w rolnictwie dla uzyskania odporności przeciwwirusowej roślin). Kolejną istotną przyczyną wpływającą na zwiększenie częstości rekombinacji wydają się być daleko idące zmiany środowiskowe. Zmuszają one drobnoustroje do ulegania ciągłym przeobrażeniom, których celem jest jak najlepsze przystosowanie do nowopowstałego otoczenia. Rekombinacji sprzyja także łatwość, z jaką wirusy mogą obecnie rozprzestrzeniać się w skali całego świata, wzajemnie na siebie oddziałując.

Najnowsze badania wskazują coraz wyraźniej, iż rekombinacja jest niezwykle powszechna w świecie RNA wirusów, gdzie pełni rolę jednego z głównych czynników decydujących o ich dużej zmienności genetycznej [8]. Badania te umożliwiały identyfikację różnego typu rekombinantów wirusowych powstałych w wyniku wymiany informacji genetycznej pomiędzy fragmentami genomu tego samego wirusa [9], pomiędzy różnymi szczepami wirusowymi [10, 11] oraz pomiędzy wirusem a komórką gospodarza [12, 13]. Rekombinacja obserwowana była u wirusów ludzkich [5, 14], zwierzęcych [5], roślinnych [9, 15, 16] i bakteryjnych [17]. Sprawiło to, iż jest ona obecnie traktowana jako jedno z najpoważniejszych potencjalnych

[1] Dr; Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań [2] Prof.; Plant Molecular Biology Center and Biology Department, Northern Illinois University, DeKalb, IL 60115, USA

http://rcin.org.pl

zagrożeń zarówno dla zdrowia ludzi czy zwierząt, jak i upraw rolnych.

Pomimo poczynionych licznych obserwacji molekularny mechanizm rekombinacji RNA nie został w pełni poznany. Powszechnie akceptowanym jest pogląd, iż proces ten zachodzi zgodnie z mechanizmem *„copy choice"* [18], gdy w trakcie syntezy nici potomnej replikaza wirusowa zmienia matrycę, a więc inaczej jak w przypadku organizmów, których genom zbudowany jest z DNA. Wskazują na to głównie dwa fakty. Po pierwsze rekombinacja RNA uwarunkowana jest zdolnością wirusa do replikacji [19]. Po drugie stosunkowo często obserwuje się obecność dodatkowych nukleotydów (nie pochodzących z matrycy) w miejscach przeskoków rekombinacyjnych [8]. Zakłada się, iż zostają one wbudowane podczas przeskoku replikazy, gdy enzym ten traci kontakt z jedną matrycą a równocześnie nie jest jeszcze dostatecznie zasocjowany z kolejną. Ponadto nie istnieją żadne dowody świadczące, iż rekombinacja zachodzić może poprzez rozerwanie i ponowne połączenie nici RNA.

II. Typy rekombinacji

Chcąc uporządkować naszą dotychczasową wiedzę na temat rekombinacji, L a i zaproponował, by podzielić ją na trzy typy: rekombinację homologiczną, homologiczną nieprecyzyjną (zaburzoną) oraz niehomologiczną [5].

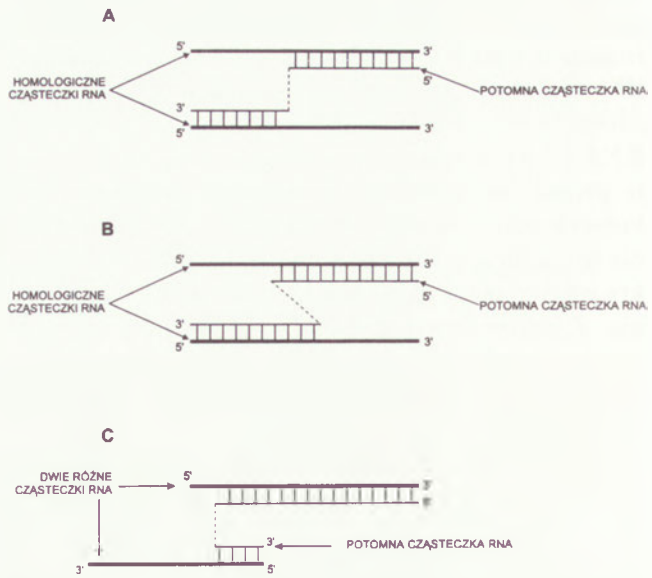
Rekombinacja homologiczna. W procesie tym uczestniczą identyczne lub bardzo podobne cząsteczki RNA. Przeskok rekombinacyjny zachodzi pomiędzy dokładnie odpowiadającymi sobie nukleotydami tak, iż tworzący się rekombinant zachowuje sekwencję jak i organizację cząsteczek rodzicielskich (tzw. symetryczny przeskok rekombinacyjny, Ryc. 1A). Określenie tego typu rekombinacji terminem „homologiczna" odnosi się zatem zarówno do całych cząsteczek RNA jak i do sekwencji, w obrębie których obserwowany jest przeskok rekombinacyjny oraz do samej lokalizacji miejsca przeskoku. W świetle obecnych badań wydaje się, iż w naturalnych warunkach jest to najczęściej zachodzący typ rekombinacji. Chociaż z ewolucyjnego punktu widzenia proces ten nie wydaje się mieć szczególnego znaczenia, jednak może on pełnić niezwykle istotną rolę mechanizmu umożliwiającego naprawę uszkodzonych czy błędnie skopiowanych genomowych cząsteczek RNA.

Rekombinacja homologiczna nieprecyzyjna (zaburzona). Podobnie jak poprzednio opisywany proces zachodzi ona pomiędzy homologicznymi cząsteczkami RNA. Jednakże w tym przypadku miejsca pomiędzy którymi dochodzi do przeskoku rekombinacyjnego ulokowane są różnie w obu cząsteczkach (tzw. niesymetryczne przeskoki rekombinacyjne, Ryc. 1B). Rekombinacja homologiczna nieprecyzyjna prowadzi zatem do powstania rekombinantów, w których pewne sekwencje uległy duplikacji lub delecji w porównaniu z rodzicielskimi cząsteczkami RNA.

Rekombinacja niehomologiczna. Ten typ rekombinacji jest obserwowany najrzadziej. Uczestniczą w niej dwie różne cząsteczki RNA (Ryc. 1C). Powstały rekombinant jest więc zdecydowanie odmienny od cząsteczek rodzicielskich. Rekombinacja niehomologiczna odgrywa zatem szczególnie istotną rolę w procesie ewolucji RNA wirusów. Może bowiem prowadzić zarówno do daleko idącej rearanżacji w obrębie genomu wirusowego jak również do powstania całkowicie nowych drobnoustrojów. Te ostatnie tworzą się nie tylko w wyniku rekombinacji zachodzącej pomiędzy RNA wirusowymi. Obserwuje się, iż na drodze rekombinacji mogą być wprowadzane do genomu wirusowego także fragmenty RNA z komórki gospodarza.

III. Systemy doświadczalne umożliwiające badanie rekombinacji genetycznej RNA wirusów

Jak już wspominaliśmy, w ostatnich latach ukazało się wiele doniesień mówiących o zidentyfikowaniu i wyizolowaniu różnego typu rekombinantów wirusowych. Ponieważ jednak mechanizm molekularny rekombinacji RNA jak również jej strukturalne uwarunkowania nie zostały w pełni poznane, stąd nadal niezwykle trudno jest stworzyć warunki, w których proces ten zachodziłby w sposób kontrolowany oraz z wydajnością umożliwiającą jego efektywną obserwację. Dodatkowy problem, szczególnie w przypadku badań prowadzonych *in vivo*, stanowi obecność ciśnienia selekcyjnego, decydującego czy tworzące się rekombinanty ulegać będą akumulacji, a jeżeli tak to które z nich. Często zatem podstawowym problemem rodzącym się w trakcie badań jest odpowiedź na następujące pytanie: na ile struktura wyizolowanych rekombinantów rzeczywiście odzwierciedla mecha-



Ryc. 1. Trzy typy rekombinacji RNA. A) Rekombinacja homologiczna. B) Rekombinacja homologiczna nieprecyzyjna. C) Rekombinacja niehomologiczna.

http://rcin.org.pl

nizm rekombinacji, a w jakim stopniu jest jedynie miarą przystosowania potomnych cząsteczek RNA (ich infekcyjności, zdolność do replikacji czy akumulacji). Z tych to względów tylko w kilku przypadkach poczynione obserwacje dotyczące powstawania rekombinantów dały podstawy do stworzenia systemów doświadczalnych umożliwiających prowadzenie bardziej szczegółowych badań procesu rekombinacji RNA.

Obecnie wyróżnić można cztery podstawowe systemy rekombinacyjne stworzone w obrębie następujących rodzin wirusów: pikornawirusów [19], koronawirusów [5], karmowirusów [16] oraz bromowirusów [9]. Jednakże tylko ostatni z wymienionych systemów jest na tyle wszechstronny, iż umożliwia badanie mechanizmu molekularnego wszystkich trzech typów rekombinacji. Uzyskiwane przy jego zastosowaniu wyniki mają najbardziej kompleksowy charakter, przez co pozwalają najprecyzyjniej określić strukturalne uwarunkowania badanego procesu. Z tego też względu w dalszej części pracy skoncentrujemy się głównie na przedstawieniu wyników badań dotczących rekombinacji bromowirusów. Najpierw jednak krótko przedstawione zostaną najbardziej istotne rezultaty uzyskane przy użyciu pozostałych trzech systemów.

III-1. Pikornawirusy

Do rodziny pikornawirusów zaliczane są wirusy ludzkie i zwierzęce, których genom stanowi cząsteczka kwasu rybonukleinowego o polarności mRNA i długości ok. 7-8 tysięcy nukleotydów [20]. Jej koniec 5′ jest kowalencyjnie związany z białkiem VPg podczas gdy koniec 3′ stanowi poli (A). Genomowy RNA posiada pojedynczą ramkę odczytu tak więc w wyniku translacji powstaje tylko jedna poliproteina. Dzięki obecności specyficznych proteaz zostaje ona następnie rozdzielona na mniejsze fragmenty stanowiące wirusowe białka strukturalne i funkcjonalne. Za powielenie genomu wirusowego odpowiedzialny jest kompleks replikacyjny. W jego skład, obok kodowanej przez wirusa specyficznej polimerazy RNA wchodzą prawdopodobnie białko PVg oraz pewne komponenty pochodzące z komórki gospodarza.

W badaniach rekombinacji genetycznej pikornawirusów posługiwano się głównie dwoma drobnoustrojami: wirusem polio oraz wirusem pryszczycy bydlęcej (FMDV — ang. *food and mouth diseases virus*) [11, 14, 21]. Badania te prowadzono przy użyciu klasycznych metod genetycznych zarówno *in vitro* (w hodowlach komórkowych) jak i *in vivo* [22, 23]. Polegały one na wywoływaniu tzw. mieszanych infekcji, to znaczy zakażeniu komórek dwoma szczepami wirusowymi posiadającymi odmienne markery genetyczne (szczepy termowrażliwe czy odporne na działanie pewnych związków chemicznych, preparatów biologicznych lub przeciwciał). Stosowane markery były zawsze umiejscowione w obrębie regionu kodującego. Zakładano, iż rekombinacja miała miejsce, jeżeli częstość z jaką infekcja mieszana prowadziła do odtworzenia wirusa o fenotypie typu dzikiego była wyższa jak w infekcji, w której stosowano tylko jeden ze szczepów wirusowych. Dodatkowo obserwowano, że częstość rekombinacji rosła w sposób liniowy wraz ze wzrostem odległości pomiędzy położeniem markerów w genomowych RNA [24-26]. Wynik taki wskazywał, iż rekombinacja zachodzić może z jednakowym prawdopodobieństwem w obrębie całego genomu [27, 28]. Ekstrapolując rezultaty uzyskane dla różnie oddalonych markerów (dystans zmieniał się od ok. kilkuset do ok. trzech tysięcy nukleotydów) obliczono, że w obrębie całego genomu pikornawirusa rekombinacja zachodzić powinna z częstością ok. 10-20%. Wniosek ten nie wydaje się jednak słuszny, gdyż nie stwierdzono, by wyizolowane rekombinanty nosiły ślady wielokrotnych przeskoków rekombinacyjnych, co powinno mieć miejsce przy tak wysokiej częstości rekombinacji. Dodatkową niedogodnością systemu opracowanego dla pikornawirusów jest ulokowanie markerów genetycznych w obrębie sekwencji kodujących. Powoduje to powstanie ciśnienia selekcyjnego bardzo silnie wspomagającego akumulację jedynie takich rekombinantów, w których odtworzona została sekwencja typu dzikiego. Praktycznie system ten umożliwia akumulację jedynie produktów rekombinacji homologicznej. Nie wiadomo zatem co rzeczywiście odzwierciedlają uzyskiwane wyniki: czy mechanizm procesu rekombinacji, czy złożoność procesów selekcyjnych.

III-2. Koronawirusy

Grupę koronawirusów tworzą zarówno wirusy ludzkie jak i zwierzęce [29]. Cechą szczególnie wyróżniającą koronawirusy spośród innych (+) RNA wirusów jest wielkość ich genomu, który stanowi pojedyncza cząsteczka RNA o długości ok. 31 tysięcy nukleotydów. Genom tych drobnoustrojów jest zatem najdłuższą znaną jednoniciową cząsteczką RNA. W jej obrębie występuje zwykle 7-8 genów, z których każdy ulega translacji z odrębnej cząsteczki mRNA. Podobnie jak u innych RNA wirusów za replikację genomu odpowiedzialna jest kodowana przez wirusa specyficzna polimeraza RNA. Pierwszy etap replikacji polega na wytworzeniu nici (−) służącej następnie do syntezy genomowych cząsteczek (+) RNA jak i subgenomowych mRNA. Każdy z syntetyzowanych mRNA posiada identyczny koniec 3′ co oznacza, że sekwencje krótszych mRNA całkowicie zawierają się w dłuższych cząsteczkach. Dodatkowo na końcu 5′ każdego mRNA znajduje się tak zwana sekwencja wiodąca (ang. *leader*) pochodząca z końca 5′ genomowego RNA. W końcowym etapie replikacji w komórce gospodarza pojawiają się również cząsteczki komplementarne do subgenomowych mRNA. One także

http://rcin.org.pl

stanowią matryce w specyficzny sposób rozpoznawane przez wirusowy kompleks replikacyjny. Ten stosunkowo skomplikowany mechanizm replikacji koronawirusów dodatkowo wymagający wprowadzenia sekwencji wiodącej do każdego z subgenomowych mRNA sugeruje, że proces transkrypcji RNA ma charakter nieciągły lub że w jego pierwszym etapie powstają cząsteczki typu pre-mRNA, które następnie ulegają przekształceniu w procesie podobnym do splicingu.

Badania rekombinacji genetycznej koronawirusów prowadzone były w analogiczny sposób jak w przypadku pikornawirusów [30-34]. Umożliwiały zatem obserwację jedynie rekombinacji homologicznej. Posłużono się w nich różnymi szczepami wirusa mysiego zapalenia wątroby (MHV — ang. *mouse hepatitis virus*), z których każdy obarczony był specyficznym markerem genetycznym. Przeprowadzone mieszane infekcje wykazały, iż podobnie jak w przypadku wirusa polio, wraz ze wzrostem odległości pomiędzy stosowanymi markerami zwiększa się częstość rekombinacji. Otrzymane wyniki świadczyły, że w obrębie całego genomu częstość rekombinacji wynosić powinna ok. 25%, a więc podobnie jak dla wirusa polio posiadającego wielokrotnie mniejszy genomowy RNA. Wynik ten wydaje się być bliskim prawdy, co potwierdziła izolacja wirusów potomnych, których genom utworzony został w rezultacie kilkakrotnej rekombinacji (tego typu rekombinantów nie znajdowano podczas badań wirusa polio) [32]. Dodatkowo stwierdzono, że miejsca przeskoków rekombinacyjnych ulokowane były w obrębie całego genomu, zarówno we fragmencie pomiędzy markerami genetycznymi jak i poza nim. Oznacza to, iż rekombinacja zachodziła także w regionach, które nie zostały poddane ciśnieniu selekcyjnemu. Jak dotąd nie udało się jednak ustalić, co jest powodem tak częstej rekombinacji koronawirusów. Wydaje się, że proces ten może być odpowiedzialny za ciągłą naprawę niezwykle długiej jednoniciowej cząsteczki RNA stanowiącej genom wirusa. Pewne obserwacje sugerują nawet, że w przypadku koronawirusów w procesie rekombinacji uczestniczą specyficzne białka odpowiedzialne za lokalizację miejsc przeskoków rekombinacyjnych [35]. Ze względu jednak na dużą złożoność całego systemu, badania koronawirusów nie doprowadziły do uzyskania jednoznacznego obrazu rekombinacji RNA.

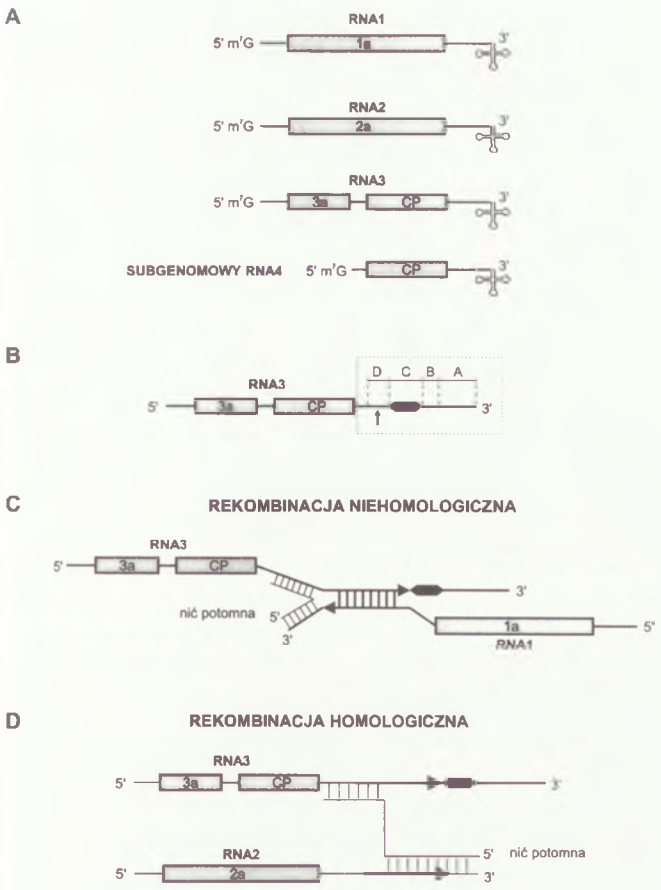
III-3. Karmowirusy

Karmowirusy stanowią grupę wirusów roślinnych, których genom zbudowany jest z pojedynczej nici RNA o polarności mRNA i długości ok. 4 tysięcy nukleotydów [36]. Jednym z przedstawicieli karmowirusów jest wirus kędzierzawki rzepy (TCV — ang. *turnip crinkle virus*). Wirusowi temu towarzyszą bardzo często tzw. satelitarne RNA o zmiennej długości i zróżnicowanej sekwencji. Choć satelitarne RNA nie niosą ze sobą żadnej informacji genetycznej potrzebnej do rozwoju wirusa, ich replikacja jest całkowicie zależna od TCV. Porównanie sekwencji różnych satelitarnych RNA pozwoliło stwierdzić, że niektóre z nich są najprawdopodobniej produktami rekombinacji zachodzącej pomiędzy genomem TCV a innymi satelitarnymi RNA [37]. Przewidywania te potwierdzono eksperymentalnie wykazując, iż podczas infekcji roślin za pomocą TCV i niektórych satelitarnych RNA dochodzi do rekombinacji. Tą drogą otrzymano i scharakteryzowano cząsteczki powstałe w wyniku rekombinacji pomiędzy satelitarnymi RNA [16, 38] oraz pomiędzy genomem TCV a satelitarnymi RNA [39]. W przeciwieństwie do powyżej przedstawionych wniosków dotyczących pikornawirusów i koronawirusów stwierdzono, że w TCV miejsca przeskoków rekombinacyjnych nie są zlokalizowane przypadkowo. Grupują się one w regionach RNA wykazujących znaczne podobieństwo strukturalne do obecnego w genomie TCV promotora transkrypcji sugerując, iż rekombinacja zachodzi podczas syntezy potomnej nici (+) [38]. Produktami rekombinacji są satelitarne RNA a więc cząsteczki nie odgrywające zasadniczej roli w procesie rozwoju wirusa. Stworzony w oparciu o TCV system rekombinacyjny nie znajduje się zatem pod wpływem silnego ciśnienia selekcyjnego. Wydaje się więc, iż uzskane wyniki lepiej odzwierciedlają rzeczywisty mechanizm rekombinacji niż miało to miejsce w przypadku pikornawirusów czy koronawirusów. Trudno jest jednak bezpośrednio porównywać te systemy, jako że oba omawiane wcześniej umożliwiają badanie rekombinacji homologicznej, podczas gdy rekombinację w której uczestniczą genomowe i satelitarne RNA TCV zakwalifikować należy jako niehomologiczną.

VI. Rekombinacja genetyczna bromowirusów

Bromowirusy stanowią pierwszą rodzinę roślinnych (+) RNA wirusów, dla których obserwowano rekombinację genetyczną RNA [15]. Uzyskane wówczas rezultaty dały podstawy do stworzenia systemu biologicznego umożliwiającego dalsze badania rekombinacji. W tym celu posłużono się wirusem mozaiki stokłosy (BMV — ang. *brome mosaic virus*) [9]. BMV jest jednym z najlepiej poznanych (+) RNA wirusów, którego genom stanowią trzy oddzielne cząsteczki RNA zwane RNA1, RNA2, i RNA3 [40]. Dodatkowo w trakcie infekcji wytwarzany jest tzw. subgenomowy RNA4 mający sekwencję identyczną z 3'-końcową częścią RNA3 [40]. Wszystkie RNA posiadają metylowaną resztę guanozynową na końcu 5' oraz prawie identyczny, około 200 nukleotydowy niekodujący koniec 3', którego fragment tworzy tzw. strukturę tRNA-podobną [40] (Ryc. 2A). Cząsteczki RNA1 i RNA2 kodują odpowiednio białka 1a i 2a, które razem z bliżej nieokreślonymi składnikami komórkowymi gospodarza tworzą wirusową replikazę [41]. RNA3 koduje białko płaszcza oraz białko 3a odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się wirusa w zainfekowanym or-

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Schematyczny opis systemów rekombinacyjnych stworzonych w oparciu o BMV.

A). Organizacja genomu BMV. Składa się on z trzech cząsteczek RNA (RNA 1, 2 i 3) kodujących białka 1a, 2a, 3a oraz białko płaszcza (CP). BMV zawiera także tzw. RNA4, który jest subgenomowym RNA mającym sekwencję identyczną z częścią 3′ RNA3. Regiony kodujące genomu oznaczone zostały za pomocą prostokątów a niekodujące za pomocą linii. Wszystkie cząsteczki posiadają 7-metyloguanonozynę (m^7G) na końcu 5′ i prawie identyczny koniec 3′, którego fragment terminalny tworzy tzw. strukturę tRNA podobną.

B) Budowa rekombinacyjnie aktywnego wektorowego RNA3 stosowanego w opisywanym systemie w miejsce wt RNA3. W wektorowym RNA3 zmodyfikowany został jedynie koniec 3′, który podzielić można na cztery regiony A, B, C i D. Region A zawiera 236 nukleotydowy 3′-końcowy fragment zachowawczy we wszystkich czterech genomowych RNA. Część tego fragmentu została zduplikowana — region B (odcinek pomiędzy 7 a 200 nukleotydem licząc od końca 3′). Następnie wprowadzony został 3′-końcowy fragment RNA3 z CCMV — region C (197 nukleotydowy w wektorowych RNA3 stosowanych w rekombinacji niehomologicznej oraz 765 nukleotydowy w wektorowych RNA3 stosowanych w rekombinacji homologicznej; czarny prostokąt). Region D, oznaczony dodatkowo strzałką, zawiera rekombinacyjnie aktywną sekwencję komplementarną do fragmentu niekodującego końca 3′ RNA1 (rekombinacja niehomologiczna) lub homologiczną do fragmentu niekodującego z końca 3′ RNA2 (rekombinacja homologiczna).

C) Proponowany mechanizm niehomologicznej rekombinacji RNA. Do wektorowej cząsteczki RNA3 wprowadzona została 40-141 nukleotydowa sekwencja komplementarna do niekodującego fragmentu pochodzącego z końca 3′ wtRNA1. Stąd cząsteczki RNA1 i RNA3 tworzyć mogą lokalną strukturę dwuniciową (heterodupleks, oznaczony za pomocą strzałek). Jeżeli wirusowa replikaza zapoczątkuje syntezę nici potomnej z końca 3′ RNA1, wówczas w obrębie dwuniciowego fragmentu dojść może do zmiany matrycy z RNA1 na RNA3. W ten sposób utworzony zostaje rekombinat posiadający niezmodyfikowany koniec 3′ z RNA1 i część kodującą oraz koniec 5′ z RNA3.

D) Proponowany mechanizm homologicznej rekombinacji RNA. Do wektorowej cząsteczki RNA3 wprowadzona została 15-60 nukleotydowa sekwencja homologiczna do niekodującego fragmentu pochodzącego z końca 3′ wt RNA2 (obie sekwencje oznaczono za pomocą strzałek). Występowanie lokalnej homologii pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami RNA2 i RNA3 nie pozwala im bezpośrednio ze sobą oddziaływać. Jednakże w obrębie regionów homologicznych nowosyntetyzowana nić potomna jest komplementarna do obu cząsteczek RNA. Jeżeli więc podczas replikacji RNA2 koniec nici potomnej oddysocjuje z cząsteczki matrycowej, może on ulec hybrydyzacji do RNA3 i zostać użyty przez wirusową replikację jako starter do dalszej syntezy RNA. W ten sposób wytworzony zostanie rekombinat posiadający niezmodyfikowany koniec 3′ pochodzący z wt RNA2 oraz część kodującą i koniec 5′ z RNA3.

ganizmie [42]. W białku 1a wyróżnić można dwie domeny: N-terminalną odpowiedzialną za modyfikację końca 5′ w genomowych RNA (tzw. kapowanie — ang. *capping*) oraz C-terminalną posiadającą właściwości helikazy [43]. Centralną część białka 2a stanowi polimeraza RNA zależna od RNA [44, 45], podczas gdy domena N-terminalna odpowiedzialna jest za wiązanie białek 1a-2a w obrębie kompleksu replikacyjnego [46].

Rekombinację pomiędzy genomowymi RNA w BWV zaobserwowano po raz pierwszy, gdy RNA3 posiadający 20 nukleotydową delecję w konserwatywnym końcu 3′ ulegał naprawie w wyniku rekombinacji z RNA1 lub RNA2 podczas infekcji w jęczmieniu (gospodarz systemiczny) [15]. Dalsze modyfikacje niekodującego końca 3′ w RNA3 umożliwiły zwiększenie częstości, z jaką zachodzi rekombinacja [47]. Dodatkowo zmiana gospodarza ze stosowanego wcześniej systemicznego na takiego, w którym wirus wywołuje jedynie infekcje lokalne (*Chenopodium quinoa*) pozwoliła uzyskać w jednej roślinie wiele niezależnie rozwijających się zakażeń (tzw. plamek lokalnych). Każde zakażenie prowadzić może do powstania innego rekombinanta (z reguły jednego, czasem jednak dwóch lub trzech) [47]. W celu ich zidentyfikowania z liści roślin wycinano pojedyncze plamki lokalne i izolowano z nich całkowity RNA. Następnie przy zastosowaniu specyficznych starterów (primerów) namnażano koniec 3′ cząsteczki RNA3 metodą odwrotnej transkrypcji i polimerazowej reakcji łańcuchowej (RT-PCR). Otrzymane produkty RT-PCR analizowano elektroforetycznie w żelu agarozowym, wklonowywano do wektora pUC19 i sekwencjonowano. Dodatkowo dla potwierdzenia, iż rekombinanty RNA zostały rzeczywiście wytworzone w roślinie podczas infekcji, a nie w trakcie RT-PCR, całkowity RNA analizowano metodą Northern-blot. Uzyskano dane wskazywały, że rekombinacja niehomologiczna pomiędzy wirusowymi RNA zachodzi w regionach lokalnej komplementarności pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami [48], podczas gdy homologiczna w rejonach lokalnej homologii [49]. Poczynione obserwacje umożliwiły skonstruowanie cząsteczki RNA nazwanej

http://rcin.org.pl

wektorem rekombinacyjnym (Ryc. 2B) [50]. Do jej stworzenia użyto RNA3, który nie jest konieczny do replikacji wirusowego RNA. W cząsteczce tej zmodyfikowano jedynie niekodujący koniec 3′, tak więc nadal zawierała ona całą informację genetyczną niezbędną do normalnego rozwoju BMV. Dokonane modyfikacje polegały na duplikacji konserwatywnej sekwencji z końca 3′ (Ryc. 2B regiony A i B), po której wprowadzono fragment RNA pochodzący z pokrewnego bromowirusa (wirusa żółtej chlorowatości wspięgi chińskiej CCMV, ang. — *cowpea chlorotic mosaic virus* — Ryc. 2B region C). Zmiany te miały na celu zmniejsze zdolności replikacyjnych cząsteczki RNA3. Tak otrzymany wektorowy RNA3 jest stabilny w trakcie infekcji (tzn. nie rekombinuje), gdy użyć go do inokulacji roślin zamiast RNA3 o sekwencji typu dzikiego (wt RNA3) razem z RNA1 i RNA2 (oba o sekwencji typu dzikiego, odpowiednio wt RNA1 i wt RNA2). Zaczyna on jednak rekombinować, gdy bezpośrednio za fragmentem z CCMV wprowadzona zostanie sekwencja wykazująca aktywność rekombinacyjną (Ryc. 2B region D). Stosując wektorowy RNA3 zidentyfikowano regiony aktywne rekombinacyjnie w BMV i stworzono dwa analogiczne systemy umożliwiające badania molekularne rekombinacji niehomologicznej i homologicznej (Ryc. 2C i D). Pierwszy system nazwany heterodupleksowym powstał przez wprowadzenie do wektorowego RNA3 40-141 nukleotydowej rekombinacyjnie aktywnej sekwencji, komplementarnej do niekodującego fragmentu z końca 3′ RNA1 [50]. Umożliwiło to tworzenie lokalnej dwuniciowej struktury (heterodupleksu) pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami RNA1 i RNA3 w obrębie której dochodziło do przeskoków rekombinacyjnych. Ponieważ miały one miejsce pomiędzy różnymi, choć komplementarnymi sekwencjami, stąd zdefiniowane zostały jako niehomologiczne. Drugi system powstał w wyniku wprowadzenia do cząsteczki wektorowej 15-60 nukleotydowej sekwencji z 3′-końcowego niekodującego fragmentu wt RNA2 [49]. Istnienie homologicznych sekwencji w wektorowym RNA3 (region D) i wt RNA2 powodowało, iż cząsteczki te ulegały rekombinacji. Ponieważ przeskoki rekombinacyjne zachodziły w obrębie identycznych sekwencji, stąd zdefiniowano je jako homologiczne.

Zarówno w systemie umożliwiającym badanie rekombinacji niehomologicznej jak i homologicznej przeskoki rekombinacyjne prowadziły do naprawienia wektorowego RNA3. W obu przypadkach tworzyły się rekombinanty RNA3, w których zmodyfikowany konserwatywny koniec 3′ cząsteczki wektorowej był zastępowany przez wspólny dla wszystkich genomowych RNA 3′-końcowy fragment pochodzący z wt RNA1 (rekombinacja niehomologiczna) lub wt RNA2 (rekombinacja homologiczna). W ten sposób 3′-końcowa sekwencja rekombinanta RNA3 była zbliżona do istniejącej w wt RNA3. Stąd jego zdolność do replikacji gwałtownie rosła w porównaniu z wykazywaną przez rodzicielskie RNA3, powodując wytworzenie silnego ciśnienia selekcyjnego wspierającego akumulację rekombinantów i równocześnie eliminującego rodzicielskie cząsteczki wektorowego RNA3. Zgodnie z zaproponowanym mechanizmem rekombinacji niehomologicznej i homologicznej, RNA1 lub RNA2 będący dawcą niezmutowanego końca 3′ zdefiniowany został jako RNA donorowy, a naprawiany RNA3 jako RNA akceptorowy [9, 18, 49]. Wyznaczona dla najaktywniejszych wektorowych RNA3 częstość rekombinacji niehomologicznej czy homologicznej wynosiła blisko 100% podczas gdy dla innych znanych systemów nie przekraczała z reguły 10%. Określa ona w jakim procencie niezależnie rozwijających się infekcji (plamek lokalnych) dochodzi do wytworzenia rekombinanta RNA3.

