

Advances in Biochemistry

TOM 42, NR 3, 1996

Gratulacje jubileuszowe	223
Polaryzacja komórki i cytoki- neza	227
Kompleksy chromatynowe	238
Kinazy MAP i AP-1	244
Cytoplazmatyczna męskosteryl- ność u roślin	253
Ekspresja mtDNA drożdży	259
Roślinny łańcuch oddechowy	268
Sterowanie poliketydów	276
Arylosulfataza A — efekty niedo- boru	284
Izoenzymy fosfolipazy C	290
Sygnal sfgingomielinowy	299
Sprawozdania	310

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

<http://rcin.org.pl>

WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 31-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15
BARBARA ZARZYCKA
tel. 659-85-71 w. 332

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
GRAŻYNA DOBROWOLSKA
(Warszawa)
LILLA HRYNIEWIECKA
(Poznań)
RENATA JASIŃSKA
(Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
TADEUSZ KŁOPOTOWSKI
(Warszawa)
STEFAN MALEPSZY
(Warszawa)
GRAŻYNA PALAMARCZYK
(Warszawa)
KRZYSZTOF STAROŃ
(Warszawa)
PIOTR STĘPIEŃ
(Warszawa)
KRYSTYNA STRZYKAŁA
(Poznań)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel. (2) 659-85-71 w. 332
fax: (22) 22-53-42

**Listy gratulacyjne z okazji 90-lecia Członków Honorowych Towarzystwa:
profesor Stelli Niemierko i profesora Tadeusza Korzybskiego**
Congratulation on the 90th birthday of Professors Stella Niemierko and Tadeusz Korzybski 223

Polaryzacja komórki, białka polarne i cytokineza
Cell polarity, polar proteins and cytokinesis
JANINA KACZANOWSKA, DOROTA WŁOGA, ANDRZEJ KACZANOWSKI 227

Rola kompleksów chromatynowych w regulacji ekspresji genów
Chromatin complexes in regulation of gene expression during development
TOMASZ T. CALIKOWSKI 238

Kinazy MAP i ich rola w regulacji poziomu, składu podjednostkowego oraz stopnia fosforylacji czynnika transkrypcyjnego AP-1
Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) — their role in regulation of protein level, subunit composition and degree of phosphorylation of the transcription factor AP-1
IRENEUSZ W. BIEDERMANN 244

Molekularne podstawy cytoplazmatycznej męskosterylności u roślin wyższych
Molecular basis of cytoplasmic male sterility in higher plants
HANNA JAŃSKA, MAGDALENA WOŁOSZYŃSKA 253

Rola genomu jądrowego w regulacji funkcjonowania mitochondriów *Saccharomyces cerevisiae*
Nuclear control of mitochondrial functions in *Saccharomyces cerevisiae*
MAGDALENA BOGUTA 259

Roślinny łańcuch oddechowy
Plant respiratory chain
ANNA M. RYCHTER 268

Sterowana biosynteza antybiotyków poliketydowych
Engineered biosynthesis of polyketide antibiotics
KATARZYNA KUCZEK, MAGDALENA KOTOWSKA, MARIAN MORDARSKI 276

Niedobór aktywności arylosulfatazy A jako podłoże leukodystrofii metachromatycznej
Deficiency of arylsulfatase A activity as a basis of metachromatic leukodystrophy
AGNIESZKA ŁUGOWSKA, ANNA TYLKI-SZYMAŃSKA 284

Izoenzymy fosfolipazy C specyficznie hydrolizujacej fosfatydyloinozytyle i regulacja ich aktywnosci Phosphatidylinositol-specific phospholipase C isozymes and regulation of their activity TADEUSZ PAWEŁCZYK	290
Sfingomielina i jej metabolity jako pośredniki w przeniesieniu sygnalu w komorce Sphingomyelin and its metabolites in cellular signal transduction JOLANTA M. DZIK, ELŻBIETA WAŁAJTYS-RODE	299
Sprawozdania i Komunikaty	310

Errata

W zeszycie nr 2 b.r. Postępow Biochemii (str. 219) zostały zniekształcone nazwiska:

Kol. Jacka Kuźnickiego z Warszawy,

Kol. Jerzego Meduskiego z Kaliforni.

Za niedopatrzenie błędów w korekcie Redakcja uprzejmie Kolegów przeprasza.

Warszawa dn. 09.05.1996.

**Wielmożna Pani
Profesor Stella Niemierko**

Wielce Szanowna Pani Profesor

Z okazji pięknego jubileuszu dziewięćdziesięciolecia urodzin mam zaszczyt złożyć Pani Profesor, Członkowi Honorowemu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Znakomitemu Biochemikowi, najserdeczniejsze życzenia pomyślności i zdrowia od Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i całej społeczności biochemików polskich.

Przywilej reprezentowania Towarzystwa pozwala mi także wyrazić naszą wdzięczność za wielki wkład Pani Profesor w odbudowę po zniszczeniach wojennych, tak ważnej placówki badawczej, jaką jest Instytut imienia M. Nenckiego; za stworzenie w nim dynamicznie rozwijającej się szkoły biochemii układu nerwowego, a przez to zainicjowanie w Polsce badań neurochemicznych.