W przypadku rekombinacji niehomologicznej zaproponowany mechanizm zakłada, iż rekombinanty tworzą się w trakcie syntezy potomnej nici (−), gdy wirusowa replikaza dociera do dwuniciowego regionu i nie mogąc go rozpleść, przeskakuje z RNA donorowego na akceptorowy (Ryc. 2C) [9, 18]. Inny jest prawdopodobnie molekularny mechanizm rekombinacji homologicznej. Zaangażowane w ten proces cząsteczki RNA2 i RNA3 posiadają sekwencje homologiczne, nie mogą więc oddziaływać ze sobą bezpośrednio. Jednakże w tym przypadku nowosyntetyzowana na donorowym RNA2 nić potomna jest komplementarna do akceptorowego RNA3. Zaproponowano zatem, że do rekombinacji homologicznej dochodzić może gdy w wyniku zatrzymania syntezy nici potomnej na donorowym RNA jej fragment zostanie uwolniony. Jeżeli ma to miejsce w obrębie sekwencji homologicznych, wówczas część nici potomnej może ulec hybrydyzacji do akceptorowego RNA. Następnie fragment ten mógłby służyć wirusowemu kompleksowi replikacyjnemu jako starter do wznowienia syntezy RNA na nowej matrycy (Ryc. 2D) [18, 49].

V. Strukturalne uwarunkowania rekombinacji BMV

V-1. Rekombinacja niehomologiczna

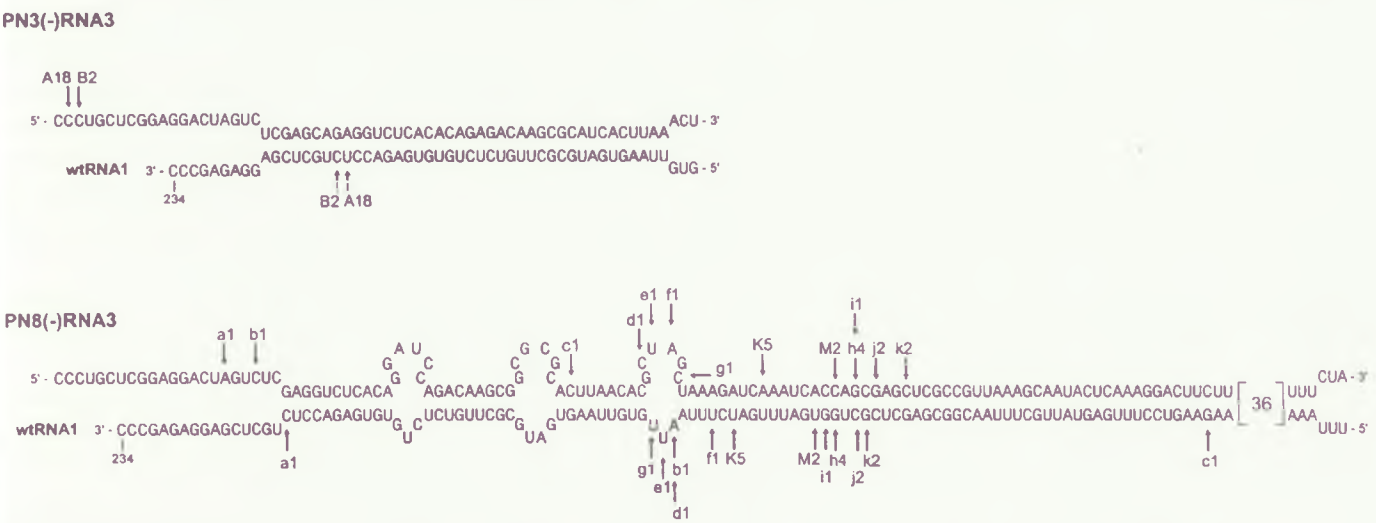
Jak już wspomniano, istnienie lokalnych sekwencji komplementarnych w genomowych cząsteczkach RNA może być czynnikiem indukującym rekombinację niehomologiczną. Przeprowadzone *in vitro* eksperymenty z udziałem BMV potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, iż rekombinujące cząsteczki mogą ze sobą oddziaływać tworząc lokalną strukturę dwuniciową (heterodupleks — Ryc. 3) [9]. Stwierdzono jednak, że nie zawsze istnienie nawet stosunkowo długiego regionu komplementarności jest w stanie wywołać rekombinację [51]. Sugeruje to, iż możliwość tworzenia struktury dwuniciowej przez cząsteczki RNA nie jest bezpośrednią przyczyną występowania przeskoków rekombinacyjnych. Tym niemniej obec-

http://rcin.org.pl

ność sekwencji komplementarnych jest przypuszczalnie konieczna dla zajścia badanego procesu, podczas którego są one najprawdopodobniej odpowiedzialne za zbliżenie rekombinujących molekuł (aby wirusowa replikaza mogła zmienić matrycę podczas syntezy nici potomnej, cząsteczka donorowego RNA musi znaleźć się dostatecznie blisko cząsteczki akceptorowej). Wydaje się zatem, iż obok lokalnej komplementarności istnieć muszą inne elementy zakodowane w strukturze RNA, będące sygnałem do zajścia rekombinacji.

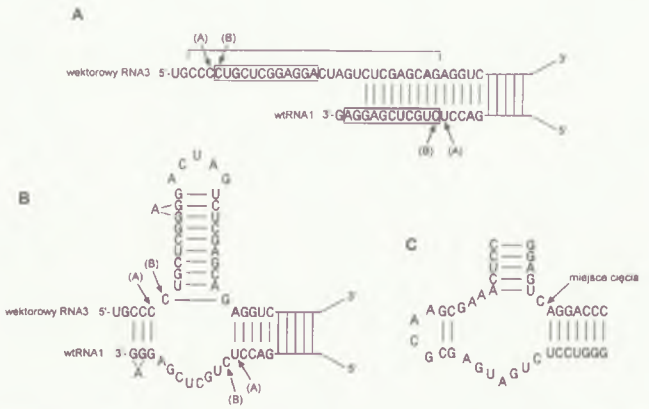
Przeprowadzona analiza położenia miejsc przeskoków rekombinacyjnych potwierdza to przypuszczenie [50, 51]. Wynika z niej bowiem, iż przeskoki częściej mają miejsce za pirymidyną, szczególnie za U. Spośród 174 rekombinantów, których sekwencja została określona, 132 posiadały pirymidynę jako ostatni nukleotyd pochodzący od donora (w tym w 96 przypadkach (55%) była to U). Z 42 przeskoków jakie miały miejsce za resztą purynową 30 zaszło w obrębie sekwencji (AG)n [50, 51]. Dodatkowo obserwowano, że niektóre heterodupleksy tworzone przez rekombinujące cząsteczki RNA powodują powstawanie wielu różnych rekombinantów, podczas gdy inne w bardzo specyficzny sposób prowadzą do powstania tylko dwóch prawie identycznych produktów rekombinacji (Ryc. 3) [50, 51]. Przeprowadzona analiza strukturalna pozwoliła stwierdzić, iż wszystkie heterodupleksy wspierające rekombinację w sposób selektywny posiadają jedną wspólną cechę: jeśli oddziaływania pomiędzy kilkoma pierwszymi parami zasad tworzącymi lokalną strukturę dwuniciową zostaną zaburzone (prawdopodobnie dzieje się tak gdy, wirusowa replikaza zaczyna kopiować fragment RNA1 zaangażowany w tworzenie heteroduplekstu), wówczas zmieniona zostaje drugorzędowa struktura rekombinacyjnych cząsteczek RNA. Część heteroduplekstu ulega rozpleceniu, a w strukturze RNA akceptorowego (modyfikowany RNA3) wytworzona zostaje stabilna struktura szpilki (*hairpin*-Ryc. 4). Jej powstanie sprawia, iż usytuowane na donorowym i akceptorowym RNA miejsca przeskoków rekombinacyjnych ulegają znacznemu zbliżeniu w porównaniu z ich położeniem w dwuniciowej strukturze tworzonej przez rekombinujące cząsteczki RNA 1 i 3. Zablokowanie możliwości tworzenia się struktury szpilkowej w cząsteczce RNA akceptorowego powodowało całkowity zanik specyficzności rekombinacji. Potwierdza to przypuszczenie, iż zmiany strukturalne związane z jej powstaniem mogą być odpowiedzialne za selektywne tworzenie tylko dwóch różnych rekombinantów.

Dalsza analiza rekombinacyjnie aktywnego regionu sugeruje, że co najmniej trzy elementy strukturalne związane z powstaniem szpilki mogą być odpowiedzialne za specyficzność badanego procesu. Po pierwsze stabilna szpilka może pełnić podobną rolę jak terminatory transkrypcji, to znaczy zatrzymywać replikację dając tym samym sygnał do zmiany matrycy. Po drugie, specyficzność rekombinacji powodować mogą sekwencje homologiczne występujące w badanej strukturze (Ryc. 4A). Ich obecność sprawia, że fragment nici potomnej syntetyzowanej na donorowym RNA jest komplementarny do akceptorowego RNA. Zatem gdy synteza nici (−) na donorowym RNA zostanie przerwana, wówczas cząsteczka ta może być użyta jako starter (primer) do wznowienia syntezy na akceptorowym RNA. Po trzecie, aranżacja pierwszo- i drugorzędowej struktury donorowego i akceptorowego RNA (w sytuacji gdy zostaje utworzona struktura szpilkowa) wykazuje olbrzymie podobieństwo do proponowanego modelu rybozymu typu „*hammerhead*"



Ryc. 3. Usytuowanie miejsc przeskoków rekombinacyjnych w obrębie heterodupleksów tworzonych przez wt RNA1 i dwa wybrane wektorowe RNA3 (PN3(-) oraz PN8(-) RNA3). Wektorowy PN3(-) RNA3 tworzy 40 a PN8(-) RNA3 141 nukleotydowy region dwuniciowy z wt RNA1. Zastosowanie PN3(-) RNA3 prowadzi zawsze do powstania jednego z dwóch bardzo podobnych rekombinantów, podczas gdy w przypadku PN8(-) RNA3 powstaje wiele różnych rekombinantów. Miejsca przeskoków rekombinacyjnych uwidoczniono w ten sposób, iż dla danego rekombinanta ostatni nukleotyd pochodzący z donorowego wt RNA1 i pierwszy nukleotyd pochodzący z akceptorowego RNA3 oznaczony został strzałką i taką samą literą. Umieszczone obok liczby wskazują w ilu niezależnie rozwijających się infekcjach lokalnych wytworzony został dany rekombinat. Dużymi literami oznaczono miejsca przeskoków obserwowane przy zastosowaniu różnych pochodnych RNA3.

http://rcin.org.pl

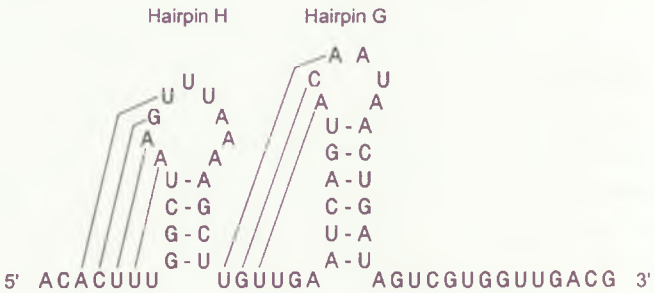


Ryc. 4. Zidetyfikowane elementy strukturalne mogące odpowiadać za specyficzność rekombinacji.
A) Schematyczny opis heteroupleksów tworzonych przez wt RNA1 i wektorowe RNA3, dla których rekombinacja zachodzi w sposób regioselektywny (np. heteroupleksu tworzonego przez wt RNA1 i PN3(-) RNA3 przedstawionego w całości na Ryc. 3A.) Heteroupleksy te posiadają identyczny fragment początkowy, różnią się jednak długością tworzących je sekwencji komplementarnych. Na powyższym rysunku uwidoczniony został wspólny dla wszystkich heteroupleksów region, w obrębie którego dochodzi do przeskoków rekombinacyjnych (miejsca przeskoków oznaczono strzałkami i literami). W ich wyniku powstaje zawsze jeden z dwóch prawie identycznych rekombinatów. W regionie tym wyróżnić można dwa elementy strukturalne mogące odpowiadać za regiospecyficzność rekombinacji. Są nimi sekwencje homologiczne obecne w cząsteczce donorowego i akceptorowego RNA (oznaczone prostokątami) oraz występująca w wektorowym RNA3 sekwencja mogąca tworzyć stabilną strukturę szpilkową (oznaczona poziomą linią).
B) Struktura szpilkowa, która może powstawać podczas replikacji w obrębie heteroupleksu przedstawionego na Ryc. 4A. Jej utworzenie sprawia, iż oddalone od siebie miejsca przeskoków rekombinacyjnych ulegają zbliżeniu.
C) Proponowana drugorzędowa struktura rybozymu typu „*hammerhead*" [52].

[52] (Ryc. 4 B i C). Nie przypuszczamy, aby badany układ wykazywał właściwości katalityczne (nie wszystkie nukleotydy decydujące o wysokiej aktywności katalitycznej rybozymu są zachowane). Nie można jednak wykluczyć, iż jego tworzenie prowadzi czasami do rozerwania cząsteczki RNA co stanowić może bodziec dla zajścia rekombinacji. Wszystkie przytoczone tu spostrzeżenia wyraźnie wskazują, że zarówno sekwencja jak i budowa przestrzenna cząsteczek RNA odgrywa istotną rolę w procesie niehomologicznej rekombinacji RNA.

V-2. Rekombinacja homologiczna

Podobnie jak w przypadku rekombinacji niehomologicznej, wektorowy RNA3 wykorzystany został do testowania aktywności rekombinacyjnej różnych sekwencji pochodzących z wt RNA1 i 2. Przeprowadzone badania pozwoliły zidentyfikować sekwencje rekombinacyjnie aktywne ukazując jednocześnie, iż sama tylko homologia pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami RNA nie jest elementem wystarczającym dla zajścia tego procesu [49, 51]. Celem dokładniejszego określenia strukturalnych uwarunkowań rekombinacji homologicznej, jedną spośród testowanych sekwencji poddano bardziej szczegółowym badaniom. Był to 60 nukleotydowy fragment pochodzący z niekodującego końca 3' wt RNA2 (nazwany sekwencją R). Jej wprowadzenie do wektorowego RNA3 powodowało powstanie i akumulację rekombinantów w ponad 90% niezależnie rozwijających się infekcji. Stosując komputerowe metody modelowania struktury drugorzędowej RNA zaproponowano przypuszczalną budowę sekwencji R. Prawdopodobnie mieści ona w sobie dwie stabilne struktury typu szpilki (oznaczone na rycinie 5 literami G i H). Wstępnie założono, iż istnienie stabilnych struktur szpilkowych spowalnia lub zatrzymuje proces syntezy nici potomnej co stanowić może bezpośredni sygnał dla zajścia rekombinacji. W oparciu o powyższe założenie przeprowadzono selektywną modyfikację sekwencji R starając się stwierdzić, jakie elementy zawarte w jej strukturze są odpowiedzialne za obserwowaną aktywność rekombinacyjną. Badania te wykazały, iż zgodnie z oczekiwaniami częstość rekombinacji jest proporcjonalna do długości rekombinacyjnie aktywnej sekwencji. Skrócenie sekwencji R do 23 nukleotydów powodowało obniżenie częstości rekombinacji z 90 do 50% [49, 51, 53]. Podobnie częstość rekombinacji ulegała obniżeniu, gdy wprowadzane mutacje zmniejszyły stopień homologii pomiędzy sekwencją R a jej odpowiednikiem obecnym w wt RNA2. Ponadto zauważono, że wprowadzenie do sekwencji homologicznych dodatkowego kilkunukleotydowego fragmentu złożonego z A oraz U (np. sekwencji UUAAAA) znacznie zwiększyło częstość nieprecyzyjnej rekombinacji homologicznej [53]. Duplikacja tej sekwencji w obu rekombinujących cząsteczkach jeszcze wyraźniej preferowała występowanie niesymetrycznych przeskoków rekombinacyjnych. Bardzo interesującą obserwację poczyniono, gdy analogiczny eksperyment przeprowadzony został dla fragmentu zawierającego wyłącznie reszty G i C, a więc nukleotydy tworzące silniejsze pary zasad niż A-U. Wprowadzenie do sekwencji rekombinacyjnie aktywnej zmian prowadzących do powstania regionów bogatych w reszty G oraz C powodowało wyraźne zmniejszenie liczby obserwowanych przeskoków re-



Ryc. 5. Przewidywana struktura drugorzędowa rekombinacyjnie aktywnej sekwencji R. Przeprowadzona analiza komputerowa wykazała, iż w obrębie sekwencji R powstawać mogą dwie stabilne struktury typu *hairpin* (oznaczone literami G i H). Dodatkowo obie struktury szpilkowe zaangażowane są w oddziaływania z poprzedzającymi je fragmentami dwuniciowymi RNA tworząc tzw. struktury pseudo-węzłowe.

http://rcin.org.pl

kombinacyjnych (bezpośrednio w obrębie tych regionów praktycznie nie dochodziło do przeskoków rekombinacyjnych) [54]. Dodatkowo wykazano, iż mutacje zmniejszające jak i zwiększające trwałość struktur szpilkowych obecnych w sekwencji R (szpilki G oraz H, Ryc. 5) nie wpływają w istotny sposób na przebieg rekombinacji homologicznej [51]. Wynik taki wydaje się przeczyć przyjętemu wcześniej założeniu, iż niektóre elementy drugorzędowej struktury RNA mogą być czynnikiem indukującym przeskoki rekombinacyjne. Dotychczasowe badania świadczą bowiem, że podstawowym czynnikiem decydującym o przebiegu rekombinacji homologicznej jest pierwszorzędowa struktura RNA.

VI. Podsumowanie

Rekombinacja jest, jak wynika z przedstawionych tu danych, zjawiskiem bardzo powszechnym w świecie (+) RNA wirusów. Poczynione dotychczas obserwacje nie pozwalają jednak stwierdzić w jaki sposób zróżnicowane pod względem pochodzenia jak i wielkości fragmenty RNA wbudowywane są w genom wirusowy. Wydaje się, że rekombinacja RNA zachodzi zgodnie z mechanizmem „*copy choice*", a więc inaczej jak w organizmach, w których nośnikiem informacji genetycznej jest DNA. W przypadku tych ostatnich rekombinacja polega na rozerwaniu genomowych cząsteczek DNA i ich ponownym połączeniu. Mechanizm „*copy choice*" zakłada, iż podczas syntezy genomowej cząsteczki RNA wirusowy kompleks replikacyjny zmienia matrycę. W ten sposób do wytworzenia nici potomnej użyte zostają co najmniej dwie rodzicielskie cząsteczki RNA. Liczne obserwacje świadczą, iż spośród trzech różnych typów rekombinacji najpowszechniejszą jest rekombinacja homologiczna a zdecydowanie najrzadszą niehomologiczna.

Jak dotąd nie udało się jednak jednoznacznie ustalić dlaczego pewne fragmenty RNA charakteryzują się szczególnie dużą aktywnością rekombinacyjną podczas gdy inne są jej całkowicie pozbawione. Na podstawie przedstawionych wcześniej danych dotyczących pikorna-, korona-, karmo- czy bromowirusów sądzić można, że istnieje wiele różnych czynników warunkujących przebieg rekombinacji RNA. Sygnałem do zajścia przeskoku rekombinacyjnego może być pierwszo- lub drugorzędowa struktura RNA czy specyficzne oddziaływania RNA-białko. Rekombinacja może być również indukowana przez oddziaływania pomiędzy białkami, gdy w ich wyniku dochodzi do odpowiedniego zbliżenia cząsteczek RNA. Dodatkowo, jeśli prawdziwym jest pogląd, iż rekombinacja zachodzi zgodnie z mechanizmem „*copy choice*", wówczas także struktura oraz właściwości replikazy decydować powinny o zdolność wirusa do rekombinacji. Tymczasem jeszcze do niedawna brak było jakichkolwiek danych mówiących o udziale białek replikazowych w procesie rekombinacji. Pierwsze tego typu doniesienia pochodzą z ostatnich lat i dotyczą białek kodowanych przez BMV [55, 56]. Wynika z nich, iż oba białka wirusowe tworzące kompleks replikacyjny zaangażowane są w rekombinację. Wykazano bowiem, że mutacja domeny helikazowej białka 1a wpływać może na usytuowanie miejsc niehomologicznych przeskoków rekombinacyjnych [55]. Ponadto zidentyfikowano mutację domeny polimerazowej białka 2a, której obecność całkowicie hamuje rekombinacje niehomologiczną nie wpływając w istotny sposób na częstość rekombinacji homologicznej [56]. Nadal nie wiadomo jednak jaką rolę odgrywają wirusowe białka 1a i 2a w procesie rekombinacji. Jak zatem można sądzić, jeszcze wiele czasu upłynie zanim zdołamy dokładnie poznać i zrozumieć molekularne podstawy rekombinacji genetycznej RNA. Nadal pozostanie więc ona przedmiotem licznych, niezwykle intrygujących badań.

Podziękowanie
Praca finansowana przez: Komitet Badań Naukowych — projekt badawczy nr 6PO4A 027 12, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN oraz National Science Foundation — projekt badawczy nr MCB-9630794.

Artykuł otrzymano 14 kwietnia 1997 r.
Zaakceptowano do druku 18 września 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Holland J J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S (1982) *Science 215*: 1577-1585
2. Steinhauer D A, Holland J J (1986) *J. Virol* **57**: 219-228
3. Makino S, Keck J G, Stohlman S A, Lai M M-C (1986) *J. Virol* **57**: 729-737
4. Strauss J H, Strauss E G (1988) *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 657-683
5. Lai M M-C (1992) *Microbioloical Reviews* **56**: 61-78
6. Huminiecki Ł (1996) *Post. Biochem.* **42**: 14-21
7. Greene A M, Allison R F (1994) *Science* **267**: 1423-1425
8. Saimon A E, Bujarski J J (1994) *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 337-361
9. Bujarski J J, Nagy P D, Flasinski S (1994) *Advances in Virus Research* **43**: 275-302
10. Emini E A, Łeibowitz J, Diamond D C, Bonin J, Wimmer E (1984) *Virology* **137**: 74-85
11. King A M Q, McCahon D, Saunder K, Newman J W I, Slade W R (1985) *Virus Res.* **3**: 373-384
12. Meyers G, Tautz N, Dubovi E J, Thiel H-J (1991) *Virology* **180**: 602-616
13. Khatchikina D, Orlich M, Rott R (1989) *Nature* **340**: 156-157
14. Tolskaya E A, Romanova L A, Blinov V M, Virtorova E G, Sinyakov A N, Kolesnikova M S, Agol V I (1987) *Virology* **161**: 54-61
15. Bujarski J J, Kaesberg P (1986) *Nature* **321**: 528-531
16. Cascone P J, Carpenter C D, Li X H, Simon A E (1990) *EMBO J.* **9**: 1709-1715
17. Palasingam K, Shaklee P N (1992) *J. Virol.* **66**: 2435--2442
18. Bujarski J J, Nagy P D, Figlerowicz M (1995) Proceedings of IVth International Positive Strand RNA Virus Symposium, Utrecht, The Netherlands, May 25-30
19. Kirkegaard K, Baltimore D (1986) *Cell* **47**: 433-443
20. Rueckert R R (1990) W: Fields B M, Knipe D M, Chanock R M, Melnick J L, Roizman B, Shope R E (red) Virology, 2nd ed. Raven Press, New York, str 507-548
21. McCahon D, King A M Q, Roe D A, Slade W R, Newman J W I, Cleary A M (1985) *Virus Res.* **3**: 87-100

http://rcin.org.pl

22. Hirst GK (1962) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**: 303-309
23. Pincus SE, Diamond DC, Emini EA, Wimmer E (1986) *J. Virol.* **57**: 638-646
24. Cooper PD (1968) *Virology* **35**: 584-596
25. Lake JR, Priston AJ, Slade WR (1975) *J. Gen. Virol.* **27**: 355-367
26. McCahon D, Slade WR, Priston AJ, Lake JR (1977) *J. Gen. Virol.* **35**: 555-565
27. Agut H, Kean KM, Bellocq C, Fichot O, Girard M (1987) *J. Virol.* **61**: 1722-1725
28. King AMQ (1988) W: Domingo E, Holland JJ, Ahlquist (red) RNA genetics. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, str 149-165
29. Lai MM-C (1990) *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 303-330
30. Lai MM-C, Baric RS, Maino S, Keck JG, Egbert J, Leibowitz JL, Stohlman SA (1985) *J. Virol* **56**: 449-456
31. Keck JG, Soe LH, Makino S, Stohlman SA, Lai MM-C (1988) *J. Virol.* **62**: 1989-1998
32. Keck JG, Stohlman SA, Soc LH, Makino S, Lai MM-C (1987) *Virology* **156**: 331-341
33. Makino S, Fleming JQ, Keck JG, Stohlman SA, Lai MM-C (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6567-6571
34. Makino S, Keck JG, Stohlman SA, Lai MM-C (1986) *J. Virol.* **57**: 729-737
35. Zhang X, Lai MM-C (1994) *J. Virol.* **68**: 6626-6633
36. Morris TJ, Carrington JC (1988) W: Koenig R (red) The plant viruses, t. 3 Plenum Press, New York, str 73-112
37. Simon AE, Howell SH (1986) *EMBO J.* **5**: 3423-3428
38. Cascone PJ, Haydar TE, Simon AE (1993) *Science* **260**: 801-805
39. Zhang C, Cascone PJ, Simon AE (1991) *Virology* **184**: 791-794
40. Ahlquist P (1992) *Current Opinions in Genetic and Development* **2**: 71-76
41. Quadt R, E. Jaspars M. J (1990) *Virology* **178**: 189-194
42. Allison RF, Thompson C, Ahlquist P (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **87**: 1820-1824
43. Kroner PA, Young BM, Ahlquist P (1990) *J. Virol.* **64**: 6110-6120
44. Traynor P, Young BM, Ahlquist P (1991) *J. Virol.* **65**: 2807-2815
45. Kroner P, Richards D, Traynor P, Ahlquist P (1989) *J. Virol.* **63**: 5302-5309
46. Kao CC, Quadt R, Hershberger RP, Ahlquist P (1992) *J. Virol.* **66**: 6322-6329
47. Bujarski JJ, Nagy PD (1994) *Arch. Virol.* **9**: 231-238
48. Bujarski JJ, Dzianott AM (1991) *J. Virol.* **65**: 4153-4159
49. Nagy PD, Bujarski JJ (1995) *J. Virol.* **69**: 131-140
50. Nagy PD, Bujarski JJ (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90**: 6390-6394
51. Bujarski JJ, Nagy PD, Figlerowicz M. — dane nie opublikowane
52. Tuschl T, Gohlke C, Jovin TM, Westhof E, Eckstein F (1994) *Science* **266**: 785-787
53. Nagy PD, Bujarski JJ (1995) *J. Virol.* **70**: 415-426
54. Nagy PD, Bujarski JJ (1996) przyjęte do druku *J. Virol.*
55. Nagy PD, Dzianott A, Ahlquist P, Bujarski JJ (1995) *J. Virol.* **69**: 2547-2556
56. Figlerowicz M, Nagy PD, Bujarski JJ (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2073-2078

Przypominamy o zmianie numeru konta prenumeraty **POSTĘPÓW BIOCHEMII**
Nowy numer: PBK XIII O/Warszawa, 370044-1225-2720-3-69

Z przyjemnością informujemy, że od stycznia 1997 Redakcja Postępów Biochemii dysponuje własnym numerem poczty komputerowej, e-mail: Postepy @ nencki.gov.pl

Od kwietnia br. w poniedziałki i czwartki odbywać się będą w godz. 14^{00}-16^{00} w siedzibie Zarządu Głównego P.T.Bioch., pokój nr 632, dyżury naszej Redakcji, tel. 659-8571 w. 441.

Adres Redakcji: Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Redakcja Kwartalnika „Postępy Biochemii", ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

http://rcin.org.pl

Bywają tacy lekarze, bywają tacy ogrodnicy i jeszcze setka innych zawodów. Ich praca może być bezustanną przygodą jeśli tylko potrafią w niej dostrzec coraz to nowe wyzwania. Pomimo trudów i porażek ich ciekawość nie stygnie. Z każdego rozwiązanego zagadnienia wyfruwa im rój nowych pytań. Natchnienie, czymkolwiek ono jest, rodzi się z bezustannego nie wiem.

Słowa te wyjęte z noblowskiego przemówienia Wisławy Szymborskiej doskonale obrazują twórcze zafascynowanie wielu badaczy dwufunkcyjnymi właściwościami kwasów rybonukleinowych.

Tektonika RNA

RNA tectonics

MIROSŁAWA Z. BARCISZEWSKA*

Spis treści:

I. **Wprowadzenie**
II. **Transferowe kwasy rybonukleinowe**
III. **Rybosomalny 5S RNA**
IV. **Perspektywy badań RNA**

Contents:

I. **Introduction**
II. **Transfer ribonucleic acids**
III. **Ribosomal 5S RNA**
IV. **RNA perspectives**

Wykaz stosowanych skrótów: tRNA — transferowe kwasy rybonukleinowe; 5S rRNA — rybosomalny 5S kwas rybonukleinowy; DNA — kwas deoksynukleinowy; TMV — wirus mozaiki tytoniu; mRNA — messenger RNA, informacyjny RNA; aa-tRNA — aminoacylo-tRNA; RF-1, 2, 3 — czynniki uwalniające 1, 2, 3; EFG — czynnik elongacyjny G; EF-Tu — czynnik elongacyjny Tu (niestabilny); NMR — magnetyczny rezonans jądrowy; Y — α(karboksyamino)-4,9-dihydro-4,6-dimetylo-9-okso-1H-imidazolo[1,2-a]-puryno-7-dimetylowy ester kwasu butanowego; ψ — pseudourydyna; Q — 7-(4,5-cis-dihydroksy-1-cyklopenten-3-yl-aminometylo)-7-deazaguanozyna.

I. Wprowadzenie

Każdy etap w badaniach biochemicznych charakteryzuje się własnym poziomem doświadczalnym. Na początku wieku wystarczyło opisać właściwości ekstraktu, później oczyszczanie i wydzielanie jego składników stosując proste metody selektywnego wytrącania, z czasem bardzo zaawansowane techniki chromatograficznego rozdziału. Na każdym etapie pytano o właściwości przebiegu procesów i ich fizjologiczne znaczenie. Wraz z rozwojem metod analizy makrocząsteczek można było wyznaczyć ich budowę pierwszorzędową (sekwencję nukleotydów lub aminokwasów), zrozumieć zależności ewolucyjne, a także analizować strukturę przestrzenną.

Dziś wiemy, że bez poprawnego opisania struktury przestrzennej makromolekuł i ich kompleksów nie można zrozumieć, jak działają i jakie mają one fizjologiczne znaczenie. W związku z tym współpraca biochemików z badaczami określającymi struktury przestrzenne doprowadziła do wyodrębnienia się dyscypliny nazywanej biologią strukturalną. W wielu przypadkach współpraca taka przyniosła już znaczące osiągnięcia.

Jeden z podstawowych problemów biologii molekularnej dotyczy mechanizmu oddziaływania kwasów nukleinowych i białek. Można tutaj powtórzyć za F. Crickiem, że „bez zrozumienia molekuł możemy mieć jedynie dalekie pojęcie o samym życiu. Wszystkie koncepcje wyższego poziomu są niepewne, dopóki się ich nie potwierdzi na poziomie molekularnym" [1]. W obecnej rzeczywistości laboratoryjnej badania cząsteczek biologicznych coraz częściej rozpoczyna się od analizy ich struktury [2]. Pozwala to zrozumieć: właściwości biocząsteczek oraz specyficzności ich wiązania i katalizy (chemia), właściwości spektralnych i elektronowych (fizyka), roli w procesach fizjologicznych komórki (biologia i medycyna).

W przypadku kwasów rybonukleinowych (RNA), o których będzie mowa w tym artykule, trzeba na wstępie przypomnieć, że cząsteczki te w przeciwieńst-

* Prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

http://rcin.org.pl

wie do DNA i białek są „dwufunkcyjne" [3]. Są one nośnikami informacji, podobnie jak DNA, a także charakteryzują się właściwościami katalitycznymi (rybozymy), co upodabnia je do białek [4].

Jeżeli do tego dodamy zdolność RNA do tworzenia struktur przypominających budową inne makromolekuły (mimikra) [5] i zdolność tworzenia izomerów optycznych, dostrzeżemy bogactwo możliwości funkcyjnych RNA, wynikających ze zróżnicowania budowy ich struktur wyższego rzędu (mozaika).

Jeden z liderów w dziedzinie badań kwasów nukleinowych, Ignacio Tinoco Jr. z Uniwersytetu Kalifornijskiego w Berkeley, obserwując wielorakie zależności między strukturą i funkcją kwasów rybonukleinowych powiedział, że RNA *może zrobić co zechce* [6]. Tę myśl odzwierciedla tytuł artykułu.

W pierwszej z trzech części przedstawię wnioski, wynikające z badań własnych, dotyczących tRNA, w drugiej przedyskutuję niektóre zagadnienia struktury 5S rRNA i jego oddziaływań z białkami, a na zakończenie zarysuję perspektywy dalszych badań struktury i właściwości RNA. Dodajmy, że znajomość elementów budowy i reguł tworzenia makrocząsteczek może stać się podstawą do projektowania i konstruowania nowych ich form [7].