Łączę wyrazy uznania oraz najgłębszego poważania

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
Profesor dr Liliana Konarska

Warszawa, 4 czerwca, 1996

Wielmożny Pan Profesor Tadeusz Korzybski

Z okazji pięknego jubileuszu pięćdziesięciolecia urodzin mam zaszczyt złożyć Panu Profesorowi, Znakomitemu Biochemikowi, Członkowi Założycielowi i Członkowi Honorowemu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, najserdeczniejsze życzenia zdrowia i pomyślności. Życzenia te wraz z gratulacjami składam w imieniu Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i całej społeczności biochemików polskich.

Przywilej reprezentowania Towarzystwa pozwala mi także na wyrażenie naszego uznania za znaczący wkład Pana Profesora w rozwój biochemii w naszym kraju, a zwłaszcza wiedzy dotyczącej antybiotyków.

Pamiętamy też o udziale Pana Profesora w organizacji i działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a w szczególności jego Komisji Słownictwa Biochemicznego. Na naszą wdzięczność zasługuje także fakt, że jako uczeń Profesora Jakuba Karola Parnasa umiał Pan utrwalić pamięć o tym wielkim uczonym wśród biochemików kilku pokoleń — poprzez swoje publikacje, odczyty i chętnie udostępniane wspomnienia oraz zgromadzone pamiątki.

Z wyrazami najgłębszego szacunku i poważania
Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
Profesor dr Liliana Konarska

Artykuł ten dedykujemy Pani Profesor Dr hab. Zofii Zielińskiej
w dowód naszego szacunku i przyjaźni

Polaryzacja komórki, białka polarne i cytokineza

Cell polarity, polar proteins and cytokinesis

JANINA KACZANOWSKA¹,
DOROTA WŁOGA²,
ANDRZEJ KACZANOWSKI³

Spis treści:

- I. Polarność komórki stanowi instrukcję strukturalną w rozwoju
- II. Zewnętrzne sygnały mogą wywołać reorganizację cytoszkieletu
- III. Mechanizmy powstania polarności komórki i wyznaczenia położenia bruzdy podziałowej w trakcie pączkowania drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
 - III-1. Przebieg pączkowania jest związany z reorganizacją cytoszkieletu w trakcie cyklu komórkowego
 - III-2. Septyny drożdży mogą stanowić instrukcję strukturalną dla wyznaczenia miejsca pączkowania
 - III-3. Zewnętrzny bodziec może wywołać reorganizację cytoszkieletu i wyznaczyć miejsce gromadzenia białek biegunowych
- IV. Funkcje białek biegunowych w komórkach różnych typów
- V. Biegunowość jaja robaka *Caenorhabditis elegans* i wyznaczenie położenia bruzd podziałowych w embriogenezie
- VI. Powstawanie osi w jaju *Drosophila melanogaster* jako przejaw wzajemnego oddziaływania na siebie oocyty i komórek folikularnych
- VII. Wnioski i pytania

Contents:

- I. Cell polarity is a developmental instruction
- II. External signals serve as the stimuli for the cytoskeletal reorganisation
- III. Mechanisms of appearance of cell polarity and determination of position of the fission line during budding of *Saccharomyces cerevisiae*
 - III-1. Morphogenesis of the bud is coupled to reorganization of the cytoskeleton during cell cycle
 - III-2. Yeast septines may function as structural determinants for selection of the sites of budding
 - III-3. External signal induces reorganization of the cytoskeleton and determines the site of nucleation of the polar proteins
- IV. Functions of polar proteins in various cellular systems
- V. Polarity of the *Caenorhabditis elegans* egg and determination of the pattern of fission lines in embryogenesis
- VI. Development of antero-posterior and ventro-dorsal axes in the *Drosophila melanogaster* egg as an interplay of signals between the oocyte and the follicular layer
- VII. Conclusions and questions

Wykaz stosowanych skrótów: EGF — (ang. *epidermal growth factor*) epidermalny czynnik wzrostu; PDGF — (ang. *platelet derived growth factor*) płytkowy czynnik wzrostu; LPA — (ang. *lysophosphatidyl acid*) kwas lizofosfatydylowy; Ras — produkt protoonkogenu genu *ras* pośredniczący w szlaku przekazu bodźca do jądra; Rho — (ang. *Ras homologues*) grupa białek o podobnej strukturze i funkcji do białka Ras; Rac — (ang. *Reorganization of actin cytoskeleton*) białka zbliżone do Ras bezpośrednio związane z reorganizacją cytoszkieletu aktywnego; CDC42 — produkt genu *cdc42* *Saccharomyces cerevisiae* o strukturze i funkcji podobnej do białka Ras; GEF — (ang. *guanine nucleotide exchange factor*) czynnik regulujący GTPazową funkcję białka Ras; GAP — (ang. *GTPase activating protein*) aktywator funkcji GTPazowej białek Ras; Clb1, Clb2 — (ang. *cyclin binding proteins*)

aktywatory cyklino-zależnej kinazy białkowej *Saccharomyces cerevisiae*; Myo2 — produkt genu *myo2* będący homologiem miozyny w *Saccharomyces cerevisiae*; septyny — (ang. *septins*) kompleks białek szkieletowych z domeną wiążącą nukleotyd wyznaczających położenie bruzdy podziałowej; *bud* — zespół genów kontrolujących powstawanie miejsca pączkowania u *Saccharomyces cerevisiae*; *cdc24*, *cdc43*, *bem1*, *bem3*, *rsr1*, *spa2*, *gtpb* — geny *Saccharomyces cerevisiae* kontrolujące tworzenie kompleksu białek biegunowych; GDI — (ang. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*) białko negatywnej kontroli funkcji Ras; ERM — (ang. *ezzrin, radixin, moesin family*) białka cytoszkieletu występujące albo w cytoszkielecie miejsc przylegania komórki do podłoża, albo w bruzdzie cytokinetycznej; *cdc15*, *peanut* — geny kodujące białka charakterystyczne dla bruzdy podziałowej; MAP kinaza — (ang. *Mitogen activated protein kinase*) kinaza serynowo-treoninowa uczestnicząca w szlaku kaskady kinaz przenoszących mitogenowy sygnał zewnętrzny z cytoplazmy do jądra; *c-jun*, *c-fos* — geny

^{1,3} Prof. dr hab., ² mgr Zakład Cytofizjologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa 00-927, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28

kodujące powstanie czynnika transkrypcyjnego (AP-1) w wyniku działania mitogenów na komórki; *par* — geny kodujące białka kontrolujące położenie bruzd podziałowych w trakcie bruzdkowania robaka *Caenorhabditis elegans*; *bicoid*, *staufer*, *nanos*, *oskar*, *gurken* — geny matczyne *Drosophila melanogaster* kodujące determinanty osi jaja; MTOC — (ang. *microtubules organizing center*) kompleks białek zdolnych do nukleowania polimeryzacji mikrotubuli, zwykle jest to zespół białek otaczających centriolę tworzącą razem strukturę zwaną centrosomem; rTGF — (ang. *transformation growth factor receptor*) białko receptora błonowego przylączającego czynnik transformujący; *torpedo* — gen kodujący białko receptorowe ekspresowane w niektórych komórkach foliularnych otaczających jajo *Drosophila melanogaster*; *torso* — gen matczyne kodujący białko o charakterze receptorowej kinazy tyrozynowej ekspresowany w jajach *Drosophila melanogaster*.

I. Polarność komórki stanowi w trakcie rozwoju instrukcję strukturalną

Celem tego artykułu jest przedstawienie mechanizmów powstawania osi ciała komórek somatycznych i zapłodnionych jaj w odpowiedzi na sygnały zewnętrzne. Komórka, poprzez transdukcję tych sygnałów, reorganizuje w określony sposób swój cytoszkielet oraz uruchamia nowe transkrypcje. Powstanie nieprzypadkowego rozmieszczenia struktur w komórce w wyniku takiej reorganizacji wzdłuż osi przednio-tylnej i grzbietowo-brzuszej stanowi jej instrukcję strukturalną. Ta instrukcja wyznacza położenie bruzdy podziałowej w trakcie cytokinezy, oraz w przypadku zapłodnionej komórki jajowej — także organizację przestrzenną zarodka. Blastomery powstałe z przedniej części komórki jajowej stanowią błąd przód ciała zarodka. Blastomery powstałe z tylnej części komórki wytworzą tył zarodka. Oznacza to, że układ struktur w zapłodnionej komórce jajowej determinuje przyszły plan przestrzennego rozwoju zarodka. Mechanizm powstawania polarności jaja, a także pewnych komórek spolaryzowanych (np. neuronów) jest prawdopodobnie uniwersalny i wiąże się z uporządkowaniem przestrzennym rozmieszczenia kompleksu tzw. białek biegunowych.

II. Zewnętrzne sygnały mogą wywoływać reorganizację cytoszkieletu

Komórka eukariotyczna może być komórką apolarną. Oznacza to, że organizacja struktur cytoszkieletalnych nie wykazuje żadnego uporządkowania o charakterze osiowym. Oś taka może pojawić się w niektórych komórkach pod wpływem czynników zewnętrznych np. chemoatraktantów. W obecności takiego czynnika komórka reorganizuje swój cytoszkielet i powstaje przód komórki z nibynóżkami przesuwającymi komórkę w kierunku źródła chemoatraktanta [1]. Przykładem mogą być fibroblasty myszy, które pod wpływem czynników wzrostowych, takich jak epidermalny czynnik wzrostu (EGF), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF), czy też kwasu lizofosfatydylowy (LPA) wy-