II. Transferowe kwasy rybonukleinowe

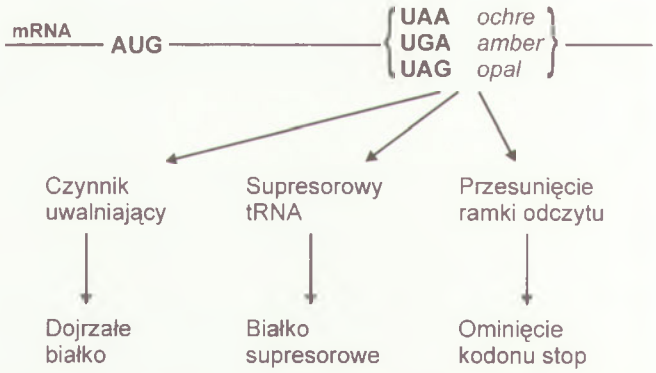
Cząsteczki transferowych RNA ze względu na swoją wielkość, określone funkcje oraz znaną strukturę krystaliczną stanowią najlepiej poznany na poziomie molekularnym biologiczny przedmiot badawczy [8]. Dla każdego biochemika jest dzisiaj oczywiste, że bez wiedzy o tRNA nie można zrozumieć ani struktury, ani działania kwasów rybonukleinowych, w tym również tak popularnych ostatnio rybozymów [9, 10]. Jest kilka przyczyn tej sytuacji:

— tRNA wyróżniają się najprostszą budową spośród makrocząsteczek kwasów nukleinowych (76 nukleotydów, M.cz. 25000D, zachowawczość struktury pierwszorzędowej),

— znane są różnorodne metody badania ich struktury (metody chemiczne, enzymatyczne, krystalograficzne i NMR),

— spełniają różne funkcje w czasie syntezy białka [11].

W odróżnieniu od innych kwasów rybonukleinowych, tRNA uważane są powszechnie za cząsteczki bardzo stabilne. Przyczyną tego jest ich szczególna budowa [12]. Charakteryzują się one bowiem regularną strukturą zwaną helisą typu A, brakiem wybrzuszeń i pętli wewnętrznych z wyjątkiem antykodonu [8]. Te cechy kwasów rybonukleinowych uważa się powszechnie za decydujące o swoistości mechanizmu rozpoznawania przez nie białek [13, 14]. Warto tutaj przypomnieć, że oddziaływanie białek z DNA odbywa się głównie w dużej bruździe, gdzie spirala α białek swoiście rozpoznaje kwas nukleinowy [15].

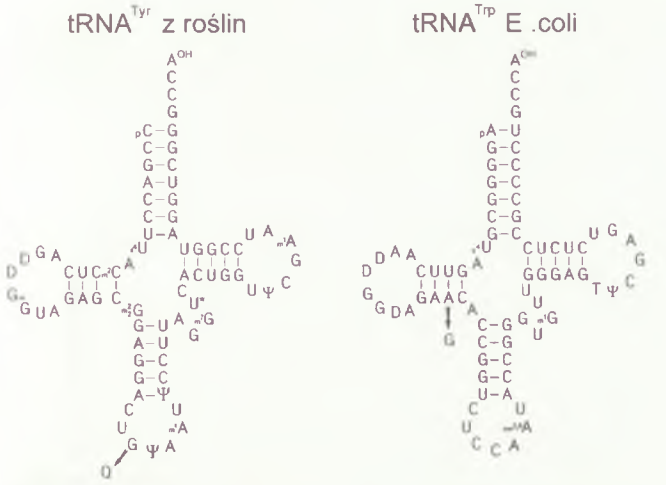


Ryc. 1. Procesy biologiczne jakie mogą zachodzić podczas oddziaływań kodonów terminujących z rybosomami w toku biosyntezy białka.

Subtelne zmiany w strukturze trzeciorzędowej cząsteczek tRNA można prześledzić na przykładzie oddziaływań kodon-antykodon. Rybosom przesuwając się po mRNA i odczytując informacje zakodowane w swoiście ułożonych trójnukleotydach natrafia na kodony terminujące (Ryc. 1). W tym miejscu mogą zachodzić 3 procesy: zakończenie syntezy białka i uwolnienie peptydu z rybosomu, przesunięcie ramki odczytu albo kontynuacja syntezy białka w wyniku sensownego rozpoznania kodonu terminującego przez tRNA. W połowie lat 80 okazało się, że u Eukaryota niektóre komórkowe tRNA (supresorowe tRNA) rozpoznają kodony terminujące UAG (*amber*), UAA (*ochre*) czy UGA (*opal*) [16, 17]. Powodują one, że w miejscu kodonu *stop* do powstającego peptydu włączany jest aminokwas i synteza łańcucha peptydowego jest kontynuowana dalej. Tworzy się w ten sposób białko supresorowe nazywane też białkiem dalszego odczytu [18, 19]. Zjawisko syntezy białek dalszego odczytu potwierdzono w komórkach roślinnych. Wykazano np. że w liściach tytoniu po infekcji wirusem mozaiki tytoniu (TMV) powstaje białko o masie cząsteczkowej 183 kDa [20]. W badaniach tego procesu wykorzystuje się mRNA kodujący znane białko wirusowe (mRNA zawiera kodon UAG, *amber*). W wyniku supresji tego kodonu kontynuowana jest synteza białka supresorowego, które w praktyce laboratoryjnej obserwujemy jako nowy prążek w żelu polikaryloamidowym. Stosując powyższy test i wykorzystując chromatograficznie oczyszczone tRNA wykazaliśmy, że supresję kodonu *amber* powodują między innymi roślinne $tRNA^{Tyr}$ z tytoniu [18], łubinu [19] i pszenicy [20] z antykodonem GΨA (Ryc. 2). Okazało się także, że drugi znajdujący się w roślinach izoakceptor $tRNA^{Tyr}$ z antykodonem QΨA, nie rozpoznaje kodonu UAG. Ponieważ te dwa $tRNA^{Tyr}$ różnią się tylko jednym nukleozydem, można to uznać za przyczynę ich różnych właściwości kodujących [21]. Nukleozyd Q jest swoiście zmodyfikowaną guanozyną występującą w tRNA specyficznych dla asparaginy, kwasu asparaginowego, histydyny i tyrozyny. W tRNA występuje ponad 95 zmodyfikowanych nukleozydów [22].

Analiza struktury nukleozydu Q wskazuje na przy-

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Struktura drugorzędowa tyrozynowych tRNA roślinnych, z antykodonem GΨA oraz QΨA oraz tRNA^{Trp}*E. coli*. Guanozyna może być zastąpiona nukleozydem Q w tRNA^{Tyr}, a adenozyna 23 guanozyną w tRNA^{Trp}.

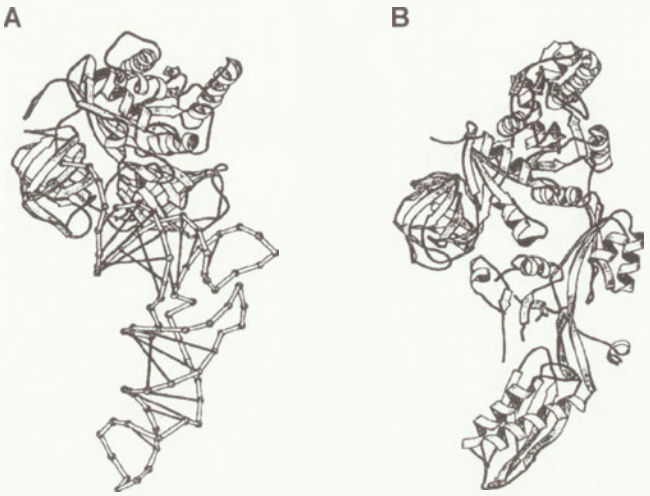
czyny natury stereochemicznej uniemożliwiające oddziaływania antykodonu i kodonu terminującego UAG. Należy jednak pamiętać, że oba izoakceptorowe tRNA^{Tyr} mające antykodony GΨA lub QΨA rozpoznają dwa kodony tyrozynowe UAC i UAU, podczas rybosomalnej syntezy białka.

Z tych doświadczeń wynikało, że nukleotydy w antykodonie tRNA decydują o swoistości oddziaływania kodon-antykodon, a obecność zmodyfikowanych nukleozydów w tRNA wpływa na specyficzność rozpoznawania informacyjnego RNA. Okazało się jednak, że mutant tRNA^{Trp} z *E. coli* (Ryc. 2) zawierający G23, w przeciwieństwie do dzikiego tRNA^{Trp} (A23), jest supresorem kodonu terminującego *opal* (UGA) [23]. Oznacza to, że o właściwościach supresorowych decydują nie tylko nukleozydy w pętli antykodonu, zatem oddziaływania dalekiego zasięgu mają znaczący udział w procesie dekodowania mRNA [23].

Wydaje się, że zmienność konformacji jest dość powszechną właściwością tRNA. Przypomnę tutaj, że np. usunięcie zasady Y, znajdującej się w antykodonie drożdżowego tRNA^{Phe}, powoduje zmianę reaktywności (względem chloroacetaldehydu), cytozyny 60 znajdującej się w pętli rybotymidyny [24]. Jest zatem oczywiste, że determinantów swoistości oddziaływania kodon-tRNA należy poszukiwać również poza regionem antykodonu cząsteczki tRNA.

Stwierdzono, że swoiste tRNA leucynowe i glutaminowe z wątroby ssaków wykazują także właściwości supresji kodonu *amber* [25]. W związku z tym określiliśmy sekwencję sześciu izoakceptorów tRNA^{Leu} z łubinu, z których żaden nie wykazywał własności supresorowych. Porównanie ich struktur pierwszorzędowych z innymi eukariotycznymi tRNA^{Leu} umożliwiło stwierdzenie, że aktywne i nieaktywne w supresji izoakceptorowe tRNA, różnią się strukturą ramienia i pętli antykodonu [26]. Dotyczyło to obecności pary G-C w centralnej pozycji ramienia antykodonu oraz dwóch zmodyfikowanych nukleozydów w pętli antykodonu (z wyjątkiem inozyny i guanozyny) [26].

Wykorzystując te wyniki udało się przewidzieć i potwierdzić, że tRNA$_3^{Gln}$ z łubinu, spełniający powyższe warunki strukturalne, ma właściwości supresorowe. Wynika z tego wniosek, że wspomniane cechy sekwencji nukleotydowej warunkują indukcję swoistej konformacji (struktury) tRNA, która umożliwia dekodowanie kodonu UAG w mRNA. Mając metodę oceny aktywności oraz technikę analizy sekwencji nukleotydowej tRNA, można precyzyjnie określać elementy struktury pierwszorzędowej innych supresorowych tRNA.

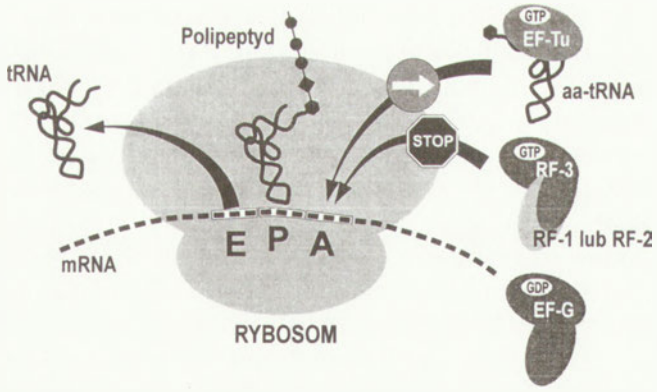


Ryc. 3. Struktury krystaliczne kompleksu trójskładnikowego EF-Tu:GTP-AA-tRNA (A) oraz czynnika elongacyjnego EF-G-GDP (27) (B). Widoczne jest wyraźne podobieństwo strukturalne fragmentu antykodonu tRNA oraz jednej z domen białka G (29).

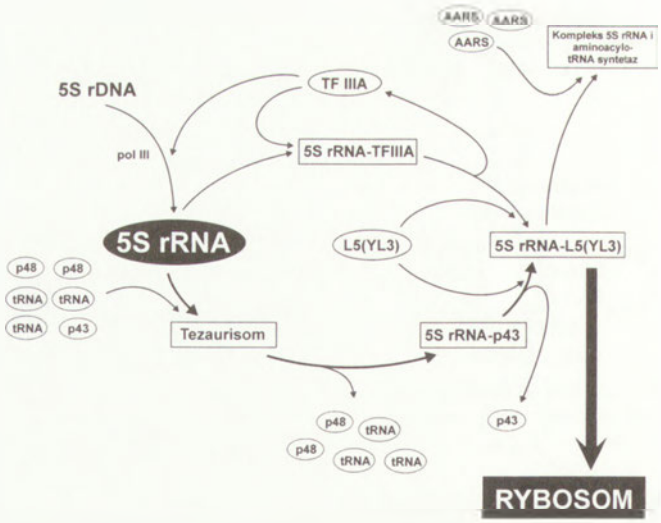
Potwierdzeniem tej koncepcji była (wykonana niezależnie przez trzy grupy badawcze) analiza struktury kryształu kompleksu trójskładnikowego czynnika elongacyjnego EF-Tu (EF-Tu-GTP-AA-tRNA) oraz kompleksu białka elongacyjnego EF-G-GDP [27-29]. Uderzające podobieństwo struktur RNA i białka stało się podstawą do wysunięcia koncepcji mimikry molekularnej (Ryc. 3) tłumaczącej zdarzenia zachodzące na rybosomie [30-32]. O tym jaki proces będzie przebiegał na rybosomie, mogą decydować niewielkie zmiany struktury zarówno kwasów nukleinowych jak i białek (Ryc. 4). Oczywiste jest, że czynniki uwalniające (RF) mające bardzo podobną strukturę tRNA, mogą go zastąpić w rybosomalnym miejscu A i rozpoznać kodon „*stop*".

Warto w tym kontekście przypomnieć zaobserwowaną niedawno prawidłowość wskazującą na różnorodność struktury wolnych aminoacylowanych tRNA oraz ich identyczność w kompleksie z EF-Tu:GTP („*Variety before and unity after*"). Hipoteza ta mówi, że różnice w budowie przestrzennej bardzo podobnych cząsteczek tRNA istotne dla ich specyficzności, „znikają" po utworzeniu kompleksu trójskładnikowego [33]. Następuje także izomeryzacja niestabilnego wiązania estrowego do ortoestrowego [34]. O identyczności struktur tRNA w kompleksie z EF-Tu:GTP świadczą

http://rcin.org.pl



Ryc. 4. Mimikra molekularna w biosyntezie białka. Dwa białka: czynnik elongacyjny EFG:GDP oraz czynniki uwalniające RF-1 (RF-2) GTP mające bardzo podobną strukturę mogą w określonych warunkach wiązać się w miejscu rybosomalnym A, którego funkcją jest wiązanie aminoacylo-tRNA (69). Strzałka oznacza kierunek przesuwania rybosomów. Stop oznacza zatrzymanie syntezy białka po zajęciu miejsca A przez czynnik uwalniający.



Ryc. 5. Aktywności (właściwości) rybosomalnego 5S RNA, podstawowego składnika rybosomów. Gen 5S rRNA ulega transkrypcji w obecności polimerazy III oraz czynnika transkrypcyjnego TF IIIA. Cząsteczka 5S rRNA tworzy kompleksy z szeregiem białek TF IIIA, p48, p43, AARS i tRNA oraz z białkami L5 lub YL3, które są prekursorami rybosomów.

m.in. pomiary fluorescencji oraz chemicznej modyfikacji tRNA w stanie wolnym oraz w kompleksie trójskładnikowym [8].

Dla pełnego zrozumienia zmian konformacyjnych tRNA równolegle prowadziliśmy badania mechanizmu rozpoznawania kodon-antykodon na przykładzie glicynowych tRNA z *E. coli*. Okazało się, że $tRNA_1^{Gly}$ z antykodonem UCC rozpoznaje dwa kodony glicyny GGA i GGG, ale nie czyta dwóch innych kodonów GGU i GGC właściwych dla tego aminokwasu. Natomiast $tRNA^{Gly}$ z *Mycoplazma* z antykodonem UCC rozpoznaje wszystkie cztery kodony. Dokładna analiza sekwencji nukleotydowych tych tRNA wykazała, że tylko nukleozyd w pozycji 32 decyduje o takim właśnie sposobie kodowania. Urydyna w tej pozycji w pętli antykodonu $tRNA^{Gly}$ powoduje różnicowanie kodonów, natomiast $tRNA^{Gly}$ z cytozyną w pozycji 32 rozpoznaje wszystkie cztery kodony. Mechanizm tego swoistego oddziaływania kodon-antykodon nie jest do końca jasny. Można go tłumaczyć możliwością tworzenia dodatkowej pary zasad U(32)-A(38) w pętli antykodonu, zmianą konformacji fragmentu antykodonu lub kinetyką oddziaływania tRNA — mRNA [35-37].

Powyższe rozważania skłaniają do przyjęcia dwóch wniosków ogólnych:

— Dynamiczność struktury RNA zapewnia możliwość regulacji różnych procesów fizjologicznych.

— Aktualna struktura (konformacja) cząsteczki tRNA zależy od jej otoczenia. Inna będzie podczas oddziaływania np. z białkiem *tat* bogatym w argininę, inna podczas wiązania syntetaz aminoacylo-tRNA, a jeszcze inna w kompleksie z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu.

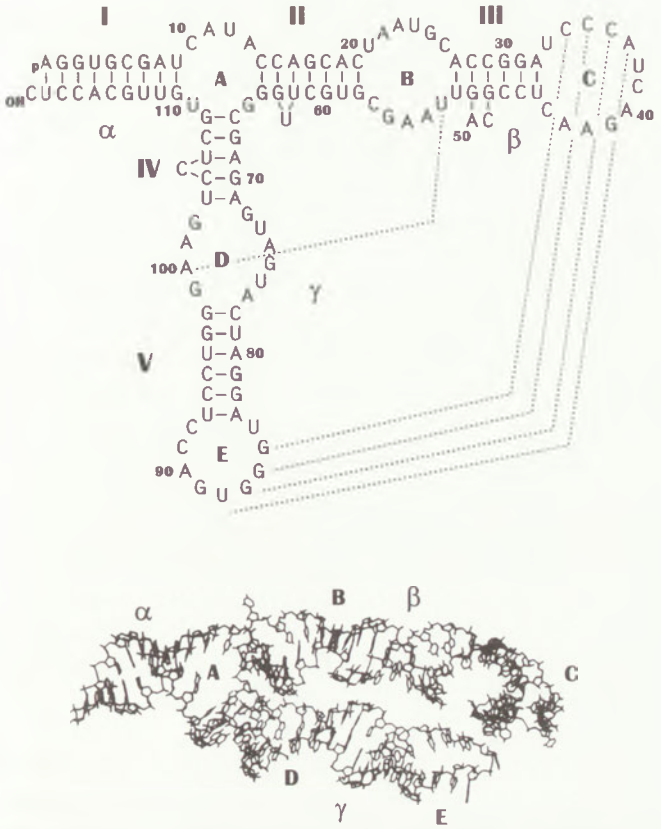
III. Rybosomalne 5S RNA

5S rRNA budzi duże zainteresowanie badaczy ze względu na niewielką masę oraz znaną funkcję biologiczną. Jest to zrozumiałe, ponieważ 5S rRNA (M.cz. 40 KDa) obok tRNA (M.cz. 25 KDa), należy do najmniejszych kwasów rybonukleinowych występujących w przyrodzie [38]. Nasza wiedza o 5S rRNA jest jednak znacznie uboższa niż tRNA, których różne funkcje, właściwości i struktury krystaliczne wolnych kwasów oraz kilku ich kompleksów z syntetazami aminoacylo-tRNA są znane. Innym powodem zainteresowania 5S rRNA były coraz liczniejsze obserwacje katalitycznych właściwości RNA, co doprowadziło do sformułowania hipotezy „świata RNA", który w ewolucji poprzedzał „świat DNA i białek", w którym żyjemy [39]. Cząsteczki 5S rRNA oraz białka z nimi oddziałujące stanowią dobry model w badaniach specyficzności biocząsteczek i być może w dalszej perspektywie „kodu RNA-białko", podobnie jak się to czyni w przypadku DNA i białek [40, 41].

Cząsteczka 5S rRNA [42] jest składnikiem rybosomu (Ryc. 5), ale nie tylko. Tworzy ona kompleksy z białkami, których funkcja nie jest do końca znana. Znaleziono kompleksy 5S rRNA z syntetazami aminoacylo-tRNA, czynnikiem elongacyjnym, białkami rybosomalnymi a także czynnikiem transkrypcyjnym TFIIIA [38].

Obiektem naszych zainteresowań były roślinne 5S rRNA, o których wiedza jest znacznie mniejsza niż w przypadku bakteryjnych 5S rRNA. Większość eksperymentów dotyczyła 5S rRNA z łubinu i pszenicy. Szerokie spektrum badań, od teoretycznych analiz sekwencji nukleotydowych, poprzez metody chemiczne i biochemiczne aż do NMR i kalorymetrii, pozwoliły na zaproponowanie struktury III rzędowej 5S rRNA z łubinu [38, 43] (Ryc. 6). Na schemacie struktury drugorzędowej widać pętle wewnętrzne, wybrzuszenia i szpilki.

http://rcin.org.pl



Ryc. 6. Struktura drugorzędowa oraz przestrzenna roślinnych 5S rRNA. Równoległe ułożenie helis β i γ umożliwia oddziaływanie pętli C i E z utworzeniem wiązań wodorowych.

Elementy te stanowią nie tylko miejsca potencjalnych oddziaływań z białkami, ale są też źródłem różnorodności konformacyjnej tej cząsteczki [38]. Chcę jeszcze zwrócić uwagę na dwie cechy struktury tego RNA: równoległe ułożenie helis RNA oraz możliwość równoległych wiązań wodorowych w 5S rRNA [43]. Potwierdzeniem obecności takich równoległych wiązań wodorowych w 5S rRNA jest struktura kryształu tRNA [8], w którym łańcuch oligonukleotydowy w pętlach dwuhydrourydyny oraz rybotymidyny biegnie również równolegle [44]. Podobne ułożenie odcinków dwuniciowych (helis) RNA w strukturze rybozymu typu „*hammerhead*" potwierdza hipotezę o przebiegu łańcucha w cząsteczce 5S rRNA proponowaną w naszym laboratorium [45-48].

W ubiegłym roku poznano strukturę fragmentu innego rybozymu IVS znalezionego w sekwencji wtrąconej rybosomalnego 23 S rRNA *Tetrahymena*. Taki RNA o długości 160 nukleotydów, stanowiący fragment rybozymu IVS, krystalizuje w postaci dwóch równolegle ułożonych helis, ściśle z sobą oddziałujących. W strukturze tej wykryto nieznany typ oddziaływań między nukleotydami w helisie oraz w pętli [49, 50]. Na ile model struktury trzeciorzędowej 5S rRNA jest poprawny okaże się najprawdopodobniej dopiero po poznaniu struktury kryształów tego RNA [51-53].

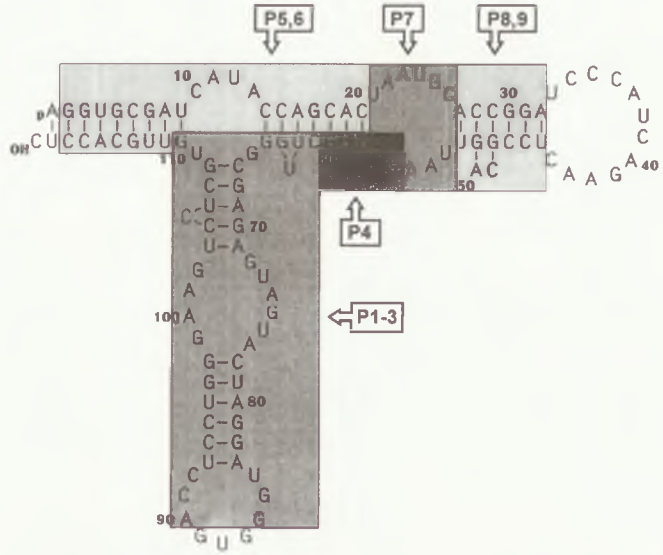
W tym kontekście chcę zwrócić uwagę na problemy związane z określaniem struktury przestrzennej RNA w roztworze i krysztale. Dotychczas poznano struktury kryształów wielu różnych RNA. W przypadku niektórych oligorybonukleotydów wnioski pochodzące z analiz rentgenostrukturalnej i NMR są różne. Oznacza to, że nie wiadomo dokładnie czy RNA ma budowę helisy czy szpilki [54, 55]. Ponadto struktura krystaliczna rybozymów nie tłumaczy dokładnie mechanizmu reakcji hydrolizy RNA w obecności jonów metali dwuwartościowych [47]. Można przypuszczać, że te różnice spowodowane są dynamiką struktury RNA.

Na początku tego rozdziału podkreśliłam, że 5S rRNA oprócz podstawowej funkcji składnika rybosomu, tworzy kompleksy z różnymi białkami [38]. Jednym z nich jest czynnik transkrypcyjny IIIA (TF IIIA), białko o szczególnej strukturze i rzadkich właściwościach [56-58]. Czynnik transkrypcyjny IIIA (TF IIIA) wiąże 5S rRNA ze stałą wiązania 10^{-9}M inicjując jego transkrypcję. Ponadto tworzy on kompleks z 5S rRNA o podobnej stałej asocjacji. Znając budowę asocjatów 5S rRNA-TF IIIA i 5S rDNA-TF IIIA mamy szansę nie tylko poznać swoistość RNA, ale także wnioskować o mechanizmach tych reakcji, również dlatego, że parametry struktury DNA (forma B) i RNA (forma A) są zasadniczo różne [59].

Białko TF IIIA, rozpoznające obie formy kwasów nukleinowych, okazało się ważnym narzędziem w badaniach strukturalnych. Sekwencja cDNA TF IIIA charakteryzuje się prawidłowością występowania reszt cysteiny i histydyny [56, 57]. Ponieważ ich aranżacja sugerowała możliwość wiązania jonów metali, powstała hipoteza struktury „palca cynkowego", która po kilku latach została pozytywnie zweryfikowana [58]. TF IIIA zawiera 9 domen cynkowych złożonych z 30 aminokwasów, w tym dwie reszty cysteiny i dwie histydyny wiążące 1 jon cynku. Struktura krystaliczna peptydów zawierających palce cynkowe w kompleksach z DNA ujawniła swoistość oddziaływań niektórych aminokwasów z zasadami np. argininy z guaniną czy asparaginy z adeniną [56-58]. Dotychczas nie wiadomo wiele o znaczeniu domen cynkowych *in vivo*, ale ze względu na powszechność ich występowania w różnych białkach np. onkogennych, zagadnienie jest niezmiernie istotne. Dla przykładu można wymienić zawierające palec cynkowy białko będące produktem genu powodującego raka piersi (BRCA1).

Prowadząc badania mechanizmu oddziaływania 5S rRNA i TF IIIA z roślin należało wyodrębnić i scharakteryzować obie cząsteczki z tego samego źródła oraz wykazać zdolność tworzenia swoistego kompleksu między nimi. Okazało się, że 5S rRNA z łubinu tworzy również kompleks z białkiem TF IIIA *Xenopus laevis* [60]. Obserwacja ta jest dlatego tak istotna, ponieważ w przypadku homologicznego 5S rRNA *Xenopus*, tworzącego również kompleks 7S, proponowano inny model struktury przestrzennej (kształt litery Y) bez oddziaływań III rzędowych [59]. Wykazanie, że niektóre fragmenty TF IIIA (palce cynkowe 4 i 6) wiążą się z 5S rRNA w taki sposób, że ramiona II i V znajdują się

http://rcin.org.pl



Ryc. 7. Oddziaływania peptydów zawierających różne palce cynkowe z 5S rRNA roślin. Poszczególne palce cynkowe (np. P5,6) o różnym stopniu zaczernienia wskazują miejsce oddziaływania z 5S rRNA.

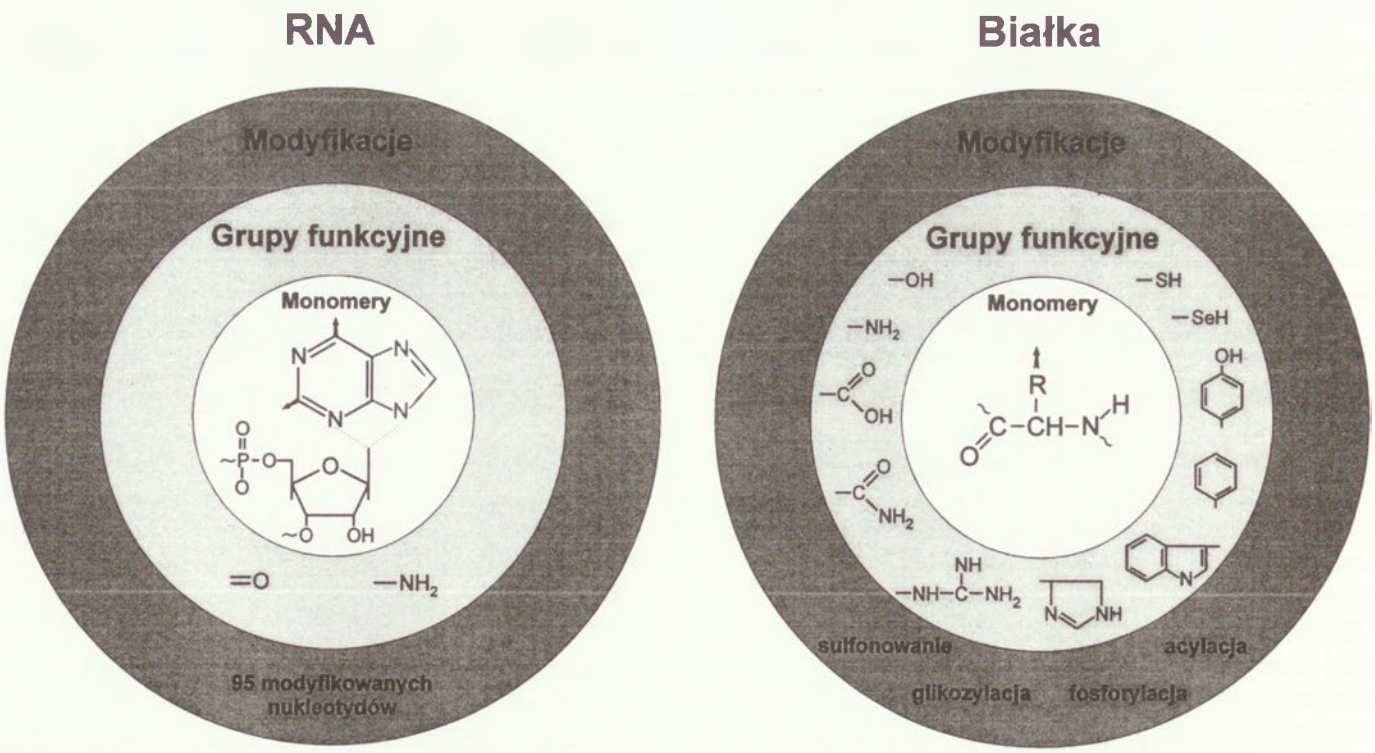
w bezpośrednim sąsiedztwie, czyli domeny β i γ ułożone są równolegle [61] jest pośrednim dowodem na inną budowę 5S rRNA *Xenopus*. Bardzo silnym poparciem takiej struktury 5S rRNA (Ryc. 6) jest poznana ostatnio struktura kryształu fragmentu rybozymu IVS z 23S rRNA. Pokazano wyraźnie równoległe ułożenie domen i możliwości tworzenia wiązań wodorowych między nimi [49, 50].

Jest wiele sposobów analizy udziału poszczególnych palców cynkowych w oddziaływaniach RNA. W naszych badaniach wykorzystaliśmy peptydy zawierające różną liczbę palców cynkowych. Dłuższe fragmenty otrzymano metodami inżynierii genetycznej [62] a krótsze zawierające do 60 aminokwasów na drodze syntezy chemicznej [63]. Badanie tych oddziaływań polega na tworzeniu kompleksów odpowiednich peptydów z 5S rRNA a następnie analizie ich topografii przy pomocy enzymów lub odczynników chemicznych. Peptyd zawierający na przykład trzy palce cynkowe (90 aminokwasów) oddziaływuje z 5S rRNA głównie domeną γ (Ryc. 7). Postępując w podobny sposób z kilkoma peptydami, otrzymaliśmy informacje o udziale fragmentów białka i 5S rRNA w tworzeniu kompleksów co widać na rycinie (Ryc. 7). Ich układ pozwala na przyjęcie z dużym prawdopodobieństwem hipotezy o addytywności domen peptydowych w swoistych oddziaływaniach białka. Nie jest ona całkowicie poprawna w odniesieniu do RNA. Wiadomo, że struktura przestrzenna peptydów jest ściśle uformowana w przeciwieństwie do struktury RNA, która jest raczej luźna [64]. Ma to swoje źródło w strukturze chemicznej 21 aminokwasów i „tylko" 4 nukleozydów oraz ich wzajemnych oddziaływaniach (Ryc. 8).