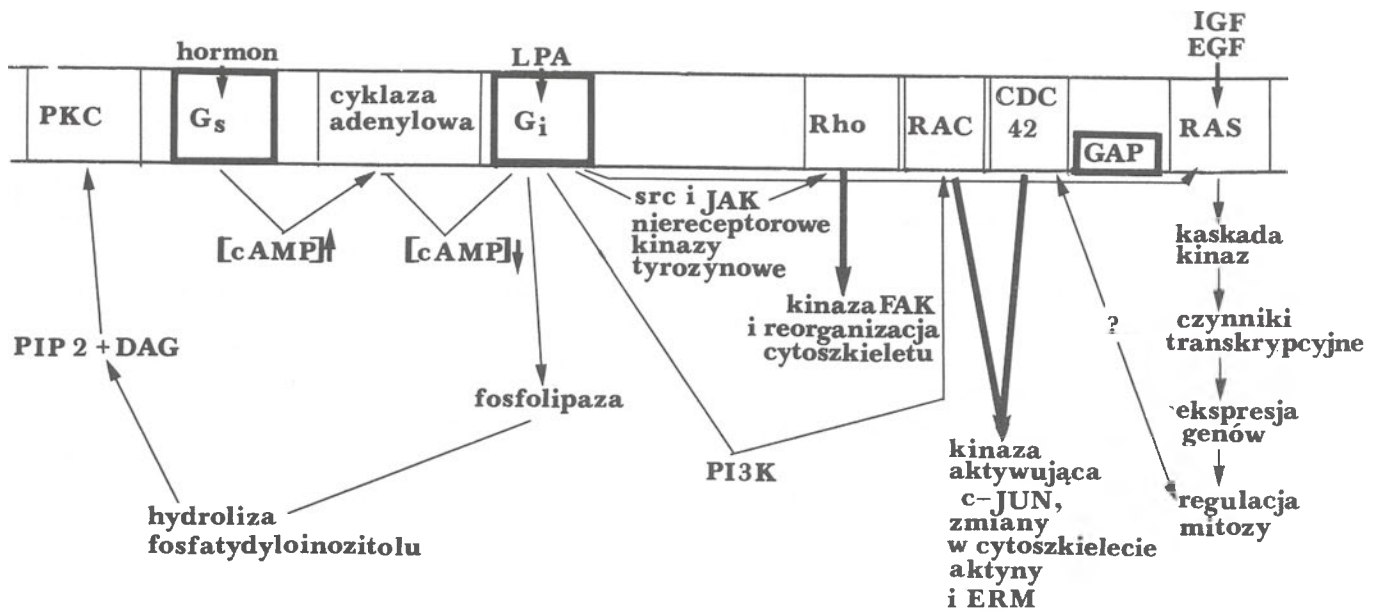
twarzają płatowate nibynóżki (*lamellipodia*) i rusztowanie cytoszkieletu w postaci aktynowych kabli (ang. *actin cables*).

Centralną rolę w przewodzeniu bodźca wyzwalającego przemiany w cytoszkielecie grają różne białka o charakterze GTPazy zbliżonych do białka Ras określanych jako Rho (ang. *Ras Homologues = Rho*), odmiana GTPazy typu Rac związanych bezpośrednio z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego (ang. *Reorganization of Actin Cytoskeleton = Rac*) (Ryc. 1) i być może kluczowe białko CDC42 (w niektórych publikacjach używana jest pisownia *Cdc42p*) należące do grupy GTPazy typu Ras [2, 3]. Te same bodźce mogą również prowadzić do aktywacji czynników transkrypcyjnych, a następnie do syntezy nowych białek.

Niektóre poznane dotąd drogi transdukcji sygnałów i aktywacji poszczególnych szlaków metabolicznych związane są z różnymi białkami Ras (Ryc. 1). Schemat ten jest jeszcze niekompletny ponieważ obecnie poszukuje się białek pośredniczących w przenoszeniu sygnału od odpowiedniego receptora komórkowego do białek typu Ras, Rac i CDC42. Białka pośredniczące powinny zawierać domeny SH2 i SH3 oddziaływujące z pobudzonym receptorem oraz domeny aktywujące białka typu Ras. W procesie aktywacji białka Ras występuje wymiana GDP na GTP; zatem pewne białka pośredniczące muszą spełniać funkcję wymieniaacza tych nukleotydów (ang. *GEF = Guanine nucleotide Exchange Factor*), a inne regulować aktywację hydrolitycznej funkcji GTPazy (ang. *GAP = GTPase Activating Protein*). Aktywacja białek Ras z kolei aktywuje pośredniczący system kinaz białkowych aby uruchomić systemy efektorów (z jednej strony mechanizmy reorganizacji cytoszkieletu, a z drugiej aktywację czynników transkrypcyjnych).

W wyniku zadziałania bodźca powstaje kompleks białek: uczestniczących w transdukcji sygnału (Rac, Rho, Ras, CDC42 GEF etc.), ośrodka inicjującego reorganizację cytoszkieletu (ang. *nucleating center*), oraz białek szkieletowych reorganizowanych pod wpływem bodźca (aktyna, białka regulujące polimeryzację aktyny, miozyny, mikrotubule i towarzyszące im białka motoryczne etc). Taki złożony kompleks białek może stanowić zespół białek biegunowych decydujących o polarności komórki. Współczesne badania skupiają się na poznaniu składu, funkcjonowaniu i trwałości kompleksu białek biegunowych, a szczególnie na poznaniu ich roli jako instrukcji strukturalnej w trakcie różnicowania i embriogenezy.