Schematycznie przedstawiona budowa peptydów i kwasów nukleinowych, wskazuje na małą ilość grup funkcyjnych w tych ostatnich, co sugeruje podatność cząsteczek RNA do występowania w różnorodnych konformacjach wyraźnie zależnych od otoczenia i środowiska, w którym cząsteczka się znajduje.

IV. Perspektywy badań RNA

Kilka lat temu do analizy dużych, złożonych populacji cząsteczek RNA, wykazujących aktywność en-



Ryc. 8. Schemat budowy i oddziaływań monomerycznych składników kwasów nukleinowych i białek. Koncentryczne koła o różnym zaczernieniu wskazują na różnice reaktywności tych cząsteczek.

http://rcin.org.pl

zymatyczną, zaproponowano nową technikę nazywaną „genetyką *in vitro*" [65]. Podstawą jej są dwie obserwacje: że RNA może bezpośrednio wykazywać fenotyp, oraz że dostępne są efektywne systemy replikacji RNA *in vitro*. Fenotyp obserwowany na poziomie cząsteczki RNA może wiązać się z jej zdolnością do tworzenia kompleksów z innymi cząsteczkami, a także z właściwościami katalitycznymi. Selekcja *in vitro* może być stosowana zarówno w odniesieniu do cząsteczek kwasów nukleinowych jak i białek. Wykorzystując tą metodę do badań RNA należy się spodziewać otrzymywania nowych cząsteczek kwasów rybonukleinowych o nieznanych dotąd właściwościach i zastosowaniach (np. w diagnostyce medycznej) [66]. Prawdopodobnie zbliżymy się wyraźnie do zrozumienia mechanizmu oddziaływania kwas nukleinowy — białko. Właśnie dotąd nieznane cechy RNA otwierają pole do dalszych badań. Możliwości są nieograniczone. Wskażę tutaj jedną z nich, a mianowicie tworzenie izomerów optycznych RNA czyli L-RNA [67-70]. Spośród wielu nowych właściwości, warto wymienić ich niezwykłą stabilność w surowicy. To wskazuje na możliwości wykorzystania ich jako antysensowe oligonukleotydy w terapii. W dalszym ciągu zapewne rozwijać się będą badania struktury RNA metodami NMR oraz analiza rentgenostrukturalna.

Podziękowanie
Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego finansowanego przez KBN.

Artykuł otrzymano 3 marca 1997 r.
Zaakceptowano do druku 10 września 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Crick FHC (1996) Szalona pogoń w poszukiwaniu tajemnicy życia. Wyd. Maribut. Oficyna Wyd. Volumen, Gdańsk-Warszawa.
2. Lerner RA (1995) *FASEB J.* **9**, 1-2.
3. Felden B, Atkins JF, Gesteland RF (1996) *Nature Struct. Biol.* **3**, 494-495.
4. Jacquier A (1996) *Biochimie* **78**, 474-487.
5. Nyborg J, Nissen P, Kjeldgaard M, Thirup S, Polekhina G, Clark BFC, Reshetnikova L (1996) *Trends in Biochem. Sci.* **21**, 81-82.
6. Tinoco I Jr (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1374-1376.
7. Westhof E, Masquida B, Jaeger L (1996) *Folding and design*, **1**, R78-R88.
8. RajBhandary UL, Soll D (1995) tRNA: structure, biosynthesis and function, American Microbiology Society.
9. Price S, Nagai K (1996) *Structure* **4**, 1129-1132.
10. Michel F, Westhof E (1996) *Science* **273**, 1176-1177.
11. Normanly J, Abelson J (1989) *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 1029-1049.
12. Shen LX, Cai Z, Tinoco IJr (1995) *FASEB J.* **9**, 1023-1033.
13. Louise-May S, Auffinger P, Westhof E (1996) *Curr. Opinion Struct. Biol.* **6**, 289-298.
14. Woodson SA (1996) *Curr. Biol.* **6**, 23-25.
15. Moras D, Poterszman A (1996) *Curr. Biol.* **6**, 530-532.
16. Hanyu N, Kuchino Y, Nishimura S (1986) *EMBO J.* **5**, 1307-1311.
17. Schull C, Beier H (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 1974-1980.
18. Beier H, Barciszewska M, Krupp G, Mitnacht R, Gross HJ (1984) *EMBO J.* **3**, 351-356.
19. Barciszewski J, Barciszewska MZ, Suter B, Kubli E (1985) *Plant Sci.* **40**, 193-196.
20. Beier H, Barciszewska M, Sickinger HD (1984) *EMBO J.* **3**, 1091-1096.
21. Beier H, Barciszewska MZ, Gross HJ (1985) Proc. 16th FEBS Congress Part C, UNV Science Press. str. 259-264
22. Crain PF, McCloskey JA (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 126-127.
23. Hirsh D, Gold L (1971) *J. Mol. Biol.* **58**, 459-468.
24. Krzyżosiak W, Ciesiołka J (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 6913-6921.
25. Valle RPC, Morch MD, Haenni AL (1987) *EMBO J.* **6**, 3049-3055.
26. Barciszewska M, Keith G, Dirheimer G, Mashkova TD, Kubli E, Barciszewski J (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1048**, 78-84.
27. Nissen P, Kjeldgaard M, Thirup S, Polekhina G, Reshetnikova L, Clark BFC, Nyborg J (1995) *Science* **270**, 1464-1472.[M]
28. Aevarsson A, Brazhnikov E, Garber M, Zheltonosova J, Chirgadze Yu, Al-Karadsghi S, Svensson LA, Liljas A (1994) *EMBO J.* **13**, 3669-3677.
29. Czworakowski J, Wang J, Steitz TA, Moore PB (1994) *EMBO J.* **13**, 3661-3668.
30. Liljas A (1996) *Curr. Biol.* **6**, 247-249.
31. Ito K, Eibakova K, Uno M, Nakamara Y (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5443-5448.
32. Nakamura Y, Ito K, Issakson LA (1996) *Cell* **87**, 147-150.
33. Barciszewski J, Sprinzl M, Clark BFC (1994) *FEBS Letters* **351**, 137-139.
34. Förster C, Limmer S, Zeidler W, Sprinzl M (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 4254-4257.
35. Lustig F, Boren T, Claesson C, Simonsson C, Barciszewska M, Lagerkvist U (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3343-3347.
36. Boren T, Elias P, Samuelsson T, Claesson C, Barciszewska M, Gehrke ChW, Kuo KC, Lustig F (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 739-749.
37. Claesson C, Lustig F, Boren T, Simonsson C, Barciszewska M, Lagerkvist U (1995) *J. Mol. Biol.* **247**, 191-196.
38. Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J (1996) *Biol. Rev. (Cambridge)*, **71**, 1-25.
39. Bussiere F, Perreault J-P (1995) *RNA* **1**, 451-452.
40. Suzuki M (1994) *Structure* **2**, 317-326.
41. Elrod-Erickson E, Rould M, Nekudova L, Pabo CO (1996) *Structure* **4**, 1171-1180.
42. Specht T, Szymański M, Barciszewska MZ, Barciszewski J, Erdmann VA (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 96-97.
43. Barciszewska M, Huang HW, Marshal AG, Erdmann VA, Barciszewski J (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16691-16695.
44. Westhof E, Dumas P, Moras D (1985) *J. Mol. Biol.* **184**, 119-145.
45. Pley WH, Flaherty KM, McKay DB (1994) *Nature* **372**, 68-74.
46. Scott WG, Finch JT, Klug A (1995) *Cell* **81**, 991-1002.
47. Scott WG, Murray JB, Arnold JRP, Stoddard BL, Klug A (1996) *Science* **274**, 2065-2069.
48. Tchurikov NA, Ponomarenko NA, Golova YB, Chernov BK (1995) *J. Biomolec. Struct. Dyn.* **13**, 507-513.
49. Cate JH, Gooding AR, Podell E, Zhou K, Golden BL, Kundrot CE, Cech TR, Doudna JA (1996) *Science* **273**, 1678-1685.
50. Cate JH, Gooding AR, Podell E, Zhou K, Golden BL, Szewczak A, Kundrot CE, Cech TR, Doudna JA (1996) *Science* **273**, 1696-1699.
51. Wahl MC, Sundaralingham M (1995) *Curr. Opinion Struct. Biol.* **5**, 282-295.
52. Wahl MC, Ramakrishnan B, Ban C, Chen X, Sundaralingham M (1996) *Act Cryst.* **D52**, 668-675.
53. Anderson AC, Scaringe SA, Earp BE, Frederick CA (1996) *RNA* **2**, 110-117
54. Heus HA, Pardi A (1991) *Science* **253**, 191-194.
55. Baeyens KJ, DeBondt HL, Pardi A, Holbrook

http://rcin.org.pl

SR (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12851-12855.
56. Rhodes D, Klug A (1993) *Sci. Amer.* 32-39.
57. Klug A, Schwabe JWR (1995) *FASEB J.* **9**, 597-604.
58. Berg JM (1995) *Acc. Chem. Res.* **28**, 14-19.
59. Romby P, Baudin F, Brunel de Stevenson IL, Westhof E, Romaniuk PJ, Ehresmann C, Ehresmann B (1990) *Biochimie* **72**, 437-452.
60. Barciszewska MZ (1994) *Acta Biochim. Polon.* **41**, 17-24.
61. Theunissen O, Rudt F, Guddat U, Mentzel H, Pieler T (1992) *Cell* **71**, 679-690.
62. Hansen PK, Christensen JH, Nyborg J, Lillelund O, Thogersen HC (1993) *J. Mol. Biol.* **233**, 191-202.
63. Giel M, Ślósarek G, Rekowski P, Kupryszewski G (1993) *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 259-264.
64. Herschlag D (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20871-20874.
65. Gold L, Polsky B, Uhlenbeck O, Yarus M (1995) *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 763-797.
66. Gold L (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13581-13584.
67. Klussmann S, Nolte A, Bald R, Erdmann VA, Fürste JP (1996) *Nature Biotechnol.* **14**, 1112-1115.
68. Nolte A, Klussmann S, Bald R, Erdmann VA, Fürste JP (1996) *Nature Biotechnol.* **14**, 1116-1119.
69. Schumacher TNM, Mayr LM, Minor DL Jr, Milhollen MA, Burgess MW, Kim PS (1996) *Science* **271**, 1854-1857.
70. Avetisov V, Goldansleii U (1996) *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* **93**, 11435-11442.

Pozagenomowe działanie steroidów w układzie nerwowym

Non-genomic action of steroids

ELŻBIETA RĘBAS[1]
LILLA LACHOWICZ[2]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Mechanizm działania neurosteroidów
III. Wpływ steroidów na struktury błonowe
III-1. Wpływ neurosteroidów na receptor GABA
III-2. Wpływ neurosteroidów na receptory NMDA i glicynowy
III-3. Wpływ steroidów na struktury błonowe związane z białkami G
III-4. Steroidy a stężenie wapnia w komórce
III-5. Inne działania steroidów
IV. Kliniczne znaczenie pozagenomowego oddziaływania steroidów na błony
V. Podsumowanie

Contents:

I. Introduction
II. Mechanisms of steroids action
III. Effects of steroids on membrane structures
III-1. Effects of neurosteroids on GABA receptor
III-2. Effects of neurosteroids on NMDA and glicyne receptors
III-3. Effects of steroids on membrane structures conected with G-protein
III-4. Effects of steroids on intracellular calcium concentration
III-5. Other rapid responses to steroids
IV. Clinical implications of non-genomic action of steroids
V. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: OUN — Ośrodkowy Układ Nerwowy; NMDA — N-metylo-D-asparaginian; GABA — kwas γ-aminomasłowy; EGF — epidermalny czynnik wzrostu; IGF — insulinozależny czynnik wzrostu; PREG — pregnenolon; PREG-S — siarczan pregnenolonu; DHEA — dehydroepiandrosteron; DHEA-S — siarczan dehydroepiandrosteronu; NE — noradrenalina; 17βE — 17β-estradiol; 3α5αTHP — 3α-OH-5α-pregnan-20-on, allopregnanolon; 5αTHDOC — 3α, 21-dihydroksy-5α-pregnan-20-on; TBPS — t-butylobicyklofosfotionian; PKA — kinaza białkowa A; GABA-A — receptor kwasu γ-aminomasłowego.

I. Wstęp

Od kilku lat wyraźnie wzrosło zainteresowanie oddziaływaniem hormonów steroidowych na komórki ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Steroidy obecne w OUN pochodzą z dwóch źródeł. Jedną pulę stanowią hormony steroidowe syntetyzowane w gruczołach obwodowych, takich jak kora nadnerczy, jajniki i jądra i pokonujące barierę krew mózg. Są to m.in. estradiol, mineralokortykoidy, których działanie w mózgowiu wiązano do niedawna wyłącznie z przysadką oraz wzgórzem tj. z obszarami mózgowia odpowiedzialnymi za regulację gospodarki hormonalnej w organizmie. Drugą grupę stanowią steroidy syntetyzowane, magazynowane i metabolizowane w OUN. W latach 80-tych Baulieu i wsp. wykazali, że związki te powstają niezależnie od funkcjonowania gruczołów obwodowych i nazwali je neurosteroidami [1]. Syntezę i metabolizm typowych neurosteroidów, jak pregnenolon i dehydroepiandrosteron

[1] dr n. med. [2] prof. dr hab. II Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, 90-131 Łódź, ul. Lindleya 6

http://rcin.org.pl

oraz ich pochodne, opisano we wcześniejszej pracy [2].

Bez względu na źródło pochodzenia steroidy wykazują dużą aktywność biologiczną w mózgowiu ssaków. Już w początkach lat 40-tych naszego stulecia S e y l e stwierdził, że niektóre neurosteroidy wykazują potężne działanie anestetyczne. Od tego czasu pojawiały się pojedyńcze doniesienia o wpływie steroidów na różne funkcje mózgowia, a pomimo wzrostu zainteresowania tym tematem nadal brak jest pełnych informacji dotyczących mechanizmów oddziaływania tych hormonów na procesy neuronalne.

Zakłada się, że hormony steroidowe zarówno pochodzenia obwodowego, jak i neurosteroidy, oraz steroidy syntetyczne (np. *alphaxalon*) mogą modulować funkcje neuronalne. Działanie ich określa się jako:
a) genomowe — poprzez zmianę ekspresji genu
b) bezpośrednie — pozagenomowe.

Celem pracy jest przedstawienie dostępnych danych dotyczących bezpośredniego-pozagenomowego oddziaływania steroidów na tkankę nerwową.

II. Mechanizmy działania neurosteroidów

Klasyczny — genomowy mechanizm działania steroidów polega na wiązaniu się hormonu z wewnątrzkomórkowym receptorem, i tworzeniu kompleksu hormon-receptor łączącego się z elementem odpowiedzi hormonalnej (HRE) w genie docelowym w łańcuchu DNA. Zmiany w transkrypcji genu prowadzą do wywołania określonych efektów fizjologicznych poprzez wzrost lub zahamowanie syntezy określonego białka (najczęściej enzymu). Wyniki badań ostatnich lat wykazały jednak, że steroidy charakteryzuje wysoka aktywność biologiczna także pozagenomowa. Dane przemawiające za pozagenomowym mechanizmem działania steroidów przedstawiają się następująco [3]:

1. Uzyskany efekt działania w krótkim czasie (sekundy lub minuty) po zastosowaniu hormonu wyklucza mechanizm genomowy wymagający dłuższego czasu (godziny lub dni) dla ujawnienia efektu.
2. Zablokowanie możliwości wejścia hormonu do komórki np. poprzez kowalencyjne związanie hormonu z białkami nie eliminuje wystąpienia efektu.
3. Efekt działania uzyskuje się w badaniach *in vitro* prowadzonych na preparatach mózgowia nie zawierających jądra np. frakcje błon synaptosomalnych.
4. Efekt działania nie jest blokowany przez inhibitory syntezy białek tzn. że badany steroid musi działać bezpośrednio na białko już istniejące a nie wpływać na ekspresję genu tego białka i co za tym idzie jego syntezę, co jest charakterystyczne dla związków działających poprzez receptor jądrowy
5. Hormony takie jak PREG-S i DHEA-S, nie wiążące się z receptorem wewnątrzkomórkowym, wykazują wysoką aktywność biologiczną.

Przypuszczalny mechanizm bezpośredniego działania steroidów może dotyczyć:
a — wiązania ze specyficznym receptorem steroidu w błonie komórkowej
b — wiązania z błonowym receptorem neurotransmiterów np. GABA, NMDA, dopaminy
c — aktywacji w/w receptorów przez zmianę w receptorze czynników jak EGF, IGF-1.
d — bezpośredniego wpływu na aktywność enzymów np. kinaz białkowych lub enzymów związanych z syntezą i rozkładem neurotransmiterów.
e — niespecyficznej modulacji przepuszczalności błony komórkowej

Samo określenie neuroaktywne steroidy czy neurosteroidy nie wyjaśnia mechanizmu działania. Związki zarówno jednej jak i drugiej grupy mogą oddziaływać na komórkę bezpośrednio i poprzez genom. Wyjątek

Tabela 1.
Wpływ neurosteroidów na struktury błonowe.

Neurosteroid	Efektywne stężenie nM	Receptor	Efekt
Progesteron DHEA-S PREG-S 3α,5α-THP-S	10 30 20 80	Wiązanie z błonami synaptosomalnymi	
3α,5α-THP-S 3α,5α-THP PREG-S DHEA-S	10 10^2 10^3-10^5	Receptor GABA	agonista antagonista
PREG-S	10^2-10^3	Receptor NMDA	agonista
Progesteron PREG-S	10^2	Receptor glicynowy	antagonista
Progesteron Progesteron-3-BSA	10^2	Receptor nikotynowy	antagonista
Progesteron	0.1	Receptor oksytocyny	agonista

http://rcin.org.pl

stanowią PREG-S i DHEA-S o których sądzi się, że działają wyłącznie bezpośrednio. Np. w zależności od obszaru mózgowia ten sam hormon może wykazywać różny mechanizm działania. Tabela 1 przedstawia wpływ niektórych neurosteroidów na struktury błonowe, z określeniem ich efektywnego stężenia w miejscu działania [4]. Wiadomo również, że hormony takie jak np. estradiol, testosteron czy mineralokortykoidy nawet w niskich stężeniach wiążą się z błonami [5].

III. Wpływ steroidów na receptory błonowe

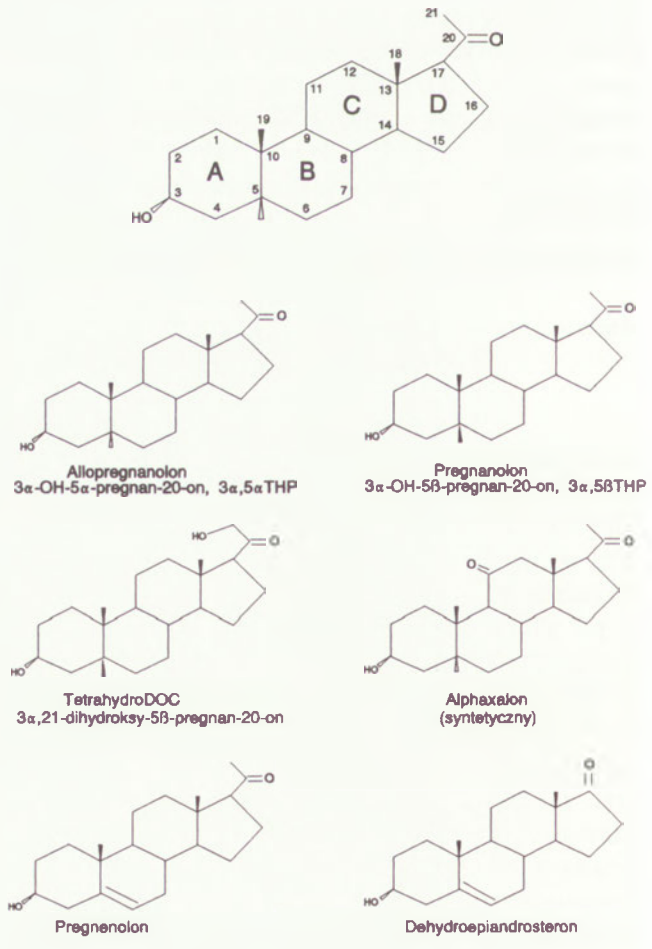
III-1. Wpływ neurosteroidów na receptor GABA-A

Głównym inhibitorowym neuroprzekaźnikiem układu nerwowego jest kwas γ-aminomasłowy stanowiący fizjologiczny ligand błonowego receptora. W pełni funkcjonalny receptor GABA składa się z ośmiu podjednostek, przy czym znanych jest szereg izoform tego receptora, różniących się obecnością i ilością występujących w nim rodzajów podjednostek oznaczonych jako α_1-α_6, β_1-β_3, γ_1-γ_3, δ, π. Transmembranowe regiony podjednostek receptora GABA-A tworzą kanał dla jonów chlorkowych i zawierają miejsca wiązania takich ligandów agonistycznych jak kwas γ-aminomasłowy, benzodiazepiny, barbiturany, oraz wiązania antagonistów jak pikrotoksyna i t-butylobicyklofosfotionian (TBS). Wykazano, że w strukturze receptora zawarte są również miejsca wiążące steroidy [1]. Agoniści receptora GABA-A wzmagają częstotliwość otwierania kanału Cl^- w następstwie czego dochodzi do hiperpolaryzacji błony komórkowej. Wśród agonistów receptora GABA-a znajduje się wiele znanych anestetyków i środków nasennych.

Z pionierskich prac Seyla [6, 7] wynika, że progesteron i jego metabolity, jak 3α5αTHP i 3α5βTHP, podawane szczurom w postaci injekcji przedłużały czas anestezji co najmniej o 2 godziny. Wiadomo również, że metabolity te nie wiążą się z klasycznymi receptorami wewnątrzkomórkowymi. Dalsze badania wykazały, że anestetyczne oraz antyepileptyczne właściwości tych progestagenów związane są z ich pozytywnym allosterycznym oddziaływaniem na receptor GABA-A. Są one agonistami receptora GABA i analogicznie jak kwas γ-aminomasłowy, wzmagają częstotliwość otwierania kanału Cl^- powodując hiperpolaryzację błony komórkowej. Grupa steroidowych agonistów receptora GABA wykazuje w synaptosomach kory mózgowej ok. 10 razy wyższą aktywność od benzodiazepin i ok. 200 razy większą niż pentobarbital [ref w 3]. Wśród steroidowych agonistów receptora GABA przeważają związki posiadające grupę OH przy węglu 3 pierścienia A i grupę ketonową przy węglu 20 (Rys 1). Oprócz 3α5αTHP i 3α5βTHP właściwości takie wykazują 5α-pregnan-3α, 21-diol-20-on (metabolit deoksykortykosteronu), 5αTHDOC, a także wzbudzający w ostatnim czasie szczególne zainteresowanie syntetyczny steroid-alphaxalon. Podstawienie grupy hydroksylowej w pozycji C21 do cyklopentanoperhydrofenantrenu lub też ekstryfikacja kwasem tłuszczowym oraz obecność łańcucha bocznego przy C17 w pozycji β powoduje niewielki spadek aktywności biologicznej hormonów w porównaniu z kwasem γ-aminomasłowym [ref w 8].

Smith i wsp. [9, 10] wykazali, że podanie w injekcji progesteronu lub po jego zaaplikowaniu miejscowym następuje zahamowanie odpowiedzi komórek Purkinjego u szczura na kwas γ-aminomasłowy. Efekt tego działania ujawniał się już po upływie 3—10 minut, co wydaje się wykluczać mechanizm genomowy. Użyte do tych doświadczeń zwierzęta były uprzednio owariektomizowane, zatem poziom endogennego progesteronu był bardzo niski lub zerowy. Zastosowanie białkowych inhibitorów syntezy białek nie zmieniało zdolności progesteronu do obniżania odpowiedzi komórek Purkinjego na glutaminian [9, 10]. Dane te przemawiają za pozagenomowym mechanizmem działania hormonu.

Należy podkreślić, że niektóre endogenne neurosteroidy, jak siarczan dehydroepiandrosteronu i siarczan pregnenolonu oraz syntetyczny RU 5135 (3α-hydroksy-16-imino-5β-17-aza-androstan-11-on) działają



Ryc. 1. Budowa neurosteroidów aktywnych wobec receptora GABA.

http://rcin.org.pl

jako antagonisty receptora GABA-A redukując częstotliwość otwierania kanału chlorkowego; należą zatem do grupy neurosteroidów pobudzających [11]. Działanie ich na receptor GABA jest różnorodne. I tak, PREG-S inhibuje wiązanie TBPS i wzmaga wiązanie benzodiazepin z receptorem, ale w stopniu znacznie słabszym niż czynią to 3αOH zredukowane pochodne progesteronu; ponadto samo wiązanie PREG-S przez błony neuronalne hamuje obecność pikrotoksyny. W przeciwieństwie do działania PREG-S, DHEA-S nie wpływa na wiązanie TBPS z receptorem. Hormon w stężeniach μmolowych hamuje raczej wiązanie benzodiazepin, a wiązanie DHEA-S do błon neuronalnych inhibowane jest przez barbiturany. Sugeruje to istnienie różnych miejsc wiązania tych neurosteroidów w receptorze GABA-A [12-14]. Warto podkreślić również, że niezestryfikowane formy pregnenolonu i dehydroepiandrosteronu nie wpływają na funkcjonowanie receptora GABA i wykazują znacznie niższą aktywność biologiczną niż ich estry siarczanowe [15]. Obecnie przypuszcza się, że w strukturze receptora GABA istnieją odrębne miejsca rozpoznające i wiążące neurosteroidy, wykazujące zarówno właściwości agonistów jak i antagonistów. Stwierdzono bowiem, że nawet pod nieobecność kwasu γ-aminomasłowego neurosteroidy mogą bezpośrednio modulować funkcje tego receptora [ref w 8].

Jak dotąd brak jest dokładnych danych o miejscu działania steroidów w cząsteczce tego receptora, ważny jest jednak fakt, że podjednostka γ2 receptora GABA wykazuje wysoki stopień ekspresji w komórkach glejowych, które jak wiadomo są głównym miejscem syntezy neurosteroidów w mózgowiu [8].

Fizjologiczne znaczenie modulacji receptora GABA przez steroidy wymaga dalszych badań. Regulacja receptora GABA-A wydaje się bowiem odgrywać istotną rolę w różnych stanach fizjologicznych jak i patologicznych, a mianowicie w stresie, zespole napięcia przedmiesiączkowego, depresji, także depresji poporodowej oraz w procesach związanych z pamięcią i świadomością. Poziom 3αhydroksysteroidów w mózgowiu może wzrastać do 10 i nawet 30 nM w czasie stresu i w czasie ciąży. Może to również wyjaśniać objawy wzmożonej senności kobiet w ciąży oraz u pacjentów leczonych wysokimi dawkami progesteronu. W badaniach *in vivo* obserwowano, że PREG-S — neurosteroid pobudzający powoduje skrócenie czasu snu szczurów w anestezji wywołanej barbituranami, a wyniki te zostały potwierdzone po zastosowaniu tego hormonu dokomorowo lub dootrzewnowo [16].

III-2. Wpływ neurosteroidów na receptory NMDA i glicynowy

Hormony steroidowe mogą modyfikować funkcje receptorów innych neurotransmiterów. Wykazano działanie niektórych hormonów steroidowych na receptor glicynowy (głównie wrażliwy na strychninę) oraz na receptor NMDA. I tak, w hodowli neuronów rdzenia kręgowego wysokie mikromolowe stężenia siarczanu pregnenolonu, deoksykortykosteronu i progesteronu hamują przewodnictwo kanału Cl^- w receptorze glicynowym [17]. Niskie μM stężenia kortykosteroidów: 20αdihydrokortyzolu, α-kortolu (5β-pregnane-3α,, 11β, 17α, 20α, 21-pentol) i progesteronu wzmagają depolaryzację zależną od glicyny np. w preparatach nerwów ocznych. Najbardziej aktywne wobec receptora GABA-A hormony 3α-OH-DHP i alfaksalon okazały się nieaktywne wobec receptora glicynowego. Należy również podkreślić, że najbardziej aktywny w stosunku do tego receptora kortykoid 20αdihydrokortyzol nie wpływa na działanie receptora GABA-A. Pomimo pewnej homologii w budowie pomiędzy wrażliwym na strychninę receptorem glicynowym i receptorem GABA, zdają się one mieć różne strukturalne „wymagania" dla oddziaływujących na nie steroidów [12, 16]. Wyjątkiem jest siarczan pregnenolonu, który inhibuje zarówno GABA jak i glicynozależne przewodzenie jonu Cl^-, a także wzmaga aktywność receptora NMDA, co powoduje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia. PREG-S działa jako pozytywny allosteryczny modulator receptora N-metylo-D-asparaginianowego. Wydłuża on czas otwarcia kanałów aktywowanych NMDA i wzrost częstotliwości otwierania kanału, co zaobserwowano w hodowlach neuronów hipokampa [18]. Z badań Fahey i wsp. prowadzonych na hodowli neuronów kory mózgu kurczaka wynika, że PREG-S w stężeniu 250 nM powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} wywołany aktywacją receptora NMDA w nieobecności zarówno NMDA jak i glicyny. W obecności NMDA i glicyny i przy stężeniach PREG-S 50 i 100 nM znacznie wzrastało stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego. Badania te potwierdzają odmienność miejsc wiązania steroidu i glicyny czy poliaminy przez receptor NMDA [19].

Wykazano, że w warunkach *in vitro* NMDA powoduje uwalnianie [^{3}H]noradrenaliny z hipokampa szczura. Zbadano wpływ niektórych neuroaktywnych steroidów na uwalnianie NE z udziałem NMDA poprzez receptor σ i stwierdzono, że DHEA-S ma właściwości agonu σ-receptora, PREG-S działa jak odwrotny agon, natomiast progesteron jest antagonem tego receptora [20]

Wykazano, że 17βestradiol redukuje przewodzenie jonów Ba^{2+} i Ca^{2+} przez receptor NMDA w hodowli neuronów szczura. Efekt pojawiał się po upływie kilku sekund od zaaplikowania hormonu i nie był hamowany przez tamoxifen — znany inhibitor wewnątrzkomórkowego receptora estradiolu. Przewodzenie Ba^{2+} w takim samym stopniu hamowane było przez estriol i 4-hydroksyestriol, natomiast mniejszą aktywność ujawniał 17αestradiol oraz 2-metoksyestriol [21]. Powyższe dane przemawiają za działaniem hormonów na poziomie błony komórkowej neuronu.

http://rcin.org.pl

III-3. Wpływ steroidów na struktury błonowe związane z białkami G

Poza wyżej opisanymi oddziaływaniami neurosteroidów na receptory aminokwasowe, GABA i NMDA, także inne hormony o budowie steroidowej mogą regulować procesy zachodzące w tkance mózgowej w sposób niezależny od ich klasycznych receptorów. Odkryty np. w błonach synaptycznych z mózgowia płazów receptor glukokortykoidów związany jest z białkami G i odpowiedzialny jest za specyficzne wiązanie kortykosteronu. Receptor ten słabo wiąże kortyzol, nie wiąże zaś zupełnie deksametazonu. Jak wykazano w tej grupie organizmów, kortykosteron wiążąc się z receptorem błonowym bierze udział w kontroli szybkich odpowiedzi behawioralnych na stres [22].

Progesteron natomiast poprzez wiązanie się z błoną oocytów płazów wzmaga ich dojrzewanie przy równoczesnej inhibicji aktywności cyklazy adenylanowej. Aktywacji ulega natomiast fosfolipaza C; oba te enzymy związane są z białkami G. 17βestradiol działając na białka G może zmieniać neuronalną pobudliwość komórek poprzez regulację szybkości transportu K^+, a w efekcie tym wydaje się uczestniczyć cykliczny AMP. Steroid ten może również stymulować hydrolizę fosfatydyloinozytoli w neuronach móżdżku, a jak wynika z danych proces ten zależy również od białek G [ref w 12].

III-4. Steroidy a stężenie wapnia w komórce

Jak już wspomniano, hormony steroidowe wiążąc się z receptorem NMDA powodują równocześnie zmiany w stężeniu wewnątrzkomórkowego wapnia. Nieliczne doniesienia w literaturze przedmiotu świadczą jednak o tym, że hormony te mogą wpływać na poziom wapnia w cytozolu w sposób nie zależny od funkcjonowania receptora NMDA.