Po okresie interfazy zarówno komórka polarna jak i apolarna mogą wchodzić w stadium mitozy. Wrzeciono kariokinetyczne wyznacza położenie bruzdy podziałowej, która powstaje prostopadle do osi wrzeciona [4]. Jak powstaje oś wrzeciona? Jaki wpływ ma polarność komórki na determinację położenia bruzdy podziałowej? Jakie znaczenie w rozwoju ma wyznaczenie przestrzennego ułożenia bruzd podziałowych? Pytania te na razie pozostają bez jednoznacznych od-



Ryc. 1 Uproszczony i hipotetyczny schemat zależności stymulacji białek G, Ras, Rho, Rac i CDC42 z aktywacją reorganizacji cytoszkieletu (grube strzałki) i pobudzeniem aktywności niektórych kinaz białkowych (kompilacja schematów wielu autorów głównie [3, 16, 44, i 45]). FAK — kinaza specyficzna dla miejsc przylegania komórek do podłoża (ang. *foci adhesion kinase*), ERM — (ang. *ezrin, radixin, moesin*) białka cytoszkieletu związane z wytwarzaniem miejsc przylegania do podłoża i występujące w bruzdzie cytokinetycznej, G_s — białko G stymulowane hormonalnie (wzrost stężenia cAMP) i G_i — białko G stymulowane kwasem lizofosfatydylowym (LPA) (obniżenie poziomu cAMP) powoduje aktywację fosfolipazy a następnie aktywację kinazy białkowej C (PKC), aktywację kinazy fosfatydyloinozitolu (PI3K) i Rac (RAC), oraz aktywację Rho (być może z udziałem niereceptorowych kinaz tyrozynowych (src i JAK); Przy działaniu LPA i czynników wzrostowych (IGF i EGF) obserwuje się aktywację szlaku Ras. Stymulacja szlaku Ras jest sprzężona z aktywacją CDC42 być może przez wspólny czynnik aktywujący GAP.

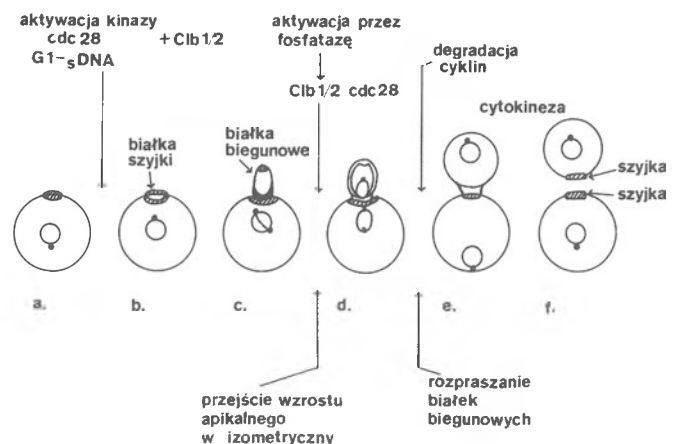
powiedzi. Jednakże postęp badań nad mechanizmami pączkowania drożdży, powstawania polarności jaja robaka *Caenorhabditis elegans* i wyznaczania położenia bruzd w trakcie embriogenezy, oraz badania nad mechanizmem powstawania osi ciała w jaju *Drosophila melanogaster* roszą nadzieję na rozwikłanie tych zależności.

III. Mechanizmy powstania polarności komórki i wyznaczania położenia bruzdy podziałowej w trakcie pączkowania drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

III-1. Przebieg pączkowania jest związany z reorganizacją cytoszkieletu w trakcie cyklu komórkowego

Pączkowanie drożdży *S. cerevisiae* jest asymetrycznym podziałem komórki. W późnym stadium G1 komórka rodzicielska osiąga maksymalne rozmiary po czym przestaje rosnać i przygotowuje się do replikacji DNA. W okresie wchodzenia w replikację (stadium G1/sDNA) komórka rodzicielska zaczyna tworzyć pączek (Ryc. 2a). Powstaje pierwotna polarność wzdłuż osi „komórka rodzicielska-pączek” (Ryc. 3d). Powstawanie pączka jest zależne od aktywacji kinazy białkowej zależnej od cykliny (Cln/Cdc28) inicjującej replikację DNA poprzez przyłączenie dwóch białek (Clb1 i Clb2 = *Cyclin Binding proteins*) (Ryc. 2a i b). A więc tworzenie pączka jest bezpośrednio związane z cyklinami kontrolującymi przebieg cyklu komórkowego. Pomiedzy komórką

rodzicielską a pączkiem powstaje charakterystyczny pierścień złożony z białek biegunowych. Ten pierścień wyznacza położenie przyszłej bruzdy cytokinetycznej (Ryc. 2b). Przyrost pączka odbywa się wyłącznie w obrębie pierścienia. Tu tworzy się palczasty wyrostek z szybko rosnącym czubkiem. W czubku także są białka biegunowe (wzrost apikalny) (Ryc. 2c). Do czubka przemieszcza się również wiele składników cytoszkieletu np. aktyna, mikrotubule wraz z kinezyną, kaldesmon, kalmodulina i inne białka związane z kontrolą stanu polimeryzacji aktyny. Do czubka są transportowane pęcherzyki stanowiące zapas błony komórkowej; pęcherzyki te drogą egzocytozy na czubku pączka powodują szybki jego wzrost (Ryc. 3d). W transporcie tym uczestniczy homolog miozyny ludzkiej kodowanej przez gen *Myo 2* drożdża.



Ryc. 2 Zmiany w rozmieszczeniu białek biegunowych w trakcie pączkowania *Saccharomyces cerevisiae*. Uproszczony schemat wg [5]. Szczegółowy opis w tekście.

W następnym stadium cyklu komórkowego (stadium przejścia sDNA/G2) zmienia się typ wzrostu pączka, z biegunowego wydłużającego się palca, na izometryczny, czyli wydłużający się palec staje się równomiernie rosnącą kulą z równomiernie sekretowanymi pęcherzykami na całej powierzchni pączka. Moment tego przejścia z wzrostu apikalnego na izometryczny jest pod kontrolą genetyczną (ang. *apical/isometric switch*) [5]. Aktywacja czynników Clb 1/2 przez fosfatazę jest warunkiem niezbędnym do zmiany typu wzrostu pączka. Towarzyszy temu rozproszenie wszystkich składników białek biegunowych w obrębie całego pączka, a więc przejściowy zanik osiągniętej uprzednio polarności (Ryc. 2d).

Inaktywacja kompletu białek Clb 1/2 Cln/Cdc28 (przez proteolizę cykliny) w trakcie fazy M (Ryc. 2e) wiąże się z powtórным zgrupowaniem aktyny i innych składników kompleksu białek apikalnych w regionie bruzdy cytokinetycznej. W tym miejscu tworzą się teraz dwa równoległe pierścienie szyjki, jeden dla pączka, drugi dla komórki macierzystej. W trakcie cytokinezy pierścienie te zostaną rozdzielone do komórek potomnych wyznaczając miejsce skupienia kompleksu białek biegunowych (Ryc. 2e i f).

Oznacza to, że w trakcie pączkowania pierwszym etapem jest wyznaczenie pewnego specjalnego miejsca w którym tworzy się pączek, i gdzie w przyszłości odbędzie się cytokineza, a więc wyznaczenie granicy tylnej pączka. Z kolei w obrębie tego miejsca, zwanego miejscem szyjki (ang. *neck filament site*), w postaci pierścienia podczepionego do błony komórkowej grupują się zarówno białka biegunowe o charakterze enzymów jak i spolimeryzowane pewne specyficzne dla bruzdy podziałowej białka cytoszkieletowe np. septyny (ang. *septins*), radyksyna (ang. *radixin*), obok niespecyficznych białek szkieletowych (np. aktyny). W środku tego pierścienia wyodrębnia się kompleks białek apikalnych (ang. *bud site proteins*) nie związanych z septynami, ale z niespecyficznymi białkami szkieletowymi, które zgrupują się na rosnącym czubku pączka. A więc kolejno tworzą się dwa bieguny pączka, z charakterystycznymi kompletami białek biegunowych, przejściowo rozpraszonymi w trakcie wczesnej mitozy i przemieszczanymi i kondensowanymi ponownie z septynami w trakcie cytokinezy [5-7].

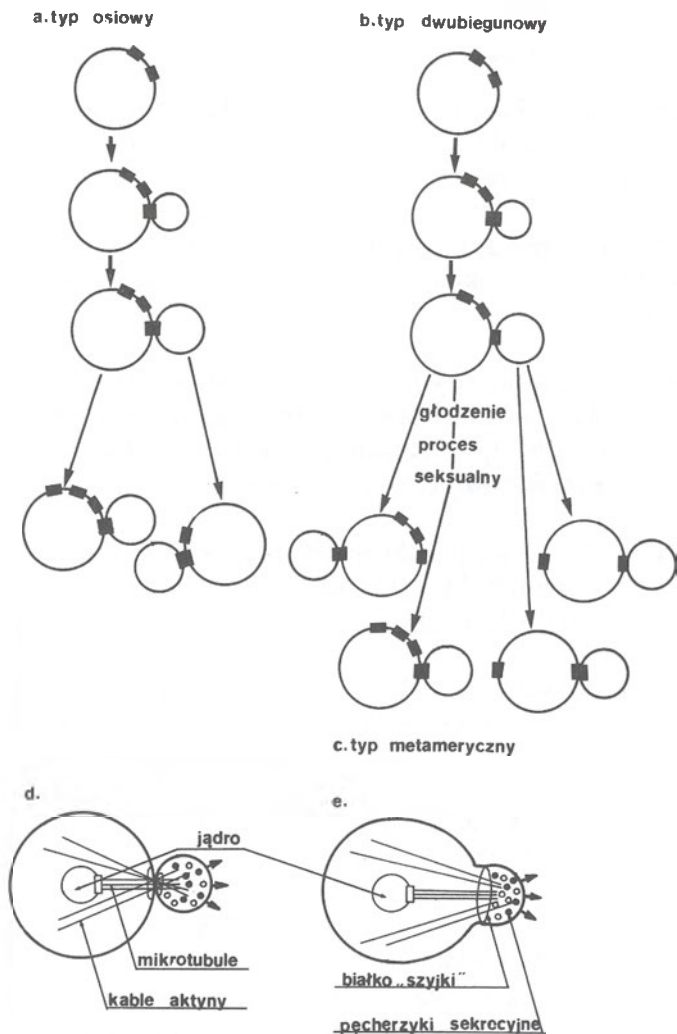
III-2. Septyny drożdży mogą wyznaczyć miejsce tworzenia kolejnego pączka

Białka filamentu szyjki, wraz z wielocukrem o charakterze chityny łatwo zabarwić barwnikiem zwanym kalkofluorem. Pozwala to na wybarwienie pierścienia na powierzchni drożdża interfazalnego, jako blizny, po odbytej uprzednio cytokinezie po oddzieleniu pączka (Ryc. 2f). Jeżeli komórka pączkowała wielokrotnie, można sprawdzić, czy istnieje określona prawidłowość przestrzenna w rozmieszczeniu tych pierścieni. A więc można sprawdzić, czy komplet białek szyjki jest infor-

macją strukturalną dla wyznaczenia miejsc pączkowania w kolejnych cyklach komórkowych. Badania prowadzone w pracowniach Dr Pringle'a i Herskowitza pozwoliły wyróżnić dwa podstawowe typy wzoru przestrzennego pączkowania u *S. cerevisiae*; a) typ osiowy, (Ryc. 3a) i b) typ biegunowy (Ryc. 3b) [1, 6].