Wykazano zmiany w stężeniu wapnia w komórkach hodowli neuronów wzgórza po zastosowaniu kilku steroidów [23]. Stwierdzono, że allopregnanolon (1 pM-100 pM) powodował wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w komórce w przeciągu 2-3 sekund w sposób zależny od dawki. Efekt ten był stereospecyficzny, bowiem izomer β allopregnanolonu (3β-hydroksy-5α--pregnan-20-on) nie wykazywał żadnego wpływu na poziom Ca^{2+} w komórce. Podanie 17β-estradiolu powodowało wzrost poziomu wapnia, ale w stopniu mniejszym niż allopregnanolon, natomiast progesteron nie wywoływał uchwytnych zmian. Autorzy pracy sugerują, że wzrost stężenia wapnia wywołany w/w steroidami związany jest ze wzmożonym przenikaniem do komórki wapnia zewnątrzkomórkowego. Potwierdzono to stosując w badaniach EGTA lub blokery kanałów wapniowych zależnych od napięcia (np. nifedypinę). Zasugerowano również istnienie pośredniego wpływu badanych steroidów na receptor GABA, czego następstwem byłaby polaryzacja błony i otwarcie kanału wapniowego.

Badania nad wpływem neurosteroidów na kanały wapniowe zależne od napięcia prowadzili również French-Mullen i Spence [24, 25]. Udowodnili oni, że allotetrahydrodeoksykortykosteron, siarczan dehydroepiandrosteronu i pregnanolon hamują przepływ jonów wapnia przez kanały wapniowe w neuronach hipokampa. Podobny efekt zaobserwowano po zastosowaniu pregnenolonu i PREG-S, natomiast progesteron nie wywierał podobnego działania. Zdaniem autorów hamowanie przepływu jonów wapnia wydaje się przebiegać z udziałem wrażliwych na toksynę krztuśca białek G i związaną z tym aktywacją kinazy białkowej C [26].

Stwierdzono również, że w neuronach hipokampa szczurów wzrasta przepływ jonów Ca^{2+} poprzez kanały wapniowe po zastosowaniu estradiolu. Jednoczesne podawanie estradiolu i progesteronu wzmagało jeszcze ten efekt. W tych samych badanych grupach nie zaobserwowano jednak zmian w funkcjonowaniu kanału K^+ [27].

Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia może być również wynikiem jego uwalniania z magazynów wewnątrzkomórkowych po działaniu steroidów. Wykazano mianowicie, że 17β- i 17α-estradiol, estron i estriol powodują wzrost stężenia Ca^{2+} w komórce. Brak takiego efektu stwierdzono po stosowaniu progesteronu. Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ pod wpływem estrogenów utrzymywał się w obecności: EGTA, inhibitorów kanałów wapniowych (np. metoksywerapamil, nifedypina), inhibitorów wewnątrzkomórkowych receptorów estrogenów (tamoksifen) lub też inhibitorów syntezy RNA i białek (aktynomycyna D, cykloheksymid). Natomiast neomycyna — inhibitor hydrolizy fosfatydyloinozytoli hamuje wzrost stężenia Ca^{2+} w komórce. Nasuwa się więc wniosek, że estrogeny powodują uwalnianie jonów Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych prawdopodobnie na drodze stymulowania procesu rozpadu fosfatydyloinozytoli [28].

III-5. Inne działania steroidów

Opisane powyżej działania hormonów steroidowych na struktury błonowe, mimo pewnych niejasności zyskują potwierdzenie w wielu niezależnych badaniach i obecnie nie budzą wyraźnych wątpliwości. Istnieją, nieliczne wprawdzie, doniesienia o innych szybkich zmianach w komórce wywołanych obecnością hormonu steroidowego.

I tak $17\beta E_2$ przypisuje się zmianę pobudliwości poprzez zmiany w przewodnictwie jonów K^+, stymulację hydrolizy fosfatydyloinozytoli w neuronach kory, oraz zmianę translokacji jonów Ca^{2+} w zakończeniach nerwowych w różnych obszarach mózgowia. Pod wpływem $17\beta E_2$ zachodzi również wzrost syntezy dopaminy w neuronach, a także obniżanie uwalniania noradrenaliny, dopaminy i serotoniny z synap-

http://rcin.org.pl

tosomów kory mózgowej szczura [29]. Wzmaga się również uwalnianie noradrenaliny w komórkach wzgórza [30]. Estradiol i progesteron zmianiają również aktywność hydroksylazy tyrozynowej w mózgowiu szczura [31].

$17\beta E_2$ podawany ovariektomizowanym szczurom powoduje wzrost aktywności kinazy białkowej C a spadek aktywności kinazy białkowej A w przysadce szczura, natomiast nie zmienia aktywności PKA we wzgórzu [32]. Wykazano również wpływ 17β-estradiolu na aktywność kinazy białkowej C w przysadce szczura [33-35].

Warte wspomnienia wydają się być prace Filipiniego i wsp., którzy zaobserwowali, że neuroaktywne steroidy takie jak 18-OH-DOC, aldosteron i allotetrahydroprogesteron modulują proces LTP (*long term potentation*) poprzez obniżanie EPSP (postsynaptyczny potencjał pobudzający) oraz PS (*population spike*) [36]. Wg badań przeprowadzonych przez Meyera i Gruol DHEA-S powoduje wzrost amplitudy EPSP [37].

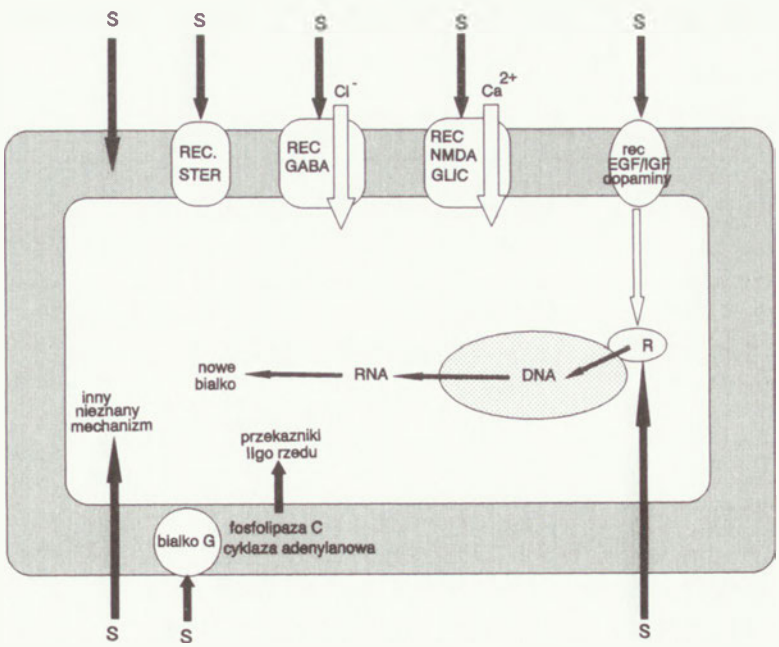
IV. Kliniczne znaczenie oddziaływania steroidów na błony

Interakcja steroidów i neurosteroidów z niejądrowymi receptorami sugeruje, że odgrywają one rolę w wielu procesach zachodzących w mózgowiu i mogą powodować zmiany behawioralne np. na drodze indukcji snu lub znoszenia podniecenia. W określonych stanach biologicznych zaobserwowano zmiany w syntezie hormonów steroidowych w mózgowiu np. w ciąży i cyklu miesiączkowym. Należy podkreślić, że większość badań przeprowadzona była na gryzoniach i w związku z tym interpretacja i porównanie wyników z neurosteroidogenezą u ludzi i związanymi z nią chorobami jest na tym etapie badań przedwczesne. Opisano wprawdzie kilka klinicznych zastosowań steroidów w takich stanach jak stres, stany drgawkowe, epilepsja oraz w procesie zapamiętywania [15].

Endogenne stężenia neurosteroidów i enzymów biorących udział w neurosteroidogenezie może być modulowane np. stresem, cyklem miesiączkowym bądź pojawiającymi się zaburzeniami hormonalnymi. W stanie stresu zaobserwowano wzrost stężenia allopregnanolonu i tetrahydroDOC w mózgowiu do poziomów aktywujących receptor GABA. Stężenie obu hormonów w osoczu przed i po stresie jest niewykrywalne. W czasie trwania stresu wzrasta również poziom siarczanu pregnenolonu, dzięki czemu znoszone jest inhibitorowe działanie kwasu γ-aminomasłowego. Ilość allopregnanolonu w mózgowiu gryzoni wzrasta również w czasie ciąży. U ludzi hormony te występują w osoczu w stężeniach nieoznaczalnych i brak jest danych o ich poziomie w mózgowiu. Jedynie na podstawie podobieństw reakcji zachodzących u ludzi i gryzoni można wnioskować, że zmiany hormonalne wpływając na neurosteroidogenezę mogą być przyczyną np. depresji poporodowej lub zespołu napięcia przedmiesiączkowego.

W padaczce obserwuje się zmiany w GABAergicznej neurotransmisji. Ponieważ częstotliwość napadów padaczki u ludzi ulega zmianie podczas stresu bądź ciąży, przypuszcza się, że częstotliwość napadów zależna jest od aktualnego stężenia hormonów. U kobiet chorych na epilepsję napady pojawiają się cyklicznie w zależności od dnia cyklu. Częstość napadów jest mniejsza podczas fazy lutealnej, gdy poziom progesteronu jest wysoki. Być może przemiana progresteronu do allopregnanolonu w mózgu odpowiedzialna jest za redukcję napadów podczas tej fazy.

Wykazano, że pregnenolon, PREG-S, dehydroepiandrosteron i DHEA-S podane dokomorowo wzmagają pamięć u myszy, podczas gdy allopregnanolon wyraźnie osłabia ten proces. Interesujące może być przypuszczenie, że obniżenie zdolności zapamiętywa-



Ryc. 2. Drogi działania hormonów steroidowych w komórce.
rec. ster. — receptor błonowy steroidu; rec. GABA — receptor GABA; rec. NMDA, GLIC — receptor NMDA i glicynowy; R — receptor jądrowy steroidu; S — hormon steroidowy.

http://rcin.org.pl

nia występujące w wielu chorobach lub w normalnym procesie rozwojowym organizmu włączając w to wiek (starzenie się) może być rezultatem zmian w neurosteroidogenezie.

V. Podsumowanie

Przytoczone przykłady oddziaływania neurosteroidów i niektórych neuroaktywnych steroidów na poziomie błonowym oraz bezpośrednie-pozagenomowe działanie tych związków na komórkę świadczą o ich zdolności do modulowania szeregu funkcji neuronalnych. Orientacyjny wpływ steroidów na komórkę przedstawia rycina 2. Przedstawione dane nie są z pewnością wyczerpujące, w wielu przypadkach brak jest jak dotąd dokładnych informacji dotyczących mechanizmu działania a dostępne doniesienia wymagają dalszych badań, zwłaszcza u ludzi. Dotychczasowe dane przemawiają jednak za udziałem hormonów steroidowych w procesach zachodzących w OUN. Sugerują także, że dalsze badania mogą rzucić nowe światło na przyczyny powstawania chorób degenerujących ośrodkowy układ nerwowy. Każdy postęp w tej dziedzinie niezwykle trudnej obecnie do leczenia może posłużyć do odkrycia nowej generacji leków skutecznych w tych chorobach, w których obecnie stosuje się środki uspakajające, nasenne lub przeciwdrgawkowe, a więc likwidujące wyłącznie objawy.

Artykuł otrzymano 25 lutego 1997 r.
Zaakceptowano do druku 4 czerwca 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Baulieu E E, Robel P (1990) *J Steroid Biochem Molec Biol* **37**: 395-403
2. Rębas E, Lachowicz L (1995) *Post Biochem* **41**:
3. Brann D W, Hendry L B, Mahesz V B (1995) *J Steroid Biochem Molec Biol* **52**: 113-133
4. Robel P, Baulieu E E (1994) *Method in Neuroscience* **22**: 36-50
5. Towle A C, Sze P Y (1983) *J Steroid Biochem* **18**: 135-143
6. Seyle H (1941) *Proc Soc Exp Biol Med* **46**: 116-121
7. Seyle H (1942) *Endocrinology* **30**: 437-453
8. Lambert J, Belelli D, Hill-Venning C, Peters J (1995) *TIPS* **16**: 295-303
9. Smith S (1991) W: Costa E, Poul S (red) Neurosteroids and brain function, Thieme Medical Publishers Inc, New York, str: 87-94
10. Smith S (1989) *Neuroscience* **42**: 309-320
11. Paul S M, Purdy R H (1992) *FASEB J* **6**: 2311-2322
12. Orchinik M, McEwan B (1993) *Neurotransmission* **9**: 1-6
13. Majewska M D, Schwartz R D (1987) *Brain Res* **404**: 355-360
14. Majewska M D, Demirgoren S, Spivak C E, London E D (1990) *Brain Res* **526**: 143-146
15. Mellon S H (1994) *J Clin Endocrinol & Metab* **78**: 1003-1008
16. Robel P, Baulieu E E (1994) Neurosteroids: Biosynthesis and function w Methods in Neuroscience t. 22 Academic Press str. 36-50
17. Wu F S, Gibbs T T, Farb D H (1990) *Mol Pharmacol* **37**: 597
18. Irwin R P, Moragakis N K, Rogawski M A, Purdy R H, Farb D H, Paul S M (1992) *Neurosci Lett* **141**: 30-34
19. Fahey J M, Lindquist D G, Pritchard G A, Miller L G (1995) *Brain Res* **669**: 181-188
20. Monnet F P, Mahe V, Robel P, Baulieu E E (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3774-3778
21. Mermelstein P G, Becker J B, Surmeier D J (1996) *J Neurosci* **16**: 595-604
22. Orchinik M, Murray T F (1994) Steroid Hormone Binding to Membrane Receptors w: Methods in Neurosci 22, AcademicC Press, Inc, str. 96-115
23. Dayanithi G, Tapia-Arancibia L (1996) *J Neurosci* **16**: 130-136
24. ffrench-Mullen J M H, Spence K T (1991) *Eur J Pharamacol* **202**: 269-272
25. Spence K T, Plata-Salaman C R, ffrench-Mullen J M H (1991) *Life Sci*: 235-239
26. ffrench-Mullen J M H, Danks P, Spence K T (1994) *J Neurosci* **14**: 1963-1977
27. Joels M, Karst H (1995) *J Neurosci* **15**: 4289-4297
28. Morley P, Whitfield J F, Vanderhyden B C, Tsang B K, Schwrtz J L (1992) *Endocrinology* **131**: 1305--1312
29. Horvat A, Nikezic G, Martinović J V (1995) Brikhauser Verlag Basel: 11-15
30. Etgen A M, Karkanias G B (1994) *Psychoneuroendocrinology* **19**: 603-610
31. Hernandez M I, Fernandez-Ruiz J J, dcMiquel R, Ramos J A (1991) *J Neural Trans* [*Gen Sect*] **83**: 77-84
32. Ostrowska A, Kochman K (1990) *Neuroendocrinol Lett* **12**: 449-454
33. Maeda T, Lloyd R V (1993) *Laboratory Invest* **68**: 472-480
34. Drouva S V, Gorenne I, Laplante E, Rerat E, Enjalbert A, Kordon C (1990) Endocrinology **126**: 536-544
35. Joubert-Bresson D, Brandi A M, Birman P, Peillon F (1990) Steroids & neuronal activity, Wiley, Chichester: 156-171
36. Filipini D, Gijsberg K, Birmingham M K, Dubrowski B (1991) *J Steroid Biochem Molec Biol* **40**: 87-92
37. Meyer J H, Gruol D L (1994) *Brain Res* **633**: 253-261

http://rcin.org.pl

Zaburzenia homeostazy miedzi są przyczyną groźnych chorób człowieka

Disturbances in copper homeostasis are the main cause of serious diseases in man

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA[1]
SŁAWOMIR PIKUŁA[2]

The relation between cell biology and transition metal chemistry, like that between war and love, is still enigmatic.

Kaplan J, O'Halloran TV [1]

Spis treści:

I. Krążenie miedzi w organizmie
II. Choroby związane z zaburzeniami metabolizmu miedzi
II-1. Degeneracja ośrodkowego układu nerwowego w chorobie Menkesa
II-2. Uszkodzenia różnych narządów w chorobie Wilsona
III. Właściwości ATPaz typu P transportujących jony miedzi
IV. Uwagi końcowe

Contents:

I. Circulation of copper in organism
II. Diseases connected to perturbations in copper metabolism
II-1. Degeneration of central nervous system in Menkes disease
II-2. Injuries to various organs in Wilson disease
III. Properties of P-type Cu transport ATPases
IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: komórki CHO (ang. *Chinese hamster ovary cells*) — komórki nabłonka jajnika chomika chińskiego; EHBR (ang. *Eisai hyperbilirubinemic rats*) — rasa szczurów, u której występują zaburzenia aktywnego transportu organicznych anionów do żółci; GSH — glutation; KdpABC-ATPazy — ATPazy transportujące jony metali, występujące w błonie komórek prokariotycznych; LEC (ang. *Long-Evans cinnamon rats*) — rasa szczurów, u której występują zaburzenia metabolizmu miedzi; MOAT (ang. *multispecific organic anion transporter*) — transporter organicznych anionów, różnych od soli żółciowych; *MNK* — gen kodujący ATPazę transportującą jony miedzi, którego mutacje odpowiadają za rozwój choroby Menkesa; *WND* — gen kodujący ATPazę transportującą jony miedzi, którego mutacje odpowiadają za rozwój choroby Wilsona.

I. Krążenie miedzi w organizmie

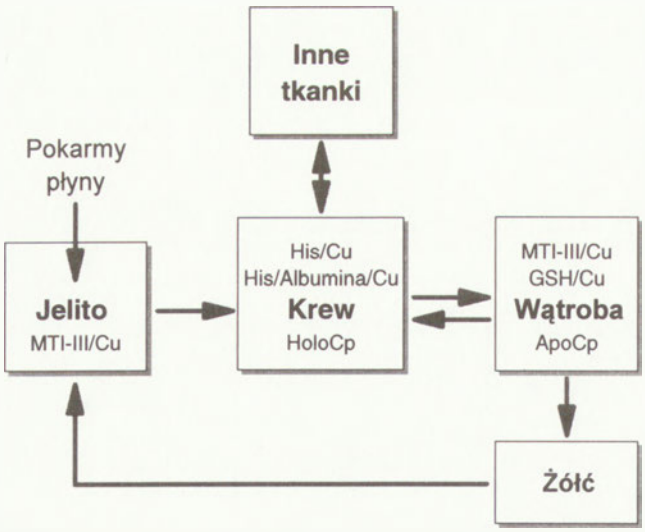
Miedź jest znana od czasów antycznych, kiedy to wiązano ją z boginią Wenus, personifikacją miłości. W organizmie miedź występuje w śladowych ilościach, ale jest niezbędna do życia [1, 2]. Stanowi bowiem składnik grup prostetycznych wielu enzymów, m.in. oksydazy cytochromu c i dysmutazy ponadtlenkowej. Miedź odgrywa rolę w regulacji ekspresji genów, transporcie jonów żelaza, metabolizmie glukozy i cholesterolu, a także bierze udział w procesach biologicznego utleniania. Dzienne zapotrzebowanie człowieka na miedź wynosi 5 miligramów. Pierwiastek ten jest niezbędny w procesach wzrostowych i w mechanizmach obronnych organizmu. Od właściwego poziomu miedzi zależy wytrzymałość kości i prawidłowy rozwój ośrodkowego układu nerwowego. Miedź uczestniczy również w dojrzewaniu erytrocytów i leukocytów oraz w cyklu skurczowo-rozkurczowym mięśnia sercowego [2].

Nadmiar miedzi jest toksyczny, zarówno dla organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych. W obecności tego pierwiastka z O_2 i H_2O_2 w reakcji Fentona powstają reaktywne formy tlenu (rodniki hydroksylowe) [3, 4]. Miedź może w ten sposób inicjować utlenianie cząsteczek enzymów, lipidów i kwasów nukleinowych [1, 5, 6]. Niedobór miedzi jest związany z chorobami dziedzicznymi np. chorobą Menkesa lub może prowadzić do wywołania schorzeń nabytych. Wynikają one przede wszystkim z niedożywienia, a towarzyszą im niedokrwistość, niedorozwój kośćca, zahamowanie wzrostu, spadek odporności organizmu na infekcje, zaburzenia krążenia i niskie ciśnienie [6].

Transport miedzi w organizmie jest niezbędny dla właściwego wykorzystania tego pierwiastka w proce-

[1] Dr, [2] Doc. dr hab., Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

http://rcin.org.pl

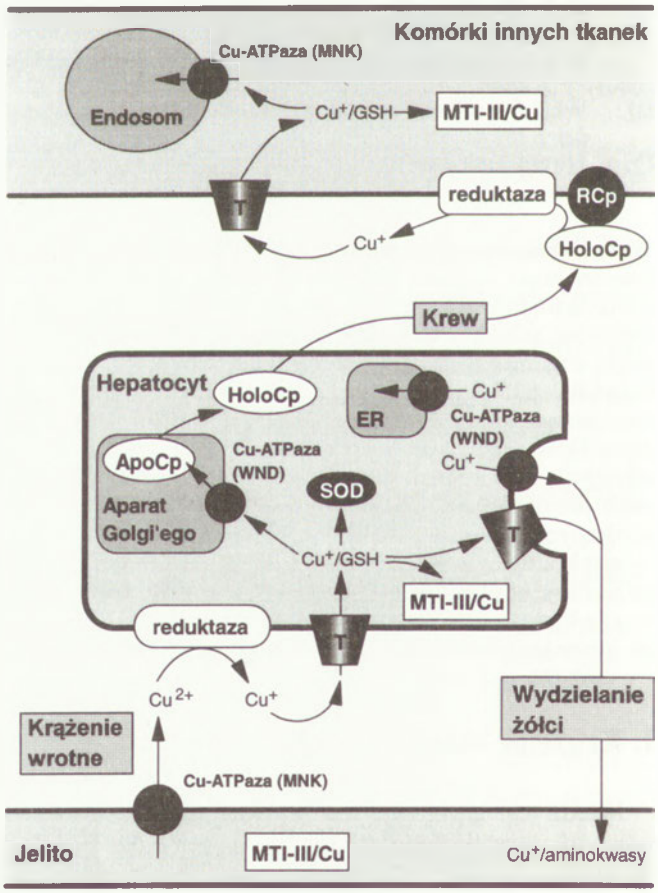


Ryc. 1. Krążenie jonów miedzi w organizmie. ApoCp i HoloCp — odpowiednio apo- i holoceruloplazmina; His — histydyna; GSH — glutation; MTI-III — metalotioneiny I-III. Objaśnienia w tekście.

sach biochemicznych i jednocześnie uniknięcia szkodliwych skutków nadmiaru lub niedoboru miedzi. W organizmach ssaków jony miedzi wchłaniane są w żołądku i jelicie cienkim (Ryc. 1). Wchłanianie to jest regulowane przez aminokwasy, kwas askorbinowy i inne składniki pokarmowe, a także jony kadmu, cynku i żelaza. W jelicie występują niskocząsteczkowe białka o wysokiej zawartości reszt cysteinowych, metalotioneiny, które wiążą jony miedzi. Z jelita jony miedzi są transportowane do wątroby, skąd w kompleksie z białkami, na drodze egzocytozy oraz dzięki aktywności ATPazy transportującej jony miedzi są wydzielane do żółci (Ryc. 2). W kompleksie z białkami jony miedzi są także wydzielane do krwi, gdzie pozostają w surowicy lub są kumulowane w erytrocytach. Tylko niewielka ilość miedzi jest wydalana z organizmu z moczem. Ilość ta wzrasta w stanach patologicznych i pochodzi z kompleksu miedzi z histydyną i albuminą. W surowicy krwi, w transporcie miedzi uczestniczy ceruloplazmina, będąca jednocześnie naturalnym przeciwutleniaczem, albumina, transkupreina i aminokwasy (histydyna) [7, 8]. Ceruloplazmina (α_2-glikoproteina) jest syntetyzowana głównie w wątrobie, w postaci apobiałka, a następnie wydzielana do osocza jako holobiałko, ze związanymi 5-6 atomami miedzi. Na błonie plazmatycznej komórek różnych tkanek znajdują się receptory ceruloplazminy, dzięki którym jony Cu^+, po oddysocjowaniu od ceruloplazminy, wnikają przez błonę plazmatyczną do cytosolu tych komórek. Jony miedzi wnikają do komórek także w kompleksie z histydyną lub w sposób zależny od albuminy. Po wniknięciu miedź gromadzi się w cytosolu lub w określonych przedziałach komórkowych, w retikulum endoplazmatycznym, jądrze, aparacie Golgi'ego, peroksysomach i lizosomach. W komórkach występują liczne białka wiążące miedź: dysmutaza ponadtlenkowa, zlokalizowana w cytosolu i peroksysomach, oksydaza cytochromowa c w mitochondriach, oraz inne enzymy zależne od miedzi zlokalizowane w aparacie Golgi'ego i organellach sekrecyjnych. W wiązaniu miedzi wewnątrz komórki biorą udział także aminokwasy i metalotioneiny, białka zlokalizowane w cytosolu, jądrze i lizosomach, których synteza indukowana jest przez jony metali ciężkich [10, 11]. Najważniejszą rolę w wiązaniu miedzi odgrywa glutation (γ-L-kwas glutaminowy-L--cysteina-glicyna), tripeptyd redukujący jony Cu^{2+} i kompleksujący jony Cu^+ [12]. W hepatocytach na przykład, 60% miedzi istnieje w postaci kompleksu Cu(I)-GSH. Miedź z tego kompleksu jest wykorzystywana w syntezie metalotionein, ceruloplazminy i dysmutazy ponadtlenkowej [13, 14]. Miedź transportowana jest z komórek przez Cu-ATPazy. Właściwości tych enzymów zostaną omówione w dalszej części artykułu.

II. Choroby związane z nieprawidłowym metabolizmem miedzi

Nadmierna kumulacja miedzi w komórkach wątroby może prowadzić do uszkodzenia tkanki i do wystąpienia wielu groźnych stanów patologicznych,



Ryc. 2. Udział Cu-ATPaz w metabolizmie miedzi w organizmie człowieka.
Cu-ATPazy MNK i WND — transportujące jony miedzi ATPazy, których funkcja jest zaburzona u ludzi z chorobą Menkesa (MNK) i chorobą Wilsona (WND); ApoCp i HoloCp — apo- i holoceruloplazmina; RCp — receptor ceruloplazminy, T — transporter odpowiedzialny za bierny transport jonów miedzi; MTI-III — metalotioneiny I-III; GSH — glutation; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa; ER — retikulum endoplazmatyczne.

http://rcin.org.pl

jak marskość wątroby i choroba Wilsona [15]. U szczurów EHBR (ang. *Eisai hyperbilirubinemic rats*), u których zaobserwowano zaburzenia aktywnego transportu organicznych anionów do żółci przez kanalikularny rejon błony plazmatycznej, katalizowanego przez ATPazę typu MOAT (ang. *multispecific organic anion transporter*), stwierdzono również zwiększoną kumulację miedzi w wątrobie [16], gdyż miedź jest usuwana z organizmu głównie do żółci [14]. Z drugiej strony groźne skutki, nawet śmierć organizmu, wywołuje niedobór tego pierwiastka (choroba Menkesa) w ośrodkowym układzie nerwowym (1—7 μg/g suchej masy, w porównaniu z 20—30 μg/g suchej masy u osób zdrowych), jelicie, nerkach i tkance łącznej, spowodowany zaburzeniem wchłaniania miedzi w układzie pokarmowym [16-18].

W ostatnich latach wykryto, że pierwotną przyczyną dwóch najczęściej występujących u ludzi, uwarunkowanych dziedzicznie chorób, Menkesa i Wilsona, związanych z nieprawidłowym metabolizmem miedzi w organizmie, jest brak, niski poziom ekspresji lub mutacje genów ATPaz transportujących jony miedzi, prowadzące do syntezy enzymów o zaburzonej funkcji [14, 19-21]. Gen, którego mutacje odpowiadają za rozwój choroby Menkesa, *MNK* (*ATP7A*), zlokalizowano na chromosomie X (rejon Xq13). Koduje on białko enzymatyczne, Cu-ATPazę, zbudowane z 1500 reszt aminokwasowych. Gen, którego mutacje odpowiadają za rozwój choroby Wilsona, *WND* (*ATP7B*), położony jest na chromosomie XII (rejon q14.3) i koduje inną Cu-ATPazę, zbudowaną z 1411 reszt aminokwasowych. Obie ATPazy należą do ATPaz typu P i zawierają sześć powtarzających się domen bogatych w reszty cysteiny, stanowiących miejsce wiązania jonów metali ciężkich. Cu-ATPazy występujące u ludzi bardzo przypominają Cu-ATPazy innych organizmów, także priokariotycznych, co świadczy o pojawieniu się tej grupy enzymów we wczesnych stadiach ewolucji życia na Ziemi, z tym, że enzymy z komórek ssaków charakteryzują się krótszym rejonem C-końcowym i dłuższym rejonem N-końcowym, w porównaniu z enzymami organizmów prokariotycznych [14, 22-25]. Mutacje genów kodujących Cu-ATPazy w komórkach zwierząt prowadzą do rozwoju podobnych chorób jak u człowieka (na przykład ang. *mottled disease* u bydła [26]). Ważnych informacji na temat chorób o objawach wskazujących na zaburzenia w transporcie miedzi dostarczyły badania szczurów LEC (ang. *Long-Evans cinnamon rats*), myszy (ang. *toxic milk mouse, mottled mouse*) i psów (ang. *bedlington terrier*) [14, 27-30].

II-1. Degeneracja ośrodkowego układu nerwowego w chorobie Menkesa

Choroba Menkesa, której przebieg jest bardzo szybki i kończy się śmiercią we wczesnym dzieciństwie, spowodowana jest niedoborem miedzi i spadkiem aktywności enzymów zależnych od tego pierwiastka. Jest to schorzenie charakteryzujące się postępującą degeneracją ośrodkowego układu nerwowego, co prowadzi do zahamowania rozwoju psychicznego [14]. Niski poziom miedzi w organizmie wiąże się z zaburzeniem wchłaniania miedzi w układzie pokarmowym. Wzrost stężenia miedzi w świetle jelita wywołuje wzmożoną syntezę metalotionein, które wiążą duże ilości miedzi, przez co spada pula tego pierwiastka dostępnego dla syntezy białek zależnych od jonów miedzi [14]. Należy podkreślić, że transport miedzi do wątroby (transportery ułatwiające dyfuzję kationów metali ciężkich, ang. *cation diffusion facilitators*) i z tego organu (holoceruloplazmina) odbywa się bez przeszkód [31].

Pacjenci z chorobą Menkesa charakteryzują się zanikiem naturalnej pigmentacji skóry, nieprawidłowym owłosieniem, zaburzeniami w układzie naczyniowym i niedorozwojem tkanki łącznej. U osób tych, już w okresie życia płodowego, występują zakłócenia w transporcie miedzi przez łożysko, w jelicie oraz przez barierę krew-mózg [14]. Pierwotną przyczyną tej choroby, jak już wspomniano, jest nieobecność lub zaburzona funkcja Cu-ATPazy, kodowanej przez gen *MNK*, którego mutacje wywołują wymienione objawy choroby [32-34]. Cu-ATPaza MNK występuje przede wszystkim w błonach cystern trans aparatu Golgi'ego, jak pokazano np. w komórkach CHO (ang. *Chinese hamster ovary cells*) [35]. W aparacie Golgi'ego zachodzi precyzyjna regulacja transportu i sortowania białek do innych przedziałów komórkowych. Proces ten polega między innymi na potranslacyjnej modyfikacji białek, przyłączaniu do nowo syntetyzowanych makrocząsteczek reszt cukrowych i innych związków, które są specyficznymi sygnałami sortującymi, umożliwiającymi właściwe rozmieszczenie białek w komórce [36]. Wydaje się, że umiejscowienie Cu-ATPazy w błonach aparatu Golgi'ego, a także w błonach innych organelli związanych z sortowaniem białek, np. endosomów, wynika z obecności w tym enzymie specyficznego rejonu transbłonowego. Rejon ten odpowiada za wbudowywanie Cu-ATPazy we właściwy system błon, w odpowiedzi na specyficzne zapotrzebowania metaboliczne komórki [18]. Taki mechanizm przypomina podobne procesy rządzące wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniem innych enzymów wiążących jony miedzi, np. monooksygenaz (β-hydroksylaza dopaminy), oksydoreduktaz (mitochondrialna oksydaza cytochromowa c) i dysmutazy ponadtlenkowej. Należy dodać, że funkcje wymienionych enzymów są zaburzone oraz, że poziom ich ekspresji jest niski u ludzi z chorobą Menkesa [37].

Cu-ATPaza MNK ulega przemieszczaniu w transporcie pęcherzykowym pomiędzy błonami aparatu Golgi'ego a błoną plazmatyczną. Podwyższenie stężenia jonów miedzi przyspiesza ten proces [36]. Jony miedzi są usuwane z komórek prawdopodobnie w procesie egzocytozy. Wiadomo, że transport miedzi z ko-

http://rcin.org.pl

mórek jest ważny dla utrzymania właściwego stężenia jonów miedzi w cytoplazmie i przeżycia komórek. Dzięki obecności Cu-ATPazy w błonach pęcherzyków wydzielniczych, jony miedzi mogą być kumulowane we wnętrzu tych pęcherzyków. Pęcherzyki wydzielnicze ulegają następnie fuzji z błoną lizosomów lub błoną plazmatyczną, dzięki czemu następuje eksport jonów miedzi z komórek, a Cu-ATPaza powraca do błon aparatu Golgi'ego, przy czym proces ten zależy od ATP [18, 36]. A zatem, Cu-ATPaza MNK pośrednio bierze udział w usuwaniu jonów miedzi [18]. Nie jest to jednak jedyne białko transportujące jony miedzi z komórek.