Odżywione drożdże, które często pączkują charakteryzuje osiowy typ pączkowania. W trakcie kolejnych pączkowań poprzedni pierścień szyjki stanowi instrukcję przestrzenną dla wyznaczenia miejsca tworzenia następnego pączka w tej samej okolicy. Wobec tego po kilku pączkowaniach komórka macierzysta wykazuje uprzywilejowaną strefę na powierzchni drożdża w postaci jakby naszyjnika, bądź lokalnego skupienia kolejnych pierścieni (Ryc. 3a).

Jeżeli jednak komórka długo nie pączkuje (zostaje zgłodzona), albo w międzyczasie przeszła przez zapłodnienie, wtedy zmienia się reguła wyznaczania miejsca następnego pączkowania na dwubiegunowy typ pączkowania (Ryc. 3b). Pączek tworzy się na biegunie przeciwnym w stosunku do miejsca poprzedniego pączkowania. Okazjonalnie także powstają komórki



Ryc. 3 Determinacja położenia miejsc tworzenia pączków *S. cerevisiae*: a. typ osiowy, b. typ dwubiegunowy i metameryczny, i d. i e. porównanie morfogenezy pączka i wyrostka koniugacyjnego shmoo. Wg [1, i 45] uproszczone. Objaśnienia w tekście.

o metamerycznej symetrii wyznaczania miejsc pączkowania (Ryc. 3b, najniższy rząd). Wobec tego przypuszcza się, że białka pierścienia szyjki są źródłem sygnału wyznaczającego miejsce pączkowania (zapewne septyny są związane z białkami biegunowymi), ale informacja ta z czasem zanika (np. w trakcie głodzenia po zaprzestaniu pączkowania białka biegunowe zostają rozproszone), a powtórne ich zgrupowanie odbywa się wraz z nowo polimeryzowanymi septynami w najdalszym miejscu w stosunku do „starego” pierścienia (po procesie seksualnym).

Wyizolowano szereg mutantów procesu pączkowania grupy *bud*, („pączka”), czyli genów związanych z wyznaczaniem miejsca pączkowania u *S. cerevisiae*. Białka BUD nie mają zasadniczego wpływu na przebieg samego pączkowania. Dotyczą wyłącznie instrukcji o miejscu tworzenia pączka [1, 6, 7]. Mutanty *loci bud 1-5* tworzą pączki w dowolnym miejscu ciała i bez względu na rozmieszczenie poprzednich pieścieni szyjki na komórce. Białka BUD1 i BUD3 (a zapewne i inne białka BUD) gromadzą się w pierścieniu szyjki w trakcie każdego pączkowania przyłączając białka receptorowe (RS1 i SPA2) [3, 6, 7], oraz białko kotwiczące w postaci septyny AFR1 (*neck filament protein*) [8]. Ten jeszcze słabo poznany kompleks oddziałujących na siebie białek może być źródłem sygnału w którym uczestniczy produkt BUD1. Sklonowanie genu *bud1* pozwoliło bowiem wywnioskować, że jest to gen kodujący GTPazę typu Ras. Produkty genów *bud 2 i 5* są białkami typu GEF (czynnik wymiany nukleotydu GDP na GTP) i GAP (aktywator GTPazy). (GAP). A więc białka biegunowe drożdży stanowią istotnie instrukcję topograficzną w wyznaczaniu miejsca pączkowania i są regulowane przez mechanizm sygnalizacji z pośrednictwem pewnych typów białek typu Ras [9].

III-3. Zewnętrzny bodziec może wywołać reorganizację cytoszkieletu i wyznaczyć miejsce gromadzenia białek biegunowych

Zgłodzone komórki dwóch typów płciowych wydzielają do środowiska feromony (gamony) oddziałujące na receptory komórki o przeciwnym typie płciowym. W odpowiedzi na gamony, dwie komórki różnych typów płciowych przypadkowo znajdujące się blisko siebie zaczynają tworzyć rosnące ku sobie palczaste wyrostki (ang. *shmoo*). W ten sposób dochodzi do połączenia obu komórek. Szczegółowe badania morfologiczne i molekularne wykazały, że w rosnących wyrostkach tworzy się kompleks białek biegunowych, a procesy morfogenezy pączka i wyrostka są bardzo podobne (porównaj Ryc. 3d i 3e). Oznacza to, że lokalizacja i tworzenie kompleksu białek biegunowych wyrostków stanowi rzeczywiście odpowiedź na sygnał (w tym przypadku gamonu sekretowanego przez komórkę odmiennej płci).

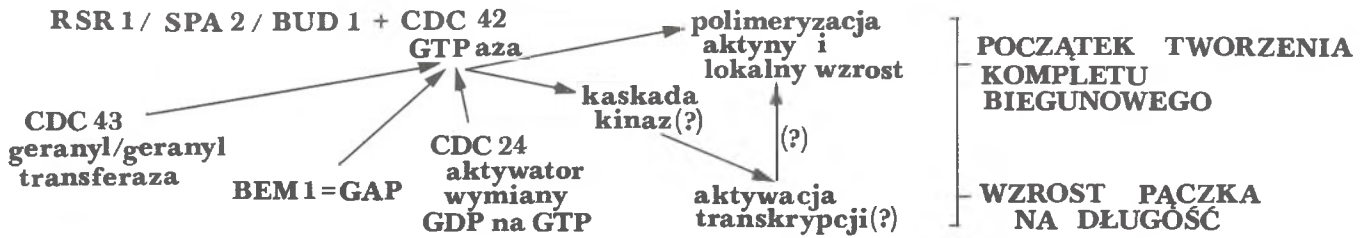
Badania genetyczne i molekularne pozwoliły na

wykrycie drugiego zespołu mutantów (innych niż mutanty *bud*) związanych z tworzeniem kompleksu białek biegunowych [3, 6, 10-13]. Mutacje genów *cdc24*, *cdc42*, *cdc43*, *bem 1*, *bem 3* i kilku innych charakteryzuje utrata zdolności do wytwarzania pierścienia inicjującego powstawanie pączka (lub *shmoo*). Mutacje tych genów powodują, że komórka macierzysta w trakcie mitozy powiększa równomiernie swoją powierzchnię, a nie tworzy zlokalizowanego miejsca wzrostu pączka. Obecnie wykryto, że w tych mutantach zachodzi apolarna sekrecja pęcherzyków niosących zapas błon, dezorganizacja cytoszkieletu, nie tworzą się aktynowe kable, a białka normalnie zlokalizowane wyłącznie w rosnącym czubku (w stadium G1/sDNA), bądź też w szyjce (w stadiach M i G1) są rozproszone na całej powierzchni komórki.

Po raz pierwszy model łączący procesy sygnalizacyjne w trakcie pączkowania drożdża z kontrolą morfogenezy przedstawił Chant i Herskowitz [6] (Ryc. 4). Wszystkie zebrane dane z ostatnich czterech lat pozwalają przypuszczać, że białko CDC42 jest uniwersalną determinantą bieguny przedniego (apikalnego) komórki monopolarnej [12-17]. CDC42 jest małym białkiem wiążącym GTP, o charakterze GTPazy sprzężonej z kontrolą przemian w cytoszkiecie [11] pod wpływem czynników wzrostu [2, 3, 16, 17]. Białko to ma charakterystyczny koniec karboksylowy (typu CAAX), które ułatwia modyfikację tego zakończenia pod wpływem transferazy geranylgeranylowej z formy białka cytosolowej na formę zakotwiczoną w błonie plazmatycznej. GTPaza CDC42 w drożdżach gromadzi się w rosnącym czubku pączka w błonie plazmatycznej; a zarówno podczepienie do błony plazmatycznej, jak i aktywność GTPazowa są warunkami koniecznymi dla wytworzenia pączka. Inny produkt tej grupy genów CDC43 stanowi jednostkę beta transferazy geranyl geranylowej. Należy przypuszczać, że działanie tego enzymu aktywuje CDC42 umożliwiając mu trwałe zakotwiczenie w błonie plazmatycznej [10]. Z kolei CDC24 działa na CDC42 aktywującą poprzez wymianę GDP na GTP w CDC42 (ang. *guanine nucleotide exchange factor* = GEF). Porównanie sekwencji aminokwasów w ludzkim homologue CDC24 (zwanym DBL i oddziałującym na ludzki homolog białka CDC42) z sekwencjami CDC24 drożdży wykazuje wyraźną homologię jednej domeny [14]. Pośrednio, na podstawie badań genetycznych sugeruje się, że w białku drożdżowym CDC24 istnieje jeszcze inna domena wrażliwa na GTPazę typu BUD1. To tłumaczy funkcjonalny związek pomiędzy białkami BUD i białkami polarnymi CDC42, 43, 24, BEM1 i BEM3. Geny *bem 1 i bem 3* kodują białka regulujące aktywność CDC42 [7, 14]. Ponadto białko BEM1, które jest niezbędne dla utrzymania apikalnego wzrostu pączka, zawiera dwie domeny SH3 (a więc ma cechy białka pośredniczącego w transdukcji sygnału). W skład kompletu białek biegunowych czubka wchodzi również białka receptorowe RSR1 i SPA-2 nie-

$RSR\ 1 / BUD\ 1 = GTPB + SPA\ 2 \cdot / BUD\ 1$

DETERMINACJA MIEJSCA
PĄCZKOWANIA



ROZPAD LUB TRANSLOKACJA
SKŁADNIKÓW KOMPLETU
BIEGUNOWEGO

„ANISO/ISOMETRIC
SWITCH” = G 2

POWSTANIE NIEAKTYWNEGO
KOMPLETU „SZYJKI”
NA MIEJSCU CYTOKINEZY

CYTOKINEZA

Ryc. 4 Schemat zmian w komplecie białek biegunowych w trakcie pączkowania *S. cerevisiae*. Opis w tekście. Wg [3