II-2. Uszkodzenia różnych narządów w chorobie Wilsona

Zupełnie inny mechanizm zaburzenia homeostazy miedzi występuje w chorobie Wilsona. Choroba Wilsona jest to schorzenie dziedziczone w sposób autosomalny, recesywny. Objawy kliniczne występujące u ludzi z chorobą Wilsona są spowodowane nieprawidłowym metabolizmem miedzi w wątrobie, zaburzeniami wydalania tego pierwiastka z organizmu i w efekcie gromadzeniem się miedzi w wielu narządach, co prowadzi do upośledzania funkcji tych narządów [14]. Wchłanianie miedzi w jelicie i transport do wątroby pozostają na normalnym poziomie, zaburzeniom podlegają transport jonów miedzi z hepatocytów do żółci oraz wbudowywanie jonów miedzi do apoceruloplazminy [38]. Zjawiska te wywołują wzrost puli miedzi związanej z metalotioneinami. W miarę rozwoju choroby wątroba ulega postępującym uszkodzeniom. Wysoki poziom miedzi w wątrobie prowadzi do martwicy i pojawienia się dużych ilości miedzi w krwiobiegu, ale w formie niezwiązanej z ceruloplazminą, co wywołuje uszkodzenia błony erytrocytów i w niektórych przypadkach anemię hemolityczną [14]. W późniejszych stadiach choroby dochodzi do nagromadzenia się miedzi w mózgu i w nerkach. U 95% pacjentów z postacią neurologiczną choroby Wilsona i około 50% pacjentów z objawami wątrobowymi, w rogówce oka pojawiają się żółto-brązowe, żółto-zielone lub brązowe pierścienie Kayser-Fleischera [14].

Pierwotnym objawem choroby Wilsona u 40% chorych jest uszkodzenie wątroby (żółtaczka, marskość asymptomalna, chroniczne zapalenie wątroby i inne); u następnych 40% stwierdza się objawy neurologiczne (zaburzenia mowy, ślinotok, wzmożenie napięcia, drżenie, zaburzenia chodu i inne), zaś u 15% występują objawy psychiczne (zaburzenia zachowania, depresja, stany urojeniowe) [14]. Dodatkowo, chorobie Wilsona towarzyszą osteoporoza, artretyzm i choroby stawów. U chorych z objawami wątrobowymi mogą w późniejszych stadiach wystąpić objawy neurologiczne. Do niedawna choroba Wilsona kończyła się zgonem w dzieciństwie, ale obecnie, przy prawidłowym leczeniu, granica przeżycia bardzo się przesunęła. Leczenie jest skuteczne, pod warunkiem, że rozpoznanie jest wczesne. W przypadkach szybko postępującej choroby, kiedy dochodzi do znacznych uszkodzeń wątroby wykonuje się przeszczep tego organu. W innych przypadkach stosuje się z powodzeniem związki kompleksujące jony miedzi (np. 2,3-dimerkaptopropanol, D-penicilaminę, dihydrochlorek trietyloaminy, tetratiomolibdenian) oraz terapię solami cynku. Związki te mają za zadanie mobilizację miedzi w uszkodzonych organach, w których uległa nagromadzeniu, i wzmożenie jej wydalania z organizmu [14].

Wymienione objawy choroby Wilsona są związane z zahamowaniem transportu jonów miedzi z wątroby do żółci i wzrostem stężenia tych jonów w cytoplazmie komórek. Zwiększone wydzielanie miedzi w moczu chorych na chorobę Wilsona jest spowodowane prawdopodobnie uszkodzeniem kanalików nerkowych przez złogi miedzi [14]. Zjawisko to jest bardzo ważnym czynnikiem diagnostycznym, ale nie jest przyczyną któregokolwiek z objawów klinicznych. Wydaje się, że za wzmożoną kumulację jonów miedzi w hepatocytach odpowiadają zaburzenia ekspresji lub funkcji Cu-ATPazy, zlokalizowanej w rejonie kanalikularnym błony plazmatycznej. Enzym ten bierze udział w aktywnym transporcie jonów miedzi do żółci [39-41]. Jest on kodowany przez gen *WND*, wykazujący 55% podobieństwa do genu *MNK* [42-45]. Zależny od ATP układ transportu jonów miedzi zidentyfikowano również w błonach retikulum endoplazmatycznego hepatocytów [46]. Chorobie Wilsona towarzyszy niski poziom ceruloplazminy w surowicy, co jest związane z zaburzeniami wbudowywania jonów miedzi do ceruloplazminy w trakcie jej syntezy na błonach szorstkiego retikulum endoplazmatycznego komórek wątroby i zaburzeniami wydzielania białka do krwiobiegu [14].

III. Właściwości ATPaz typu P, transportujących jony miedzi

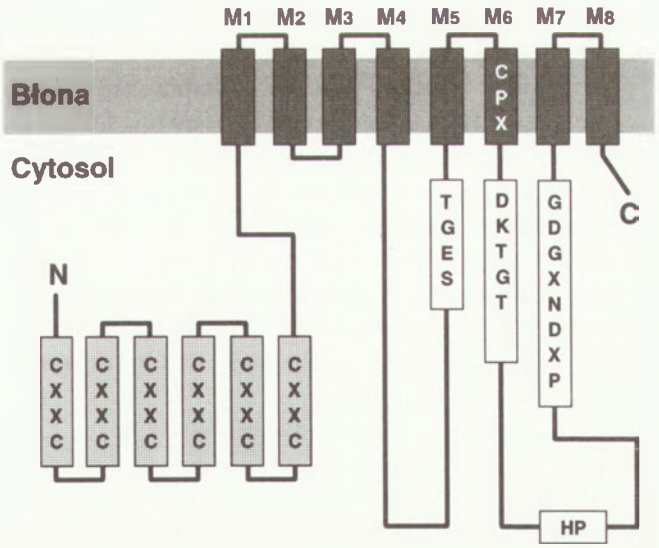
Cu-ATPazy, kodowane przez geny *MNK* i *WND* uszkodzone u ludzi z chorobami Menkesa i Wilsona, należą do grupy ATPaz transportujących jony miedzi występujących powszechnie w świecie ożywionym: od bakterii do ssaków [23]. Masy cząsteczkowe enzymów z bakterii wynoszą 71-81 kDa [47], z komórek drożdży 100-122 kDa [35], a z komórek ssaków 145-150 kDa [23-25]. Enzymy te przypominają inne ATPazy typu P, gdyż podobnie jak one ulegają autofosforylacji [48]. ATPazy typu P tworzą nadrodzinę, składającą się z ponad stu dotąd opisanych homologicznych białek enzymatycznych, ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek, zwłaszcza dla utrzymywania w nich równowagi jonowej [24, 49]. ATPazy, zarówno w komórkach organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych, są integralnymi białkami błonowymi, które katalizują aktywny transport kationów, wbrew

http://rcin.org.pl

gradientowi ich stężeń, przez błonę plazmatyczną i błony organelli wewnątrzkomórkowych. Podstawową cechą, która łączy ze sobą ATPazy typu P jest występowanie w ich cyklu katalitycznym zjawiska autofosforylacji czyli tworzenia się tzw. ufosforylowanego pośrednika, w którym grupa fosforanowa pochodząca z ATP, ulega przyłączeniu do reszty kwasu asparaginowego w cząsteczce białka. Reakcja hydrolizy ATP jest powiązana z przenoszeniem kationów przez błonę [24, 49].

Przypuszcza się, że ATPazy typu P istniały już we wczesnych etapach rozwoju organizmów żywych na naszej planecie, chociaż nie pełniły jeszcze w tym czasie kluczowej roli w utrzymaniu homeostazy kationów w cytoplazmie komórek. U zarania ewolucji doszło do podziału enzymów tej grupy na białka transportujące jony metali ciężkich i jony metali o niższych masach atomowych [25]. „PraATPazy" typu P, w swojej pierwotnej formie przetrwały do współczesnych czasów w postaci KdpABC-ATPaz organizmów prokariotycznych, na przykład Mg^{2+}-ATPaza *S. typhimurium* i Ca^{2+}-ATPaza *Synechococcus* PCC7942 [50]. ATPazy typu P organizmów eukariotycznych są poza kilkoma wyjątkami białkami monomerycznymi [24, 49]. W zależności od liczby domen w cząsteczce białka, penetrujących dwuwarstwę lipidową błony i biorących udział w tworzeniu kanału błonowego, wyróżnia się dwa podtypy tych enzymów. Podtyp pierwszy (P_1), o sześciu transbłonowych segmentach zlokalizowanych w N-końcowym rejonie cząsteczki i dwóch w rejonie C-końcowym oraz podtyp drugi (P_2), o czterech takich segmentach umiejscowionych w rejonie N-końcowym i czterech do sześciu segmentach zlokalizowanych w C-końcowym rejonie ATPazy [24, 49]. Większość występujących we współczesnych organizmach ATPaz typu P należy do podtypu P_2, grupującego białka zdolne do transportu takich kationów, jak H^+, Na^+, K^+ i Ca^{2+} [24, 49]. Inna specyficzność enzymów podtypu P_2 w stosunku do transportowanych jonów jest prawdopodobnie związana ze zwiększoną liczbą domen transbłonowych (M10-M11), w porównaniu z podtypem P_1 (M6-M8) [25]. Trzeci podtyp P_3, do którego należą KdpABC-ATPazy organizmów prokariotycznych, pod względem specyficzności w stosunku do transportowanych jonów metali przypomina podtyp P_2, z tym, że enzymy tej grupy są białkami oligomerycznymi [25]. W oparciu o dane zgromadzone na temat różnych ATPaz typu P, szczególnie transportujących jony Cu^{2+}, Cd^{2+} i Hg^{2+} (podtyp P_1), wysunięto przypuszczenie, że „praATPazy" organizmów prokariotycznych powstały w celu regulacji stężenia jonów metali ciężkich w cytoplazmie komórek tych organizmów [51].

Cu-ATPazy, dzięki obecności w ich cząsteczkach domeny o aktywności fosfatazy, ulegają autodefosforylacji, czemu towarzyszy zmiana konformacyjna białka i transport jednego lub dwóch kationów przez błonę [23-25]. Do cech odróżniających Cu-ATPazy od



Ryc. 3. Budowa Cu-ATPaz i udział domen w ich funkcjonowaniu. M1-M8 — domeny transbłonowe oznaczono kolorem ciemnoszarym; CPX — reszty aminokwasowe biorące udział w transporcie kationu; domeny zlokalizowane po cytoplazmatycznej stronie błony oznaczono kolorem białym; DKTGT — centrum aktywne enzymu zawierające resztę kwasu asparaginowego, ulegającą autofosforylacji; TGES — domena fosfatazowa; GDGXNDXP — reszty aminokwasowe biorące udział w wiązaniu ATP; HP — reszty aminokwasowe ulegające mutacji w chorobie Wilsona; CXXC — reszty aminokwasowe biorące udział w wiązaniu jonów miedzi; domeny zawierające te sekwencje oznaczono kolorem jasnoszarym. Inne objaśnienia w tekście.

innych ATPaz typu P należy obecność w cząsteczkach tych białek miejsc wiążących jony metali ciężkich (CXXC) zlokalizowanych w pobliżu polarnego N-końca białka, wewnątrzbłonowej domeny CPX, domeny HP oraz innej organizacji i liczby domen transbłonowych [25] (Ryc. 3). Domena CPX (cysteina-prolina-dowolny aminokwas) odgrywa prawdopodobnie rolę w transporcie kationów [25]. Funkcja domeny HP (histydyna-prolina) nie została jeszcze w pełni poznana, ale zauważono, że u pacjentów wykazujących objawy choroby Wilsona, reszta histydyny jest zastąpiona przez resztę kwasu glutaminowego, co prowadzi prawdopodobnie do ekspresji nieaktywnej formy białka [25]. Miejsce wiążące jony miedzi zbudowane jest z jednej do sześciu powtarzających się domen CXXC (cysteina-dowolny aminokwas-dowolny aminokwas-cysteina) [25]. W cząsteczkach niektórych ATPaz podtypu P_1 zamiast domen CXXC występują domeny bogate w reszty histydyny i metioniny, pełniące jednak tę samą funkcję [52].

Istotne dla zrozumienia etiologii chorób Menkesa i Wilsona u ludzi było stwierdzenie, że Cu-ATPaza kodowana przez gen *MNK* jest syntetyzowana w komórkach wielu organów, z wyjątkiem wątroby, podczas gdy Cu-ATPaza kodowana przez gen *WND* jest syntetyzowana przede wszystkim w komórkach wątroby. Określono także, na którym etapie metabolizmu miedzi działają wymienione ATPazy [14, 25]. Należy jednak pamiętać, że jak dotąd tylko w przypadku enzymu z bakterii *Enterococcus hirae* (CopB) zaobserwowano, że Cu-ATPaza transportuje jony miedzi [53].

http://rcin.org.pl

Większość dotychczas zebranych informacji na temat struktury i funkcji ATPaz transportujących jony w komórkach ssaków, pochodzi z porównawczych badań podobnych enzymów z komórek bakterii Gram-dodatnich [23, 54].

IV. Uwagi końcowe

Metody leczenia osób z objawami choroby Wilsona opierają się przede wszystkim na zastosowaniu związków kompleksujących jony miedzi, w celu mobilizacji miedzi w uszkodzonych organach i ułatwienia usuwania tego pierwiastka z moczem. Jednym z pierwszych związków tego typu był 2,3-dimerkaptopropanol, jednak kuracja była długotrwała i wiązała się często z występowaniem objawów niepożądanych. Obecnie powszechnie podaje się chorym D-penicilaminę. I w tym przypadku leczenie trwa całe życie. Związek ten u wielu ludzi z chorobą Wilsona, szczególnie u których występują objawy neurologiczne i zaburzenia funkcjonowania wątroby, powoduje znaczną poprawę. Często stosowane są również inne związki kompleksujące jony miedzi (tetratiomolibdenian) oraz terapia cynkowa, wykorzystująca zdolność cynku do indukowania syntezy metalotionein i zablokowanie wchłaniania miedzi w jelicie cienkim [14]. U pacjentów z ostrymi objawami choroby Wilsona konieczna jest transplantacja wątroby [55].

W przypadku choroby Menkesa stosowane metody leczenia polegają na próbach przywrócenia właściwego poziomu miedzi w organizmie. Ze względu na zaburzenia wchłaniania miedzi w jelicie, różne związki miedzi (chlorki, siarczany) lub jej kompleksy z EDTA, albuminą lub histydyną, są wstrzykiwane dootrzewnowo [14]. Najlepsze wyniki takiej kuracji daje stosowanie kompleksu miedzi z histydyną, która nawet w zdrowym organizmie odgrywa ważną rolę w homeostazie miedzi [56]. Ale i w tym przypadku leczenie nie jest w pełni skuteczne i wiele groźnych objawów choroby Menkesa nie zanika, na przykład uszkodzenia tkanki łącznej [14].

Odkrycie genów, które ulegają uszkodzeniom w chorobach Menkesa i Wilsona oraz charakterystyka białek transportujących, kodowanych przez te geny, niosą nadzieję na przyszłość. Jest bardzo prawdopodobne, że badania mechanizmów transportu miedzi przez błony, katalizowanego przez Cu-ATPazy, pozwolą na znalezienie w najbliższych latach związków terapeutycznych, które będą efektywnie zwalczać schorzenia wynikające z zaburzeń homeostazy miedzi w organizmie. Badania te nabierają szczególnego znaczenia w dobie postępującego skażenia środowiska naturalnego, w tym także metalami ciężkimi.

Podziękowanie
Praca dofinansowana z grantu KBN 4 P05A 065 08.

Artykuł otrzymano 10 maja 1997 r.
Zaakceptowano do druku 19 września 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Kaplan J, O'Halloran TV (1996) *Science* **271**: 1510-1512
2. Cox DW (1996) W: Neve J, Chappuis P, Lamand M (red) *Therapeutics Uses of Trace Elements*. Plenum Press Div Plenum Publishin Corp, New York, str. 411-419
3. Stohs SJ, Bagchi D (1995) *Free Radical Biol Med* **18**: 321-336
4. Held KD, Sylvester FC, Hopcia KL, Biaglow JE (1996) *Radiat Res* **145**: 542-553
5. Chattopadhyay A, Das-Choudhury TD, Basu MK, Datta AG (1992) *Mol Cell Biochem* **118**: 23-30
6. Harris ZL, Gittlin JD (1996) *Am J Clin Nutr* **63**: 8365-8415
7. van der Berg GJ, McArdle HJ (1994) *Biochim Biophys Acta* **1195**: 276-280
8. Vulpe CD, Packman S (1995) *Annu Rev Nutr* **15**: 293-322
9. Musci G, Bonaccorsi de Patti MC, Petruzzelli R, Giartosio A, Calabrese L (1996) *Biometals* **9**: 66-72
10. Presta A, Green AR, Zelazowski A, Stillman MJ (1995) *Eur J Biochem* **227**: 226-240
11. Aschner M (1996) *FASEB J* **10**: 1129-1136
12. Corazza A, Harvey I, Sadler PJ (1996) *Eur J Biochem* **236**: 697-705
13. Musci G, di Marco S, Bellenchi GC, Calabrese L (1996) *J Biol Chem* **271**: 1972-1978
14. Didonato M, Sarkar B (1997) *Biochim Biophys Acta* **1360**: 3-16
15. Bull PC, Cox DW (1994) *Trends Genet* **10**: 246-252
16. Ferenci P, Gilliam TC, Gittlin JD, Packman S, Schilsky ML, Sokol RJ, Sternlieb I (1996) *Hepatology* **24**: 952-958
17. Harris ED (1993) *Nutr Rev* **51**: 235-238
18. Yamaguchi Y, Heiny ME, Suzuki M, Gittlin JD (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14030-14035
19. Levinson B, Conant R, Schnur R, Das S, Packman S, Gitschier J (1996) *Human Molec Genet* **5**: 1737--1742
20. Loudianos G, Dessi V, Angius A, Lovien M, Loi A, Deiana M, Akar N, Vajro P, Figus A, Cao A, Piratsu M (1996) *Human Genetics* **98**: 640-642
21. Mercer JFB (1997) *Nutrition* **13**: 48-49
22. Odermatt A, Sutter H, Krapf R, Solioz M (1993) *J Biol Chem* **268**: 12775-12779
23. Solioz M, Odermatt A, Krapf R (1994) *FEBS Lett* **346**: 44-47
24. Møller JV, Juul B, le Maire M (1996) *Biochim Biophys Acta* **1286**: 1-51
25. Solioz M, Vulpe C (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 237-241
26. Reed V, Boyd Y (1997) *Human Molec Genet* **6**: 417-423
27. Nakamura K, Endo F, Ueno T, Awata H, Tanoue A, Matsuda I (1993) *J Biol Chem* **270**: 7658-7660
28. Cecchi C, Avner P (1996) *Genomics* **37**: 96-104
29. Theophilos MB, Cox DW, Mercer JFB (1996) *Human Molec Genet* **5**: 1619-1624
30. Cecchi C, Biasotto M, Tosi M, Avner P (1997) *Human Molec Genet* **6**: 425-433
31. Paulsen IT, Saier MH (1997) *J Membr Biol* **156**: 99-103
32. Chelly J, Turner Z, Tonneson T, Petterson A, Ischikawa-Brush Y, Horn N, Monaco AP (1993) *Nature Genet* **3**: 14-19
33. Mercer JFB, Livingston J, Hall B, Payneter JA, Begy C, Chandrasekharapa S, Lakhort P, Grimes A, Bhave M, Siemieniak D, Glover TW (1993) *Nature Genet* **3**: 20-25
34. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J (1993) *Nature Genet* **3**: 7-13
35. Dierick HA, Adam AN, Escarawilke JF, Glover TW (1997) *Human Molec Genet* **6**: 409-416
36. Petris MJ, Mercer JFB, Culvenor JG, Lockhart P, Gleeson PA, Camakaris J (1996) *EMBO J* **15**: 6084-6095
37. Petrovic N, Conci A, Ettinger MJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 28335-28340
38. Schilsky ML (1996) *Semin Liv Dis* **16**: 83-95
39. Dijkstra M, In't-Veld G, van der Berg GJ, Mul-

http://rcin.org.pl

ler M, Kuipers F, Vonk RJ (1995) *J Clin Invest* **95**: 412-416
40. Dijkstra M, van den Berg GJ, Wolters H, Int-Veld G, Sloof MJ, Heymans HS, Kuipers F, Vonk RJ (1996) *J Hepatol* **25**: 37-42
41. Dijkstra M, Vonk RJ, Kuipers F (1996) *J Hepatol* **24** (Suppl. 1): 109-120
42. Bull PC, Thomas JR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DC (1993) *Nature Genet* **3**: 327-337
43. Tonzi RE, Petrukhin K, Chenov I, Pelleguer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM (1993) *Nature Genet* **3**: 344-350
44. Yamaguchi Y, Heimy M, Gitlin J (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **197**: 271-277
45. Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC (1994) *Human Molec Genet* **3**: 1647-1657
46. Bingham MJ, Burchell A, McArdle HJ (1995) *J Physiol (London)* **482**: 583-587
47. Silver S, Phumg LT (1996) *Annu Rev Microbiol* **50**: 753-789
48. Wyler-Duda P, Solioz M (1996) *FEBS Lett* **399**: 143-146
49. Lutsenko S, Kaplan JH (1995) *Biochemistry* **34**: 15607-15613
50. Epstein W, Walderhaug MO, Polarek JW, Hesse JE, Dorus E, Daniel JM (1990) *Phil Trans R Soc Lond B* **326**: 479-487
51. Fagan MJ, Saier MH (1994) *J Mol Evol* **38**: 57-99
52. Trenor 3rd C, Lin W, Andrews NV (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1644-1650
53. Solioz M, Odermatt A (1995) *J Biol Chem* **270**: 9217-9221
54. Paulsen TI, Saier MH (1997) *J Membr Biol* **156**: 99-103
55. Schilsky ML, Scheinberg LH, Sternlieb I (1992) *Hepatology* **16**: 50a
56. Katz BM, Barnea A (1990) *J Biol Chem* **265**: 2017-2021

Fotosyntetyczna izoforma karboksylazy fosfoenolopirogronianu — regulacja transkrypcyjna i potranslacyjna

Photosynthetic isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase — transcriptional and post-translational regulation

SZECHEREZADA KATARZYNA RYDZ*

Spis treści:

I. Wprowadzenie
II. Funkcje fizjologiczne
III. Struktura cząsteczki karboksylazy fosfoenolopirogronianu
IV. Parametry kinetyczne
V. Mechanizm reakcji
VI. Regulacja aktywności fotosyntetycznej izoformy karboksylazy fosfoenolopirogronianu
VI-1. Regulacja na poziomie metabolicznym
VI-2. Regulacja kowalencyjna poprzez proces fosforylacji
VI-3. Regulacja poprzez zmianę konformacji
VII. Regulacja transkrypcji genów kodujących karboksylazę fosfoenolopirogronianu
VIII. Mechanizmy regulacji transkrypcji genów
VIII-1. Analiza struktury promotorów
VIII-2. Analiza funkcjonalna
VIII-2-1. Rośliny transgeniczne
VIII-2-2. Ekspresja przejściowa

Contents:

I. Introduction
II. Physiological functions
III. Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase molecule
IV. Kinetics parameters
V. Mechanism of reaction
VI. Regulation of activity of the photosynthetic isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase
VI-1. Regulation at the metabolic level
VI-2. Covalent regulation by phosphorylation
VI-3. Regulation by conformational changes
VII. Regulation of transcription of phosphoenolpyruvate carboxylase encoding genes
VIII. Mechanism of regulation of the genes transcription
VIII-1. Promoter structure analysis
VIII-2. Functional analysis
VIII-2-1. Transgenic plants
VIII-2-2. Transient expression

Wykaz stosowanych skrótów: ASP — asparaginian; C3 — roślina o metabolizmie fotosyntetycznym C3; C4 — roślina o metabolizmie fotosyntetycznym C4; CAM — *crassulacean acid metabolism*; cGMP — cykliczny guanozynomonofosforan; DTT — ditiotreitol; GUS — β-glukuronidaza; G-6-P — glukozo-6-fosforan; karboksy-P — karboksyfosforan; LHCP — *light harvesting chlorophyll a/b binding protein complex*; MA — jabłczan; OAA — szczawiooctan; PA — pirogronian; PEP — fosfoenolopirogronian; PEPC — karboksylaza fosfoenolopirogronianu; Pi — nieorganiczny ortofosforan; Rubisco — karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu; RUBP — rybulozo-1,5-bisfosforan; Vm — szybkość maksymalna reakcji enzymatycznej.

* Mgr, Zakład Bioenergetyki Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

http://rcin.org.pl

I. Wprowadzenie

Karboksylaza fosfoenolopirogronianu (EC 4.1.1.31; PEPC) katalizuje praktycznie nieodwracalną reakcję β-karboksylacji fosfoenolopirogronianu w obecności dwuwęglanu, w wyniku której powstają szczawiooctan i nieorganiczny fosforan. Enzym ten został odkryty w 1953 roku [1] i od tego czasu jest przedmiotem licznych badań. Prace te doprowadziły do stwierdzenia obecności różnych izoform karboksylazy fosfoenolopirogronianu, biorących udział w różnych procesach na terenie komórki. Wszystkie izoformy PEPC są zlokalizowane w komórkach na terenie cytoplazmy, lecz wykazują różną specyficzność tkankową i funkcjonalną [2-4]. Enzym ten występuje u roślin wyższych, glonów i *Eubacteriae*. Nie stwierdzono natomiast jego obecności u zwierząt i grzybów, u których reakcję karboksylacji fosfoenolopirogronianu katalizuje jedynie karboksykinaza fosfoenolopirogronianu (EC 4.1.1.32) [5, 6].

Ostatni poświęcony karboksylazie fosfoenolopirogronianu artykuł przeglądowy ukazał się w *Postępach Biochemii* dziesięć lat temu [7]. Od tego czasu wiedza dotycząca tego enzymu znacznie się rozszerzyła, zwłaszcza jeśli chodzi o zagadnienia związane z jego regulacją na poziomach transkrypcyjnym i potranslacyjnym. Te właśnie problemy omówione będą w niniejszym artykule na przykładzie fotosyntetycznej izoformy karboksylazy fosfoenolopirogronianu z roślin C4 i CAM. Ta izoforma wzbudzała od początku największe zainteresowanie badaczy, jako kluczowy enzym odpowiedzialny za pierwotne włączanie dwutlenku węgla w fotosyntezie typu C4. Zainteresowany czytelnik może sięgnąć również po inne opublikowane w ostatnich dziesięciu latach artykuły źródłowe i przeglądowe dotyczące karboksylazy fosfoenolopirogronianu — jej struktury i regulacji [8-11], izoform i ich funkcji fizjologicznych w komórkach [12, 13], mechanizmu i kinetyki katalizowanej reakcji [14, 15] oraz ewolucji na poziomie molekularnym [6, 16].

II. Funkcje fizjologiczne

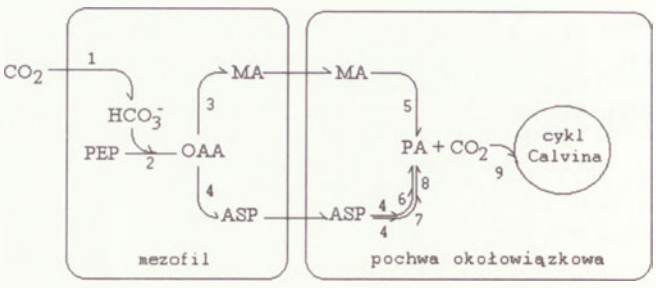
Karboksylaza fosfoenolopirogronianu pełni funkcję anaplerotyczną. Cykl Krebsa oprócz dostarczania protonów i elektronów dla łańcucha oddechowego w procesie oddychania jest również źródłem podstawowych akceptorów amoniaku dla reakcji jego włączania do związków organicznych. W syntetyzującej komórce ma więc miejsce ciągły odpływ produktów pośrednich cyklu Krebsa, a ich poziom musi być uzupełniany na drodze karboksylacji produktów glikolizy: pirogronianu z udziałem karboksylazy pirogronianowej (EC 6.4.1.1) i dehydrogenazy jabłczanowej dekarboksylującej (EC 1.1.1.40) lub fosfoenolopirogronianu z udziałem karboksylazy fosfoenolopirogronianu (EC 4.1.1.31) i karboksykinazy fosfoenolopirogronianu (EC 4.1.1.32) [17]. Funkcja anaplerotyczna karboksylazy fosfoenolopirogronianu jest szczególnie istotna w takich stadiach rozwojowych rośliny, w których intensywność reakcji anabolicznych jest nasilona, a więc w trakcie dojrzewania owoców [18], dojrzewania i kiełkowania nasion [19-21], oddziaływania między słupkiem i kiełkującą łagiewką pyłkową [22] a także w czasie symbiotycznego włączania azotu atmosferycznego w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych [23-25].

PEPC bierze udział w regulacji pH wewnątrzkomórkowego współdziałając z dehydrogenazą jabłczanową zależną od NAD^+ i dehydrogenazą jabłczanową dekarboksylującą zależną od $NADP^+$ [26, 27]. Ten ostatni enzym oraz PEPC mają różne optima pH (dla PEPC jest ono wyższe), w zależności od wahań pH cytoplazmy uruchamiane są więc na przemian aktywność karboksylująca PEPC lub dekarboksylująca dehydrogenazy jabłczanowej, co powoduje akumulację lub degradację kwasów dwukarboksylowych i odpowiednio spadek lub wzrost pH cytoplazmy.

Karboksylaza fosfoenolopirogronianu pozwala utrzymać równowagę jonową komórek w czasie pobierania i transportu kationów. Klasycznym tego przykładem jest synteza jabłczanu ze szczawiooctanu w komórkach szparkowych, towarzysząca napływowi jonów potasu z otaczających komórek epidermy w czasie otwierania aparatów szparkowych [28, 29].

U roślin typu C4 i CAM karboksylaza fosfoenolopirogronianu katalizuje reakcję pierwotnego wiązania dwutlenku węgla w procesie fotosyntezy (izoforma fotosyntetyczna PEPC) [31, 31]. U tych roślin pierwszym akceptorem CO_2 jest PEP, który po karboksylacji daje szczawiooctan, związek niestabilny, który jest natychmiast metabolizowany do jabłczanu lub asparaginianu. Związki te są transportowane do komórek pochwy okołowiązkowej. Tam ulegają one dekarboksylacji, dostarczając CO_2 do cyklu Calvina (Ryc. 1).

Fotosynteza typu C4 charakteryzuje się rozdziałem czasowo-przestrzennym poszczególnych etapów. Rozdział przestrzenny, oparty na wiązkowej budowie liści,



Ryc. 1. Schemat wiązania CO_2 u roślin C4 i CAM.
1, anhydraza węglanowa; 2, karboksylaza fosfoenolopirogronianu; 3, dehydrogenaza jabłczanowa zależna od $NADP^+$; 4, aminotransferaza asparaginianowa; 5, dehydrogenaza jabłczanowa dekarboksylująca zależna od $NADP^+$; 6, karboksykinaza fosfoenolopirogronianu zależna od ATP; 7, dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NAD^+; 8, dehydrogenaza jabłczanowa dekarboksylująca zależna od NAD^+; 9, karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu.

http://rcin.org.pl

polega na tym, że synteza szczawiooctanu ma miejsce na terenie komórek mezofilu, natomiast karboksylacja RUBP i pozostałe reakcje cyklu Calvina zachodzą w komórkach pochwy okołowiązkowej. Natomiast w tkankach roślin gruboszowatych te same procesy metaboliczne są rozdzielone w czasie. Karboksylacja PEP i gromadzenie kwasów dwuwęglowych (zwłaszcza jabłczanu) zachodzą podczas nocy, zaś w ciągu dnia zachodzi dekarboksylacja nagromadzonego jabłczanu, dostarczając CO_2 do cyklu Calvina. Ten rodzaj fotosyntezy wymaga specjalizacji organów i komórek na poziomie anatomicznym i funkcjonalnym [32], ciągłego transportu metabolitów fotosyntetycznych [27] oraz bardzo skomplikowanych mechanizmów regulacji enzymów [33].

III. Struktura cząsteczki karboksylazy fosfoenolopirogronianu

Generalnie uważa się, że u roślin karboksylaza fosfoenolopirogronianu jest homotetramerem o masie molekularnej poszczególnych podjednostek około 110 kDa [8], niemniej jednak *in vitro* stwierdza się obecność również innych form strukturalnych enzymu. Dzięki technice elektroforezy w żelu denaturującym zaobserwowano formy dimeryczne, trimeryczne, tetrameryczne a także monomery [34, 35]. Tetramery są formą najczęściej obserwowaną, wykazują większą aktywność niż dimery, monomery natomiast są nieaktywne [36-39].

Teoretycznie występują dwie możliwości organizacji przestrzennej podjednostek tetrameru: pseudo-tetraedr [35] lub kwadrat [34]. Rzeczywista struktura przestrzenna tetrameru nie jest jeszcze znana, zbadanie jej umożliwią, podejmowane obecnie w różnych laboratoriach doświadczenia z użyciem techniki dyfrakcji promieni Roentgena na kryształach PEPC hodowanych *in vitro*.

Struktura czwartorzędowa enzymu stabilizowana jest dzięki obecności reszt cysteinowych i histydynowych [40]. Związki chemiczne reagujące z tiolami i histydyną hamują aktywność PEPC i powodują dysocjację tetrameru do dimeru, a następnie do monomeru. PEP i Mg^{2+} chronią enzym przed dysocjacją, wiążąc się z resztą histydynową. Nie obserwuje się ścisłej stechiometrii pomiędzy konwersją dimeru do tetrameru (którą można uzyskać działając hydroksylaminą i DTT) a wzrostem aktywności enzymu [36]. Zmiana struktury czwartorzędowej białka wiąże się najprawdopodobniej z modyfikacją konformacji poszczególnych podjednostek, która ma wpływ na właściwości miejsca aktywnego [35, 36]. Także inne czynniki, takie jak stężenie enzymu, pH, siła jonowa, temperatura, obecność oraz stężenie glicerolu i efektorów metabolicznych mogą *in vitro* zmieniać stopień oligomeryzacji PEPC [34-37, 39, 41, 42].

IV. Parametry kinetyczne

W optymalnym pH (pH 8-8,5) krzywa nasycenia fosfoenolopirogronianem przyjmuje kształt hiperboli typowej dla modelu Michaelisa-Menten z wartością Km około 1 mM. Dla niższych wartości pH (pH 7) krzywa przybiera kształt sigmoidalny, a wartość Km dla substratu wzrasta [5, 43]. U zbadanych do tej pory roślin C4 (sorgo, kukurydza, trzcina cukrowa) stężenia fizjologiczne PEP (około 3 mM) nie wysycają enzymu w warunkach pH fizjologicznego. U roślin C3 wartości Km dla PEP są niższe niż dla roślin C4 [1, 44, 45].

Karboksylaza fosfoenolopirogronianu do działania wymaga obecności jonu dwuwartościowego. Rolę tę *in vivo* pełni najprawdopodobniej magnez. *In vitro* bardzo dobrym kofaktorem jest mangan, zaś nieco mniej efektywnym — kobalt [8]. Natomiast wapń, cynk i rtęć hamują aktywność PEPC [46, 47].

Rola jonów magnezu w katalizie nie jest jeszcze w pełni poznana. Wydaje się [48, 49], że jon metalu dwuwartościowego ułatwia łączenie się substratu z enzymem poprzez tworzenie potrójnego kompleksu „enzym-metal-PEP". Jony magnezu i manganu mogą wiązać się z PEPC nawet pod nieobecność PEP [49, 50]. Kompleks metal-PEP uważany jest za substrat aktywny [47, 51, 52]. Mimo że doświadczenia nad chemiczną modyfikacją PEPC wskazują, że magnez nie jest konieczny do wiązania PEP, w jego obecności powinowactwo enzymu do tego substratu jest znacznie wyższe [8]. Drugim substratem enzymu jest jon HCO_3^- [48]. Dla PEPC z liści kukurydzy wartość Km dla dwuwęglanu wynosi 20 mM przy pH 7 [43], 100 mM przy pH 8 i 160 mM przy pH 9,5 [5].

Aktywność PEPC zależy od pH, którego optimum wynosi około 8-8,5 [5, 38]. Pomiędzy pH 7 i 8 aktywność PEPC silnie wzrasta oraz zmianie ulegają parametry kinetyczne enzymu. W szczególności, powinowactwo PEPC otrzymanej z liści kukurydzy do PEP i Mg^{2+} wzrasta pomiędzy pH 7,5 i 8,5, zmniejsza się natomiast dla wartości pH niższych niż 7,5 i wyższych niż 9,5. Podobnie Km dla dwuwęglanu wzrasta wraz ze wzrostem pH (patrz wyżej). Wrażliwość na efektory allosteryczne (jabłczan, glukozo-6-fosforan) również w dużym stopniu zależy od pH — wzrasta ona wraz ze spadkiem pH [47].

U sorgo, kukurydzy i prosa temperatury optymalne dla PEPC wynoszą odpowiednio 42, 39 i 38°C. Dziesięciominutowa inkubacja PEPC *in vitro* w buforze bez regulatorów allosterycznych w temperaturze 50°C powoduje zupełną inaktywację enzymu u tych roślin [53]. Inkubacja w obecności asparaginianu, jabłczanu lub szczawiooctanu chroni enzym przed termiczną denaturacją, co pozwala na jego działanie w temperaturach dochodzących do 55°C [54]. Tę właściwość PEPC uważa się za jedną z cech związanych z adaptacją roślin C4 do klimatu suchego i gorącego.

Po inkubacji w niskich temperaturach (0-4°C) aktywność PEPC roślin C4 obniża się znacznie i parametry kinetyczne ulegają zmianie. Zmiany te można wiązać z mniejszą lub większą dysocjacją enzymu na

http://rcin.org.pl

podjednostki. Inaktywacja PEPC jest tym większa im wyższe jest pH roztworu inkubacyjnego i im bardziej rozcieńczony jest enzym w roztworze. Obecność PEP chroni enzym przed inaktywacją [55].

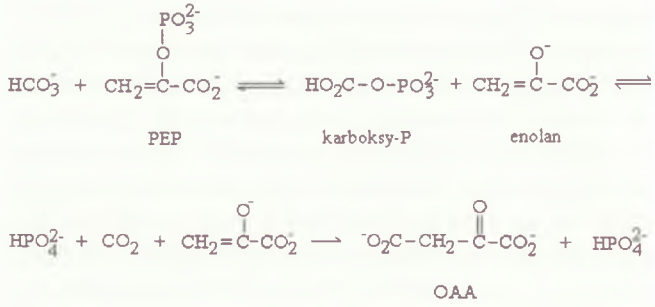
V. Mechanizm reakcji

Reakcja β-karboksylacji fosfoenolopirogronianu katalizowana przez PEPC jest silnie egzoergiczna, a więc praktycznie nieodwracalna [5, 13, 47, 56]. Na podstawie doświadczeń z użyciem izotopu tlenu ^{18}O, początkowo wnioskowano, że proces karboksylacji przebiega jednoetapowo [48]. Późniejsze badania [47, 57, 58] dowiodły, że karboksylacja zachodzi w dwóch etapach. Substraty i Mg^{2+} przyłączają się do enzymu w kolejności: Mg^{2+}, PEP, HCO_3^-. Najpierw tworzone są karboksyfosforan i stabilizowany magnezem enolopirogronian. Karboksyfosforan rozpada się następnie na związany z enzymem CO_2 i nieorganiczny fosforan. Cząsteczka CO_2 reaguje z enolopirogronianem tworząc szczawiooctan (Ryc. 2). Po zakończeniu tego cyklu przemian szczawiooctan i Pi są uwalniane przez enzym.

Struktura miejsca aktywnego enzymu została ustalona dzięki modyfikacjom chemicznym białka. Na przykład, fosforan pirydoksalu (PLP) hamuje aktywność PEPC z liści kukurydzy, przyłączając się do reszty lizynowej. Lizyna stanowi więc prawdopodobnie część miejsca katalitycznego enzymu, ponieważ zarówno fosfoenolopirogronian jak i magnez chronią go przed hamującym wpływem PLP. Co więcej, analiza widm karboksylazy fosfoenolopirogronianu fotoutlenionej w obecności fosforanu pirydoksalu pokazała, że histydyna i arginina stanowią również część miejsca aktywnego [40, 59].

Obserwacje te zostały potwierdzone w doświadczeniach ukierunkowanej mutagenezy [60] i analizy sekwencji aminokwasowej PEPC z różnych roślin [10, 61]. Stwierdzono obecność konserwatywnych domen. W szczególności motywy: «VfTAHPT» (aminokwasy pisane wielką literą są konserwatywne w 100%) z resztą histydynową, «QqVMvGYSDSgKDaG» z resztą lizynową i fragment «FHGRGGtvGRGGgP» bogaty w reszty glicynowe, wchodzą w skład miejsca aktywnego PEPC [59, 62] położonego na C-końcu enzymu.

Grupy tiolowe mają istotny wpływ na aktywność PEPC. Powyżej omówiono już związek reszt -SH ze strukturą czwartorzędową białka. Reszty te występują też prawdopodobnie bezpośrednio w miejscu aktywnym enzymu. Inkubacja oczyszczonej PEPC z liści kukurydzy w obecności reduktora (DTT), powodowała dwukrotne zwiększenie aktywności katalitycznej bez zmiany stałych katalitycznych [63]. Odmienne obserwacje poczynili Chardot i Wedding [64], którzy stwierdzili zmniejszenie Km^{PEP} dla PEPC aktywowanej ditiotreitolem. Wpływ tego związku nie jest więc zupełnie jasny. Chlorek miedzi ($CuCl_2$) hamuje aktywność enzymu [63, 65], nie zmieniając struktury czwartorzędowej [36]. Dane te wskazują, że reszty cysteinowe biorą udział w wiązaniu substratów z enzymem.



Ryc. 2. Mechanizm karboksylacji fosfoenolopirogronianu przez karboksylazę fosfoenolopirogronianu.

VI. Regulacja aktywności fotosyntetycznej izoformy karboksylazy fosfoenolopirogronianu

VI-1. Regulacja na poziomie metabolicznym

Dla PEPC optymalne pH wynosi około 8, pH komórki roślinnej (7-7,5) jest więc suboptymalne dla enzymu. Powoduje to dużą wrażliwość PEPC na regulację metaboliczną.

Aktywność PEPC jest regulowana przez metabolity fotosyntetyczne. W warunkach pH fizjologicznego jabłczan, asparaginian i pośredniki cyklu Krebsa powodują hamowanie enzymu. Jabłczan może wiązać się z tetramerem PEPC kooperatywnie, powodując hamowanie kompetycyjne. [8, 66, 67]. Aktywatorami allosterycznymi PEPC i antagonistami jabłczanu są natomiast fosforany cukrów, jak na przykład glukozo-6-fosforan, fruktozo-1,6-bisfosforan czy fosforan dihydroksyacetonu [8, 10, 69, 69]. G-6-P zwiększa powinowactwo PEPC do fosfoenolopirogronianu i zmienia krzywą zależności od stężenia PEP z sigmoidalnej na hiperbolę typową dla równania Michaelisa-Menten [70]. Jedynie u roślin C4 jednoliściennych, dodatkowo funkcję aktywatora PEPC pełni glicyna. Zwiększa ona Vm enzymu, nie zmieniając Km^{PEP} [71, 72].

VI-2. Regulacja kowalencyjna poprzez proces fosforylacji

W komórkach *Eucaryota* karboksylaza fosfoenolopirogronianu ulega odwracalnej fosforylacji, katalizowanej przez kinazę PEPC, której aktywność jest stymulowana w świetle. Ta modyfikacja potranslacyjna jest drugim sposobem regulacji aktywności PEPC obok kontroli metabolicznej.

Pierwsze doniesienia dotyczące fosforylacji PEPC dotyczyły roślin typu CAM. Cechą podstawową PEPC u roślin CAM jest rytm dobowy, według którego zmieniają się jej właściwości enzymatyczne,

http://rcin.org.pl

w szczególności Km^{PEP} i Ki dla jabłczanu oraz aktywność katalityczna. U roślin CAM, wiązanie dwutlenku węgla zachodzi nocą, kiedy to aktywność PEPC jest bardzo wysoka a wrażliwość na hamowanie przez jabłczan stosunkowo niska. Istnieją więc dwa stany fizjologiczne PEPC-CAM: stan «nocny» o niskim Km^{PEP} i wysokim Ki dla jabłczanu (3 mM) oraz «dzienny» o wysokim Km^{PEP} i niskim Ki (0,3 mM) [73-75]. Znakowanie enzymu z liści *Bryophyllum fedtschenkoi* i *Kalanchoe daigremontiana in vitro* za pomocą izotopu fosforu ^{32}P, wykazało że wyłącznie forma «nocna» enzymu ulega fosforylacji [74, 76, 77]. Stan ufosforylowania enzymu jest więc skorelowany z jego aktywnością.

Proces odwracalnej fosforylacji PEPC występuje również u roślin C4 [78-80]. Aktywność katalityczna i wartość Ki dla jabłczanu są wyższe w okresie wiązania CO_2, czyli w czasie dnia. Odpowiada to stanowi ufosforylowania PEPC. W ciemności, PEPC podlega defosforylacji przy udziale na razie nie zidentyfikowanej fosfatazy białkowej. Proces ten powoduje utratę aktywności przez enzym. U kukurydzy i sorga fosforylacja *in vitro* nieufosforylowanej PEPC z użyciem fosforu ^{32}P pozwoliły umiejscowić domenę ulegającą fosforylacji w N-końcu enzymu [78, 80-84]. Sekwencja aminokwasowa tej domeny jest następująca: «RHHSIDAQL», co odpowiada serynie numer 8 i 15 odpowiednio u sorga i kukurydzy.

Biosynteza PEPC typu C4 z sorga w komórkach *Escherichia coli*, wyniki badań z użyciem ukierunkowanej mutagenezy oraz modyfikacje chemiczne cząsteczki (karboksymetylacja i karboksyamidometylacja chimerycznego białka) wykazały, że fosforylacja wpływa na właściwości PEPC poprzez wprowadzenie ładunku ujemnego w pozycji 8 [85, 86]. Reakcja fosforylacji jest stosunkowo wolna (około 90 min) i towarzyszy jej synteza kinazy PEPC zależnej od światła [78, 82, 87, 88].

VI-3. Regulacja poprzez zmianę konformacji

Uważa się że, przynajmniej u roślin gruboszowatych, modyfikacje struktury czwartorzędowej mogą zmieniać własności funkcjonalne PEPC w rytmie dobowym. Aktywność PEPC izolowanej z liści *Crassula argentea* jest regulowana poprzez dysocjację tetrameru (forma «dzienna» o niskiej aktywności) do dimeru (forma «nocna» wysoce aktywna) [89-91].

U kukurydzy, substraty enzymu (PEP, magnez i dwuwęglan) oraz aktywator allosteryczny G-6-P stabilizują tetramer i chronią go przed dysocjacją. Z kolei jabłczan ma wpływ odwrotny — faworyzuje dysocjację [39, 92, 93]. Wpływ struktury czwartorzędowej na funkcjonowanie PEPC u roślin C3 i C4 nie jest jednak zupełnie jasny, gdyż niektórzy autorzy sugerują, że niezależnie od struktury czwartorzędowej, wyłącznie fosforylacja jest odpowiedzialna za zmiany aktywności enzymu [37, 94].

VII. Regulacja transkrypcji genów kodujących karboksylazę fosfoenolopirogronianu

U bakterii gen kodujący karboksylazę fosfoenolopirogronianu jest obecny w genomie w formie pojedynczej kopii. U *Eucaryota* PEPC jest kodowana przez rodzinę genów [6, 95, 96]. U sorga sklonowano i zsekwencjonowano trzy geny kodujące PEPC [61, 97, 98]. Geny te nazwano *SvC3*, *SvC4* i *SvC3RI*. Nazwy odpowiadają profilom ekspresji: «Sv» oznacza *Sorghum vulgare*, «RI» — (ang. *root inducible*) ulegający ekspresji indukowanej w korzeniach, «C3» i «C4» oznaczają funkcję metaboliczną kodowanej izoformy.

Ekspresję tych trzech genów badano przy pomocy hybrydyzacji RNA wyizolowanego z różnych organów roślin ze znakowanymi radioaktywnym fosforem fragmentami niekodujących fragmentów 3' klonów genomowych. W wyniku dodatkowych doświadczeń transkrypcji *in vitro* z użyciem jąder komórkowych wyizolowanych z liści oraz hybrydyzacji wytworzonego znakowanego mRNA z sondą specyficzną, wykazano, że gen *ScC3* jest genem konstytutywnym, ulegającym ekspresji na niskim poziomie we wszystkich organach rośliny. Ekspresję genu *SvC3RI* obserwowano we wszystkich organach rośliny, na terenie korzeni była ona stymulowana jonami NH_4^+ [72, 99]. Gen *SvC4* ulega ekspresji wyłącznie w komórkach mezofilu liści. Jego transkrypcja jest uzależniona od światła i kontrolowana przez fitochrom [99, 100]. Ilość mRNA genu *SvC4* zmienia się też w rytmie dobowym [101] i zależy od rodzaju źródła azotu (jony azotanowe lub amonowe) w pożywce [72].

Ekspresja genów kodujących PEPC u sorga zależna jest więc od licznych bodźców zewnętrznych (światło, źródło azotu) oraz wewnętrznych (fitochrom, specyfika komórkowa). Badania mechanizmów regulacyjnych kontrolujących transkrypcję wymagają znajomości struktury i funkcjonowania promotorów tych genów.

VIII. Mechanizmy regulacji transkrypcji genów

VIII-1. Analiza struktury promotorów

Obecnie znamy sekwencje 20 różnych genów kodujących PEPC [6]. Pomiędzy sekwencjami aminokwasowymi wyznaczonymi na podstawie sekwencji nukleotydowych występuje duży stopień homologii u różnych roślin. Pewne domeny, np. miejsce fosforylacji na N-końcu są homologiczne w 100%. Na poziomie struktury białka nie można więc wyjaśnić źródeł specyfiki ekspresji różnych izoform PEPC: C3, C4 i CAM. Jednak w przeciwieństwie do białka oraz części kodującej genu, promotory różnych genów kodujących PEPC są bardzo różne i wykazują tylko nikły stopień homologii.

Promotor genu *SvC4* zawiera domeny homologiczne z domenami występującymi w genie kodującym

http://rcin.org.pl

izoformę fotosyntetyczną PEPC u kukurydzy oraz w regulowanych przez światło genach *cab* i *rbcS* kodujących odpowiednio białka systemu LHCP oraz małą podjednostkę Rubisco [102-104]. Wykazano, że sekwencja RS2 w promotorze genu kodującego PEPC C4 u kukurydzy jest miejscem wiązania się dwóch białek jądrowych MNF2a i MNF2b [105, 106]. Białko MNF2a jest prawdopodobnie represorem transkrypcji tego genu w ciemności, gdyż jego obecność stwierdza się tylko w ekstraktach białkowych pochodzących z liści etiolowanych, nie wykryto go w liściach zielonych. Oprócz tego, u tej samej rośliny sklonowano i zsekwencjonowano trzy białka MNB1a, MNB1b i MNF1 wykazujące powinowactwo do sekwencji RS1 (obecnej także w promotorze genu *SvC4* u sorga) [105-108]. cDNa białka MNB1a wykazuje homologię z białkami HMG (ang. *high mobility group*), białko MNB1b nie jest homologiczne z żadnym znanym białkiem. Sekwencja RS2 jest również miejscem wiązania dla innego białka zwanego PEP1 [109]. Białko to występuje w ekstraktach z liści zielonych i nie stwierdzono jego obecności w liściach etiolowanych. Mógłby to być zatem aktywator ekspresji genu kodującego PEPC C4 u kukurydzy.

Sekwencje zgodne RS1, RS2 i RS3 (wszystkie trzy obecne w promotorach genów kodujących PEPC C4 u kukurydzy i sorga) [105] występują w regionie promotora bogatym w zasady GC. Jednym ze znanych mechanizmów regulacji ekspresji genów jest metylacja bogatych w GC rejonów w obrębie ich promotorów [110-113]. U kukurydzy występuje odwrotna korelacja pomiędzy ilością względną mRNA dla PEPC C4 oraz poziomem metylacji fragmentu genomu zawierającego gen kodujący PEPC C4 [114]. Demetylacja danego rejonu w promotorze genu kodującego PEPC C4 u tej rośliny była skorelowana z akumulacją mRNA i białka PEPC w komórkach mezofilu liści [115]. Zważywszy na podobieństwo struktury promotorów, prawdopodobne wydaje się występowanie podobnego mechanizmu regulacji ekspresji genu *SvC4* u sorga.

Promotor genu *SvC4* posiada też rejon bogaty w zasady AT (pomiędzy -425 a -500 parą zasad — numeracja począwszy od miejsca startu translacji). Sekwencje bogate w pary AT występują w promotorach genów *rbcS* i *cab* u groszku, gdzie są miejscem wiązania białka AT-1, które jest prawdopodobnie zaangażowane w regulację transkrypcji tych genów przez światło [116]. W genie *cab-ml* u kukurydzy, sekwencja zgodna «AT-1» oddziałuje jako element pozytywny lub negatywny w zależności od tkanki. Wydaje się, że bierze ona udział w represji genu w komórkach pochwy okołowiązkowej i w aktywacji genu w komórkach mezofilu [117].

W promotorze genu kodującego PEPC u *Mesembryanthemum crystallinum*, rośliny u której metabolizm CAM indukowany jest zasoleniem, występują dwie sekwencje bogate w pary AT. Sekwencje te są miejscem wiązania trzech białek PCTA-1, 2 i 3 [118]. Ilość białka PCTA-1 i jego zdolność do wiązania się z DNA w ekstraktach z roślin poddanych stresowi są skorelowane ze wzrostem poziomu transkrypcji genu *ppc1* w trakcie trwania stresu. Kompleks DNA-PCAT-2 obserwuje się natomiast wyłącznie w ekstraktach białek jądrowych z korzeni lub liści roślin kontrolnych. W obu tych przypadkach poziom transkrypcji badanego genu jest bardzo niski w porównaniu z poziomem transkrypcji w liściach roślin poddanych stresowi [119]. Zależność ta sugeruje, że białko PCAT-2 może być represorem ekspresji genu *ppc1*.

Rola sekwencji bogatych w pary AT w regulacji ekspresji genów u roślin nie jest do tej pory jasna. Wydaje się, że mogą one odgrywać bądź rolę pozytywną [118, 120-123], bądź negatywną [116, 118, 124] w zależności od badanego przypadku.

Gen *SvC4* u sorga ulega transkrypcji wyłącznie w komórkach mezofilu. U kukurydzy zidentyfikowano do tej pory dwie sekwencje odpowiedzialne za ekspresję tkankowo specyficzną genów kodujących dikinazę pirogronian-ortofosforan (PPDK) [125] oraz genu *cab* [117]. Sekwencja komplementarna do miejsca wiązania białka regulatorowego w promotorze genu *PPDK* («CTCCAT») wykazuje wysoką homologię do sekwencji zgodnych z promotorów genów kodujących PEPC C4 («CTCCACAT»).

VIII-2. Analiza funkcjonalna

Analizę funkcjonalną promotorów przeprowadza się poprzez badanie roślin transgenicznych oraz doświadczenia ekspresji przejściowej genów reporterowych pod kontrolą badanych promotorów.

VIII-2-1. Rośliny transgeniczne

Wprowadzanie nowych genów do genomu roślin jednoliściennych sprawia duże kłopoty ze względu na brak efektywnej techniki wprowadzenia DNA transgenu do komórki oraz regeneracji roślin. Rośliny jednoliścienne są mało wrażliwe na zakażanie przez *Agrobacterium*. W tym przypadku stosuje się więc elektroporację lub transformację przy użyciu glikolu polietylenowego protoplastów komórek roślinnych oraz bombardowanie organów i tkanek przy pomocy cząsteczek pokrytych przenoszonym DNA. Chociaż techniki te zaowocowały otrzymaniem płodnych roślin kukurydzy i ryżu, otrzymywanie jednoliściennych roślin transgenicznych nie jest jeszcze czynnością rutynową [126-128].

Ekspresja genów roślin C4 w systemie C3 napotyka na trudności spowodowane odmiennością mechanizmów wycinania intronów genów roślin jednoliściennych u roślin dwuliściennych oraz regulacji stabilności mRNA. Pomimo występowania tych problemów wykorzystując system heterologiczny otrzymano kilka interesujących danych. Gen *SvC4* z sorga ulega ekspresji w liściach transgenicznego tytoniu, nie ulega natomiast ekspresji w korzeniach, co może sugerować,

http://rcin.org.pl

że region 5' promotora tego genu długości 2,4 kb wprowadzony razem z DNA regionu kodującego jest w stanie prowadzić ekspresję tkankowo-specyficzną [129].

Promotor genu PEPC C4 kukurydzy jest aktywny w transgenicznym tytoniu [130-131]. Aktywność transkrypcyjna jest wyższa w liściach niż w korzeniach, co wskazuje, że promotor typu C4 wystarcza dla ekspresji tkankowo specyficznej w liściach.

Promotory dwóch karboksylaz (PEPC i Rubisco) kontrolują ekspresję zależną od światła i specyficzną dla komórek mezofilu liści, genu reporterowego GUS u rośliny C3 ryżu [132]. Te doświadczenia pokazują, że systemy regulacji, kontrolujące ekspresję tkankowo-specyficzną i zależną od światła genów kodujących PEPC i Rubisco, są te same u roślin C4 i C3.

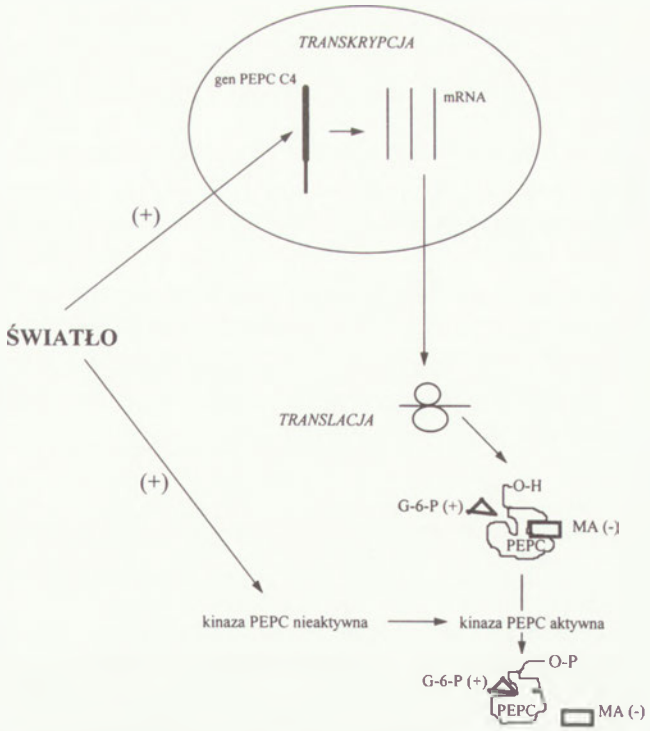
VIII-2-2. Ekspresja przejściowa

Doświadczenia ekspresji przejściowej kasety ekspresyjnej złożonej z promotora genu kodującego PEPC C4 kukurydzy i genu reporterowego GUS w protoplastach wykazały, że promotor ten zapewnia poziom ekspresji porównywalny z promotorem genu kodującego 35S RNA wirusa mozaiki kalafiora [133]. Analiza delecji i mutageneza różnych fragmentów promotora genu PEPC C4 wykazały, że fragment długości około 200 par zasad, zawierający sekwencje nukleotydowe TATA, CAAT i RS2 wystarcza do wysokiej ekspresji.

Ekspresja wszystkich trzech genów kodujących PEPC u kukurydzy (*pepcZm1* — typ C4, *pepcZm2a* i *pepcZm2b* — typy niefotosyntetyczne) wykazuje specyficzność tkankową. Pomimo tego w systemie ekspresji przejściowej w protoplastach mezofilu liści, aktywność genu *pepcZm1* jest konstytutywna i niewrażliwa na światło. W przeciwieństwie do promotorów pozostałych genów regulowanych przez światło u kukurydzy (*RbcS*, *cab*) [103, 134], kiedy to obserwowano natychmiastową odpowiedź na światło, indukcja genu kodującego PEPC C4, jest prawdopodobnie związana ze zależnymi od światła zmianami morfogenetycznymi, zachodzącymi w przeciągu długiego czasu. Tak więc, przynajmniej u kukurydzy, światło wyzwalające ekspresję różnych genów fotosyntetycznych w czasie zielenienia roślin działa na co najmniej dwóch niezależnych drogach przewodzenia sygnału.

Podobne wyniki otrzymano techniką bombardowania tkanek za pomocą DNA. Stwierdzono, że fragment promotora genu *SvC4* długości 600 par zasad jest wystarczający do ekspresji tkankowospecyficznej w komórkach mezofilu liści u sorga [72]. Te doniesienia są w zgodzie z wynikami doświadczeń wykazujących, że fragment długości 510 par zasad promotora genu kodującego PEPC C4 u kukurydzy, zawierający trzy kopie sekwencji RS2, jest konieczny i wystarczający dla wydajnej ekspresji genu reporterowego GUS w liściach [109].

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe wyniki analizy funkcjonalnej promotorów genów kodujących PEPC C4 można stwierdzić, że przynajmniej w części, informacja warunkująca specyficzną regulację tych genów znajduje się w części proksymalnej ich promotorów. Obecność sekwencji homologicznych w promotorach genów kodujących PEPC C4 u różnych gatunków roślin oraz w innych genach regulowanych przez światło sugeruje, że odgrywają one pewną rolę w regulacji transkrypcji. Prawdopodobnie sekwencje te są miejscem wiązania się czynników transkrypcyjnych. Oddziaływanie pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi i promotorem genu jest w istocie etapem końcowym całego ciągu elementów łańcucha przekazu sygnału świetlnego, który kontroluje aktywność genów od niego zależnych.



Ryc. 3. Schemat regulacji przez światło ekspresji izoformy fotosyntetycznej karboksylazy fosfoenolopirogronianu.

Podsumowując można stwierdzić, że światło jest nadrzędnym czynnikiem regulującym ekspresję izoformy fotosyntetycznej karboksylazy fosfoenolopirogronianu na kilku poziomach (Ryc. 3). Na poziomie transkrypcyjnym światło aktywuje transkrypcję genu kodującego PEPC C4, natomiast na poziomie potranslacyjnym, poprzez metabolity fotosyntetyczne oraz proces odwracalnej fosforylacji, reguluje aktywność katalityczną białka. Równie złożony system kontroli zapewnia sprawne funkcjonowanie w zmiennych warunkach środowiskowych tego kluczowego dla fotosyntezy typu C4 enzymu.

Podziękowanie
Napisanie tego artykułu było możliwe dzięki finansowaniu autorki przez Grant KBN 385/P04/95/08 oraz przez Polsko-Francuskie Centrum Biotechnologii Roślin (CNRS, KBN).

Artykuł otrzymano 2 czerwca 1997 r.
Zaakceptowano do druku 18 września 1997 r.

http://rcin.org.pl

Piśmiennictwo

1. Bandurski RS, Greiner CM (1953) *J Biol Chem* **204**: 781-786
2. Perrot-Rechenmann C, Vidal J, Brulfert J, Burlet A, Gadal P (1982) *Planta* **155**: 24-30
3. Gadal P, Perrot-Rechenmann C, Vidal J (1983) *Physiol Vég* **21**: 1055-1062
4. Schnarrenberger C, Herbert M (1983) *Physiol Vég* **21**: 1047-1054
5. O'Leary MH (1982) *Ann Rev Plant Physiol* **33**: 297-315
6. Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, Gadal P, Crétin C (1994) *Plant Sci* **99**: 111-124
7. Marczewski W (1987) *Post Biochem* **33**: 29-43
8. Andreo CS, Gonzales DH, Iglesias AA (1987) *FEBS Lett* **213**: 1-8
9. Jiao JA, Chollet R (1991) *Plant Physiol* **95**: 981-985
10. Rajagopalan AV, Devi MT, Raghavendra AS (1994) *Photos Res* **39**: 115-135
11. Chollet R, Vidal J, O'Leary MH (1996) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 273-298
12. Deroche ME, Carrayol E (1988) *Physiol Plant* **74**: 775-782
13. Stiborova M (1988) *Photosynthetica* **22**: 240-263
14. Gonzales DH, Andreo CS (1989) *Trends Biochem Sci* **14**: 24-27
15. Outlaw WH Jr (1990) *Biochem Physiol Pflanzen* **186**: 317-325
16. Toh H, Kawamura T, Izui K (1994) *Plant Cell Environ* **17**: 31-43
17. Melzer E, O'Leary MM (1987) *Plant Physiol* **84**: 58-60
18. Blanke MM, Notton BA (1991) *J Plant Physiol* **137**: 553-558
19. Khayat E, Dumbroff EB, Glick BR (1991) *Biochem Cell Biol* **69**: 141-145
20. Macnicol PK, Jacobsen JV (1992) *Plant Physiol* **98**: 1098-1104
21. Sangwan RS, Singh N, Plaxton WC (1992) *Plant Physiol* **99**: 445-449
22. Jansen MAK, Sessa G, Malkin S, Fluhr R (1992) *Plant J* **2**: 507-515
23. Schuller KA, Turpin DH, Plaxton WC (1990) *Plant Physiol* **94**: 1429-1435
24. Day DA, Copeland L (1991) *Plant Physiol Biochem* **29**: 185-201
25. Vance CP, Gantt JS (1992) *Physiol Plant* **85**: 266-274
26. Davies DD (1986) *Physiol Plant* **67**: 702-706
27. Kurkdjian A, Guern J (1989) *Plant Mol Biol* **40**: 271-303
28. Tallman G (1992) *Critical Rev Plant Sci* **11**: 35-37
29. Denecke M, Schulz M, Fischer C, Schnabl H (1993) *Physiol Plant* **87**: 96-102
30. Hatch MD, Slack CR (1970) *Ann Rev Plant Physiol* **21**: 141-162
31. Hatch MD, Osmond CB (1976) W: Stocking CR, Heber U (red) Encyklopedia of Plant Physiology t 3. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, str. 144-184
32. Laetsch WM (1974) *Ann Rev Plant Physiol* **25**: 27-52
33. Iglesias AA, Plaxton WC, Podesta FE (1993) *Photos Res* **35**: 205-211
34. Stiborova M, Leblova S (1986) *FEBS Lett* **205**: 32-34
35. Jiao JA, Shi J (1987) *Scientia Sinica* **30**: 1060-1069
36. Walker GH, Ku MSB, Edwards GE (1986) *Plant Physiol* **80**: 848-855
37. McNaughton GAL, Fewson CA, Wilkins MB, Nimmo HG (1989) *Biochem J* **261**: 349-355
38. Jawali N (1990) *Arch Biochem Biophys* **277**: 61-68
39. Willeford KO, Wu MX, Meyer CR, Wedding RT (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 778-785
40. Podesta FE, Iglesias AA, Andreo CS (1986) *Arch Biochem Biophys* **246**: 546-553
41. Wagner R, Gonzalez DH, Podesta FE, Andreo CS (1987) *Eur J Biochem* **164**: 661-666
42. Podesta FE, Andreo CS (1989) *Plant Physiol* **90**: 427-433
43. Uedan K, Sugiyama T (1976) *Plant Physiol* **57**: 906-910
44. Ting IP, Osmond CB (1973) *Plant Physiol* **51**: 439-447
45. Ting IP, Osmond CB (1973) *Plant Physiol* **51**: 448-453
46. Gavalas NA, Manetas Y (1980) *Z Pflanzenphysiol* **100**: 179-184
47. O'Leary MH, Rife JE, Slateer JD (1981) *Biochemistry* **20**: 7308-7314
48. Maruyama H, Easterday RL, Chang HC, Lane MD (1966) *J Biol Chem* **241**: 2405-2412
49. Miziorko HM, Nowak T, Mildvan AS (1974) *Arch Biochem Biophys* **163**: 378-389
50. Lopez-Pozos R, Rodriguez-Sotres R, Munoz--Clares RA (1990) *J Plant Physiol* **136**: 451-457
51. Wedding RT, Rustin P, Meyer CR, Black MK (1988) *Plant Physiol* **88**: 976-979
52. Janc JW, O'Leary MH, Cleland WW (1992) *Biochemistry* **31**: 6421-6426
53. Mares J, Leblova S (1980) *Photosynthetica* **14**: 25-31
54. Huber SC, Edwards GE (1975) *Plant Physiol* **56**: 324-331
55. Kleczkowski LA, Edwards GE (1990) *Z Naturforsch* **45**: 42-46
56. Janc JW, Cleland WW, O'Leary MH (1992) *Biochemistry* **31**: 6441-6446
57. Fujita N, Izui K, Nishino T, Katsuki H (1984) *Biochemistry* **23**: 1774-1779
58. Janc JW, Urbauer JL, O'Leary MH, Cleland WW (1992) *Biochemistry* **31**: 6432-6440
59. Jiao JA, Podesta FE, Chollet R, O'Leary MH, Andreo CS (1990) *Biochem Biophys Acta* **1041**: 291-295
60. Terada K, Izui K (1991) *Eur J Biochem* **202**: 797-803
61. Lepiniec L, Keryer E, Philippe H, Gadal P, Crétin C (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 487-502
62. Terada K, Yano M, Izui K (1992) W: Murata NV (red) Research in Photosynthesis, t. 3. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, str. 823-826
63. Iglesias AA, Andreo CS (1984) *Plant Physiol* **75**: 983-987
64. Chardot TP, Wedding RT (1992) *Plant Physiol* **98**: 780-783
65. Iglesias AA, Andreo CS (1984) *Photos Res* **5**: 215-226
66. Raghavendra AS, Das VSR (1976) *Z Pflanzenphysiol* **78**: 434-437
67. Gonzales DH, Iglesias AA, Andreo CS (1984) *J Plant Physiol* **116**: 425-434
68. Doncaster HD, Leegood RC (1987) *Plant Physiol* **84**: 82-87
69. Wedding RT, Black MK, Meyer CR (1989) *Plant Physiol* **90**: 648-652
70. Huber SC, Edwards GE (1975) *Can J Bot* **53**: 1925-1933
71. Nishikido T, Takanashi H (1973) *Biochem Biophys Res Comm* **53**: 126-133
72. Lepiniec L (1993) Etude de la famille multigénique codant pour la phosphoénolpyruvate carboxylase du sorgho: fonctions, régulations et évolution, Rozprawa doktorska, Université Paris XI, Orsay, str. 46-75
73. Winter K (1980) *Plant Physiol* **65**: 792-796
74. Nimmo GA, Nimmo HG, Fewson CA, Wilkins MB (1984) *FEBS Lett* **178**: 199-203
75. Krüger I, Kluge M (1987) *Bot Acta* **101**: 24-27
76. Brulfert J, Vidal J, Le Maréchal P, Gadal P, Queiroz O, Kluge M, Krüger T (1986) *Biochem Biophys Res Comm* **136**: 151-159
77. Nimmo GA, Nimmo HG, Hamilton D, Fewson A, Wilkins B (1986) *Biochem J* **239**: 213-220
78. Budde RJA, Chollet R (1986) *Plant Physiol* **82**: 1107-1114
79. Nimmo GA, McNaughton GAL, Fewson CA, Wilkins MB, Nimmo HG (1987) *FEBS Lett* **213**: 18-22
80. Guidici-Orticoni MT, Vidal J, Le Maréchal P, Thomas M, Gadal P, Rémy R (1988) *Biochemie* **70**: 769-772
81. Jiao JA, Chollet R (1988) *Arch Biochem Biophys* **261**: 409-417
82. Jiao JA, Chollet R (1989) *Arch Biochem Biophys* **269**: 526-535
83. Jiao JA, Chollet R (1990) *Arch Biochem Biophys* **283**: 300-305
84. Jiao JA, Vidal J, Eschevaria C, Chollet R (1991) *Plant Physiol* **96**: 297-301
85. Wang YH, Duff SMG, Lepiniec L, Crétin C, Sarath G, Condon SA, Vidal J, Gadal P, Chollet R (1992) *J Biol Chem* **267**: 16759-16762

http://rcin.org.pl

86. Duff SMG, Lepiniec L, Crétin C, Andreo CS, Condon SA, Sarath G, Vidal J, Gadal P, Chollet R (1993) *Arch Biochem Biophys* **306**: 272-276
87. Echevarria C, Vidal J, Jiao JA, Chollet R (1990) *FEBS Lett* **275**: 25-28
88. Bakrim N, Echevarria C, Crétin C, Arrio-Dupont M, Pierre JN, Vidal J, Chollet R, Gadal P (1992) *Eur J Biochem* **204**: 821-830
89. Wu MX, Wedding RT (1985) *Arch Biochem Biophys* **240**: 655-662
90. Wu MX, Wedding RT (1985) *Plant Physiol* **77**: 667-675
91. Meyer CR, Willeford KO, Wedding RT (1991) *Arch Biochem Biophys* **288**: 343-349
92. Wu MX, Meyer CR, Willeford KO, Wedding RT (1990) *Arch. Biochem Biophys* **281**: 324-329
93. Willeford KO, Wedding RT (1992) *Plant Physiol* **99**: 755-758
94. Arrio-Dupont M, Bakrim N, Echevarria C, Gadal P, Le Maréchal P, Vidal J (1992) *Plant Sci* **81**: 37-46
95. Matsuoka M, Hata S (1987) *Plant Physiol* **85**: 947-951
96. Yanai Y, Okumura S, Shimada H (1994) *Biosci Biotech Biochem* **58**: 950-953
97. Lepiniec L, Santi S, Keryer E, Amiet V, Vidal J, Gadal P, Crétin C (1991) *Plant Mol Biol* **17**: 1077-1079
98. Lepiniec L, Keryer E, Tagu D, Gadal P, Crétin C (1992) *Plant Mol Biol* **19**: 339-342
99. Crétin C, Santi S, Keryer E, Lepiniec L, Tagu D, Vidal J, Gadal P (1991) *Gene* **99**: 87-94
100. Thomas M, Crétin C, Vidal J, Keryer E, Gadal P, Monsinger E (1990) *Plant Sci* **69**: 65-78
101. Thomas M (1987) Photorégulation de la phosphoénolpyruvate carboxylase des feuilles de sorgho: étude de la transduction et de la transcription, Rozprawa Doktorska, Université Paris XI, Orsay, str. 164-169
102. Schindler U, Cashmore AR (1990) *EMBO J* **9**: 3415-3427
103. Schäffner AR, Sheen J (1991) *Plant Cell* **3**: 997-1012
104. Becker TW, Templeman TS, Viret JF, Bogorad L (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 49-60
105. Yanagisawa S, Izui K (1990) *Mol Gen Genet* **224**: 325-332
106. Yanagisawa S, Izui K (1992) W: Murata NV (red) Research in Photosynthesis, t 3. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, str. 839-842
107. Yanagisawa S, Izui K (1992) *Plant Mol Biol* **19**: 545-553
108. Yanagisawa S, Izui K (1993) *J Biol Chem* **268**: 16028-16036
109. Kano-Murakami Y, Matsuoka M (1992) W: Murata NV (red) Research in Photosynthesis, t 3. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, str. 843-846
110. Bird A (1986) *Nature* **321**: 209-213
111. Bianchi M, Viotti A (1988) *Plant Mol Biol* **11**: 203-214
112. Razin A, Cedar H (1991) *Microbiol Rev* **55**: 451-458
113. Bird A (1992) *Cell* **70**: 5-8
114. Ngernprasirtsiri J, Chollet R, Kobayasi H, Sugiyama T, Akazawa T (1989) *J Biol Chem* **264**: 8241-8248
115. Langdale JA, Taylor WC, Nelson T (1991) *Mol Gen Genet* **225**: 49-55
116. Datta N, Cashmore AR (1989) *Plant Cell* **1**: 1069-1077
117. Bansal KC, Bogorad L (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4057-4061
118. Cushman JC, Bohnert HJ (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 411-424
119. Cushman JC, Meyer G, Michalowski CB, Schmitt JM, Bohnert HJ (1989) *Plant Cell* **1**: 715-725
120. Timko MP, Kausch AP, Castresana C, Fassler J, Herrera-Estrella L, Van den Broeck G, Van Montagu M, Schell J, Cashmore AR (1985) *Nature* **318**: 579-582
121. Forde BG, Freeman J, Oliver JE, Pineda M (1990) *Plant Cell* **2**: 925-939
122. Lam E, Kano-Murakami Y, Gilmartin P, Niner B, Chua NH (1990) *Plant Cell* **2**: 857-866
123. Bustos MM, Begum D, Kalkan FA, Battraw MJ, Hall TC (1991) *EMBO J* **10**: 1469-1479
124. Castresana C, Garcia-Luque I, Alonso E, Malik VS, Cashmore AR (1988) *EMBO J* **7**: 1929-1936
125. Matsuoka M, Numazawa T (1991) *Mol Gen Genet* **228**: 143-152
126. Potrikus I (1990) *Biotechnology* **6**: 535-542
127. Vasil V, Redway F, Vasil IK (1990) *Biotechnology* **8**: 429-434
128. Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1990) *Biotechnology* **10**: 667-674
129. Tagu D, Crétin C, Bergonioux C, Lepiniec L, Gadal P (1991) *Plant Cell Rep* **9**: 688-690
130. Matsuoka M, Sanada Y (1991) *Mol Gen Genet* **225**: 411-419
131. Hudspeth RL, Grula JW, Dai Z, Edwards GE, Ku MSB (1992) *Plant Physiol* **98**: 458-464
132. Matsuoka M, Kyozuka J, Shimamoto K, Kano-Murakami Y (1994) *Plant J* **6**: 311-319
133. Schäffner AR, Sheen J (1992) *Plant J* **2**: 221-232
134. Sheen J (1991) *Plant Cell* **3**: 225-245

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.

http://rcin.org.pl

Komunikaty Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

NAGRODY

W konkursie o nagrodę im. Jakuba Karola Parnasa laury przypadły zespołowi: Danuta Płochocka, Marek Wełnicki, Piotr Zielenkiewicz, Włodzimierz Ostoja-Zagórski z Instytutu Biochemii i Biofizyki w Warszawie za publikację „Threedimensional model of the potyviral genome-linked protein" ogłoszoną w Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1996, 93, 12150-12154. Sponsorem nagrody jest Molecular Research Center z San Sineti, USA, za sprawą dr Piotra Chomczyńskiego.

W konkursie o nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego laureatami zostali: mgr Bogdan Falkiewicz i prof. dr hab. chem. Bogdan Liberek z Zespołu Chemii Aminokwasów i Peptydów Uniwersytetu Gdańskiego. Nagrodzone prace: „Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy I" oraz „Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy II" opublikowane zostały w 42 tomie „Postępów Biochemii" odpowiednio w nr 1, 41-47 oraz w nr 4, str 340-349 w 1996 r.

W pierwszej edycji Konkursu Sekcji Kwasów Nukleinowych PTBioch i Firmy Sigma-Aldrich nagroda przypadła zespołowi: Lucyna Woźniak, J. Pyzowski, Wojciech J. Stec z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Łodzi za publikację: „New approach to the synthesis of oligo (nucleoside methane phosphonate)s" ogłoszoną w J. Organic Chemistry 1996, 61, 879-881

Przyznano dwie równorzędne **nagrody w Konkursie im. Włodzimierza Mozołowskiego;** otrzymali je: p. Magdalena Pęska za prezentację: „Współdziałanie (cross-talk) różnych dróg sygnałowych w regulacji ekspresji genu dekarboksylazy ornitynowej (ODC) w nerce mysiej" oraz p. Marcin Szmidt z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu za pracę „Ludzki homolog genu *lethal (2)neighbour of tid Drosophila melanogaster* jako nowy marker zmian nowotworowych"

W Konkursie im. Janiny Opieńskiej-Blauth nagrodę przyznano studentowi V roku (obecnie) Tomaszowi Wojciechowskiemu z Koła Naukowego przy Katedrze Biochemii AM w Gdańsku za prezentację „Histochemiczna metoda wykrywania produktów peroksydacji lipidów".

Opłata członkowska PTBioch w 1998 r. wynosi 20 zł,
a studencka — 7 zł

Prenumerata roczna „Postępów Biochemii":
dla nie zrzeszonych w PTBioch 30 zł
dla członków PTBioch .....15 zł
dla instytucji.....60 zł

http://rcin.org.pl

Roczny spis treści tom 43, nr 1, 2, 3, 4, 1997

ARTYKUŁY

Jarosław Marszałek — Współdziałanie białek fagowych i bakteryjnych w replikacji DNA bakteriofaga 5

Małgorzata Żarko-Podstawka, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska — Liniowy chromosom prokariotyczny: struktura i synteza telomerów 12

Elżbieta Dziabaszewska — Organizacja i struktura genomu wirusów *Papilloma* 18

Małgorzata Sidorkiewicz — „X" - ostatnia niewiadoma wirusa zapalenia wątroby typu B? Gen X i produkty jego ekspresji 25

Marek Jurgowiak, Ryszard Oliński — Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA związane z rozwojem stanów patologicznych i starzeniem 30

Beata Gubernator, Jarosław Króliczewski, Jacek Rybka, Andrzej Szczepaniak — Białko Rieskego - składnik transmembranowych kompleksów cytochromowych 41

Iwona Fijałkowska — Inhibitor białka C: jego właściwości, funkcje i znaczenie w układzie równowagi hemostatycznej 51

Piotr Kuśnierczyk — Nobel nierychliwy, ale sprawiedliwy: odkrycie restrykcji MHC nagrodzone po 22 latach (Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny w roku 1996) . . 66

Krystyna Dzierzbicka, Magdalena Gozdowska, Aleksander M. Kołodziejczyk — Synergistyczne efekty immunomodulatorów typu muramylopeptydów i innych leków stosowanych wspólnie w chemioterapii . . . 73

Andrzej Gindzieński, Krzysztof Zwierz — Episjalina - nowopoznany składnik glikokaliksu i błony komórkowej komórek nabłonkowych 80

Piotr Widłak — Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego 85

Anna Tobiasz, Teresa Żołądek — System ubikwitynacji i jego rola u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 91

Iwona J. Fijałkowska, Piotr Jończyk — Koordynacja syntezy nici prowadzącej i opóźnionej DNA w widełkach replikacyjnych 98

Małgorzata Sidorkiewicz — „X" ostatnia niewiadoma wirusa zapalenia wątroby typu B? Transaktywujące i onkogenne własności białka XHBV? 105

Joanna Bandorowicz-Pikuła, Sławomir Pikuła — Wewnątrzkomórkowe białka wiążące ATP 111

Anna Moczarska — Zmiany w domenie regulatorowej główki miozyny obserwowane w niektórych chorobach serca 120

Andrzej A. Kasprzak — Jak funkcjonuje miozyna? 134

Renata Dąbrowska, Dariusz Stępkowski — Rola łańcuchów lekkich miozyny 143

Łukasz Humieniecki, Ryszard Słomski — Dystrofia miotoniczna 151

Ewa M. Koźma, Andrzej Głowacki, Krystyna Olczyk, Magdalena Jaźwiec — Proteoglikany - struktura i funkcje 158

Julian Świerczyński, Zdzisław Kochan, Joanna Karbowska — Geny otyłości . . . 174

Krystyna I. Wolska — Terminacja transkrypcji bakteryjnej 182

Grzegorz Ira — Wyspy CpG — niezmetylowane odcinki DNA w genach kręgowców . . 189

Karol Białkowski, Ryszard Oliński — Metabolizm fosforanów 8-oxodG 199

Piotr Mucha, Agnieszka Szyk, Gotfryd Kupryszewski, Jan Barciszewski — Elektroforeza kapilarna: narzędzie analizy biomolekuł 208

Marta Miączyńska — Funkcjonowanie GTPaz typu Rab/Ypt i ich białek eskortujących w regulacji transportu błonowego 231

http://rcin.org.pl

Tomasz Hubert Zastawny — Oksydacyjne uszkodzenia DNA - wolnorodnikowe modyfikacje zasad i dezoksyrybozy 238

Małgorzata Jungerman — Ilościowa technika PCR i jej zastosowanie w molekularnej diagnostyce hematologicznej 250

Marek Figlerowicz — Rekombinacja genetyczna (+) RNA wirusów 257

Mirosława Z. Barciszewska — Tektonika RNA 267

Elżbieta Rębas, Lilla Lachowicz — Pozagenomowe działanie steroidów w układzie nerwowym 274

Joanna Bandorowicz-Pikuła, Sławomir Pikuła — Zaburzenia homeostazy miedzi są przyczyną groźnych chorób człowieka 281

Szecherezada Katarzyna Rydz — Fotosyntetyczna izoforma karboksylazy fosfoenolopirogronianu - regulacja transkrypcyjna i potranslacyjna 287

INNE

David Shugar — Profesor David Shugar doktorem Honoris Causa Uniwersytetu Warszawskiego 2

Wspomnienia — Zofia Lassota 226

Wspomnienia — Karol Taylor 227

Kazimierz Zakrzewski — Zaproszenie do dyskusji — List do Redakcji 58

Piotr Laidler — Sprawozdanie z XXXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . 59

Komunikat Komisji Słownictwa 173

Grzegorz Bartosz — Uczmy biochemii poprawnie 216

Sprawozdania 218

Indeks autorów prac przeglądowych, tom 43, 1997

B

Bandorowicz-Pikuła J — Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Barciszewska ZM — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
Barciszewski J — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
Białkowski K — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 80-092 Bydgoszcz
Bujarski JJ — Plant molecular Biology Center and Department of Biological Sciences, Northern Illinois University, DeKalb, IL 60115 USA

D

Dąbrowska Renata — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Dziabaszewska E — Zakład Diagnostyki Patomorfologicznej Narządów Płciowych IGiP AM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
Dzierzbicka K — Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

F

Figlerowicz M — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
Fijałkowska I — Pracownia Biologii Molekularnej, Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź
Fijałkowska IJ — Pracownia Mutagenezy i Reperacji DNA, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

G

Gindzieński A — Zakład Chemii Ogólnej i Organicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok
Głowacki A — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec
Gozdowska M — Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk
Gubernator B — Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

http://rcin.org.pl

H

Huminiecki Ł — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań i Imperial Cancer Research Fundation, Oxford University, John Radclife Hospital, Oxford OX 391, England

I

Ira G — Pracownia Genetyki IBiOS, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

J

Jaźwiec M — Oddział Urazowo-Ortopedyczny, Szpital Miejski nr 1, ul. Zegadłowicza 3, 41-200 Sosnowiec
Jungerman M — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
Jurgowiak M — dr, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 80-092 Bydgoszcz

K

Karbowska J — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej, Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
Kasprzak AA — Centre de Rocherches de Biochchimie Macromoleculaire, Centre National de la Recherche Scientifique B.P. 5051, 1019 Route de Mende, 34033 Montpellier Cedex, Francja
Kochan Z — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej, Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
Kołodziejczyk AM — Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk
Koźma EM — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec
Króliczewski J — Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław
Kupryszewski G — Instytut Oceanologii PAN, 81-712 Sopot
Kuśnierczyk P — Laboratorium Immunogenetyki, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

L

Lachowicz L — II Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

M

Marszałek J — Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii AMG/UG Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822
Miączyńska M — Cell Biology Programme, EMBL Meyerhofstr 1, D-69012, Heidelberg, Germany
Moczarska A — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Mucha P — Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, 80-952 Gdańsk

O

Olczyk K — Oddział Urazowo-Ortopedyczny, Szpital Miejski nr 1, ul. Zegadłowicza 3, 41-200 Sosnowiec
Oliński R — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 80-092 Bydgoszcz

P

Pikuła S — Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

R

Rekowski P — Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, 80-952 Gdańsk
Rębas E — II Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź
Rybka J — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław
Rydz SK — Zakład Bioenergetyki Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin U.W., ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

S

Sidorkiewicz M — I Zakład Biochemii IFiB Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź
Słomski R. — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
Stępkowski D — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Szczepaniak A — Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław
Szyk A — Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, 80-952 Gdańsk

Ś

Świerczyński J — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej, Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

T

Tobiasz A — Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

W

Widłak P — Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

http://rcin.org.pl

Wolska KI — Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytet Warszawski, ul. Nowy Świat 67, 00-046 Warszawa

Z

Zakrzewska-Czerwińska J — Zakład Mikrobiologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław
Zastawny HT — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-094 Bydgoszcz
Zwierz K — Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok

Ż

Żarko-Podstawka M — Syngen Biotech, ul. Trzemeska 12, 53-679 Wrocław
Żołądek T — Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

NOWE WYDAWNICTWA PTBIOCH.:

1) „HORMONY GLIKOPROTEINOWE — Struktura, biosynteza i funkcja ich oligosacharydów" cena 5,- zł
Monografia biochemiczna nr 41
autor Iwona Żak i Marian Dróżdż
rok wydania 1996

2) „WŁODZIMIERZ MOZOŁOWSKI 1895—1975 w 100-lecie urodzin" cena 25,- zł
Wydawca Oddział Gdański PTBioch. r. 1995
pod red. Wiesława Makarewicza praca zbiorowa

http://rcin.org.pl

InGen

Zakład Badawczo-Wdrożeniowy i Inżynierii Genetycznej TERPOL Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne SA w Sieradzu

Szanowni Państwo,

przedstawiamy ofertę naszych usług w zakresie inżynierii genetycznej oraz wysokiej jakości produktów dla biologii molekularnej.

Zakład od 1989 roku prowadzi prace badawcze w dziedzinie biotechnologii opartej na metodach inżynierii genetycznej. Posiadamy wieloletnie doświadczenie w stosowaniu metod biologii molekularnej: amplifikacji DNA metodą PCR, klonowania i sekwencjonowania DNA, ekspresji heterologicznych białek w *Escherichia coli*, izolowania i oczyszczania białek rekombinacyjnych otrzymanych w *E. coli*. W Zakładzie po raz pierwszy w Polsce otrzymano oczyszczone i potwierdzone przez analizę sekwencji aminokwasowej białko rekombinacyjne. Wiele z opracowanych oryginalnych rozwiązań technologicznych chronionych jest patentami.

Współpracujemy z szeregiem placówek naukowych w kraju.

Dyrektorem naukowym Zakładu jest prof. dr hab. Andrzej Płucienniczak, kierownikiem dr Andrzej Szczepanek.

Oferujemy usługi w zakresie:

— technik inżynierii genetycznej: izolowanie DNA z otrzymanego materiału, klonowanie, konstrukcja wektorów plazmidowych
— amplifikacji DNA metodą PCR
— ekspresji heterologicznych białek w *Escherichia coli*
— izolowania rekombinowanych białek z komórek *E. coli*
— oczyszczania białek metodami chromatograficznymi.

Ponadto posiadamy w sprzedaży:

— termostabilną polimerazę DNA z *Thermus aquaticus*
— endoproteinazę: czynnik Xa
— rekombinacyjne fragmenty białek strukturalnych wirusów HIV-1, HIV-2
— zestaw diagnostyczny do wykrywania wirusa HBV metodą PCR
— wzorce mas DNA (w zakresie od 30 do 2000 par zasad)
— własne wektory ekspresyjne.

Zespół naukowy ZBWiIG posiada wieloletnie doświadczenie (od 1986 r.) w pracach badawczych w wymienionym zakresie. Zainteresowanym przesyłamy aktualny katalog. Ceny konkurencyjne, przy dużych zamówieniach możliwość uzyskania rabatu.

Szczegółowych informacji udzielą Państwu:

dr Andrzej Szczepanek, mgr inż. Elżbieta Man, mgr Małgorzata Urbaniak,
Zakład Inżynierii Genetycznej TERPOL, Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne SA
ul. POW 57, 98-200 Sieradz, **tel. (043) 220586 do 88 w. 208, 224548, fax 227105**

http://rcin.org.pl

Zachęcamy do czytania i prenumerowania *Acta Biochemica Polonica*
Prenumerata roczna wynosi: indywidualna 40 zł
dla instytucji wynosi 80 zł

Acta Biochimica Polonica

Vol. 44 No. 3/1997

QUARTERLY

PL ISSN0001-527X

31 11 13

Editors of the Issue

Kazimierz Lech Wierzchowski
Andrzej Bierzyński

Proteins and peptides

Reviews

Structural and energetic aspects of protein-protein recognition
Jacek Otlewski and Włodzimierz Apostoluk **367–388**

High coordination lattice models of protein structure, dynamics and thermodynamics
Andrzej Koliński and Jeffrey Skolnick **389–422**

Critical reviews

Helix-coil transition theories. Are they correct?
Andrzej Bierzyński and Krzysztof Pawłowski **423–432**

Disulfide bonds in protein folding studies: friends or foes?
Michał Dadlez **433–452**

Minireviews

Elucidation of neurophysin/bioligand interactions from molecular modeling
Rajmund Kaźmierkiewicz, Cezary Czaplewski and Jerzy Ciarkowski **453–466**

The impact of the amino-acid sequence on the specificity of copper(II) interactions with peptides having nonco-ordinating side-chains
Wojciech Bal, Marcin Dyba and Henryk Kozłowski **467–476**

Fluorescence resonance energy transfer in studies of inter-chromophoric distances in biomolecules
Leszek Łankiewicz, Joanna Malicka and Wiesław Wiczk **477–490**

http://rcin.org.pl

Regular papers

Why a "benign" mutation kills enzyme activity. Structure-based analysis of the A176V mutant of *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginase I
David T. Bonthron and Mariusz Jaskólski **491–504**

Crystal structure of rat transthyretin at 2.5 Å resolution: First report on a unique tetrameric structure
Andrzej Wojtczak **505–518**

The determination of thymopoietin conformation based on X-ray structure of a discontinuous thymopoietin-like motif of G-actin
Ignacy Z. Siemion, Iwona Strug and Zbigniew Szewczuk **519–526**

Design of a knowledge-based force field for off-lattice simulations of protein structure
Adam Liwo, Stanisław Ołdziej, Rajmund Kaźmierkiewicz, Małgorzata Groth and Cezary Czaplewski **527–548**

Energy minimization of globular proteins with solvent effects included. Comparison of empirical solvation energy terms and explicit water treatment
Andrzej Kierzek and Piotr Zielenkiewicz **549–556**

Modelling of active forms of protein kinases: p38 — a case study
Krzysztof Ginalski, Bogdan Lesyng, Janusz Sowadski and Michał Wojciechowski **557–564**

Expression of *Lupinus luteus* cDNA coding for PR10 protein in *Escherichia coli*: Purification of the recombinant protein for structural and functional studies
Michał M. Sikorski **565–578**

Maize TF IIIA — the first transcription factor IIIA from monocotyledons. Purification and properties
Eliza Wyszko, Marek Radłowski, Sławomir Bartkowiak and Mirosława Z. Barciszewska **579–590**

Interaction of HIV Tat model peptides with tRNA and 5S rRNA
Małgorzata Giel-Pietraszuk, Mirosława Z. Barciszewska, Piotr Mucha, Piotr Rekowski, Gotfryd Kupryszewski and Jan Barciszewski **591–600**

http://rcin.org.pl

Short communication **Crystallization and preliminary crystallographic studies of a new crystal form of papain from *Carica papaya***
Maciej Kozak, Elżbieta Kozian, Zbigniew Grzonka and Mariusz Jaskólski **601-606**

Membranes

Regular paper **Conformations, orientations and time scales characterising dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. Molecular dynamics simulation studies**
Marta Pasenkiewicz-Gierula and Tomasz Róg **607-624**

Index of authors

Apostoluk, Wł. 367
Bal, W. 467
Barciszewska, M.Z. 579, 591
Barciszewski, J. 591
Bartkowiak, Sł. 579
Bierzyński, A. 423
Bonthron, D.T. 491
Ciarkowski, J. 453
Czaplewski, C. 453, 527
Dadlez, M. 433
Dyba, M. 467
Giel-Pietraszuk, M. 591
Ginalski, K. 557
Groth, M. 527
Grzonka, Z. 601
Jaskólski, M. 491, 601
Kaźmierkiewicz, R. 453, 527
Kierzek, A. 549
Koliński, A. 389
Kozak, M. 601
Kozian, E. 601
Kozłowski, H. 467
Kupryszewski, G. 591
Lesyng, B. 557
Liwo, A. 527
Łankiewicz, L. 477
Malicka, J. 477
Mucha, P. 591
Ołdziej, St. 527
Otlewski, J. 367
Pasenkiewicz-Gierula, M. 607
Pawłowski, K. 423
Radłowski, M. 579
Rekowski, P. 591
Róg, T. 607
Siemion, I.Z. 519
Sikorski, M.M. 565
Skolnick, J. 389
Sowadski, J. 557
Strug, I. 519
Szewczuk, Z. 519
Wiczk, W. 477
Wojciechowski, M. 557
Wojtczak, A. 505
Wyszko, E. 579
Zielenkiewicz, P. 549

http://rcin.org.pl

Pokwitowanie dla wpłacającego

zł .....

słownie .....

.....

wpłacający .....

.....

.....

.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
PBK S.A. XIII/O Warszawa
11101053-1225-2720-3-30

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
PBK S.A. XIII/O Warszawa
11101053-1225-2720-3-30

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
PBK S.A. XIII/O Warszawa
11101053-1225-2720-3-30

stempel

Pobrano opłatę

zł .....

.....
podpis przyjmującego

Pokwitowanie dla wpłacającego

zł .....

słownie .....

.....

wpłacający .....

.....

.....

.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
PKO BP VIII/O Warszawa
10201084-1791-270-201-111

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
PKO BP VIII/O Warszawa
10201084-1791-270-201-111

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
PKO BP VIII/O Warszawa
10201084-1791-270-201-111

stempel

Pobrano opłatę

zł .....

.....
podpis przyjmującego

http://rcin.org.pl

Prenumerata POSTĘPÓW BIOCHEMII rok 1998

dla nie zrzeszonych w PTBioch	30 zł
dla członków PTBioch	15 zł
dla instytucji	60 zł

Składka P.T.Bioch.

za rok 1998	20,— zł
studenci	7,— zł

http://rcin.org.pl

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 „Postępach Biochemii" mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm.
W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim 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-Holand, 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. Po porozumieniu z Redakcją można proponować reprodukcję fotografii barwnych. 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 podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, ryciny czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „góra-dół" (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spoistość 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"
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl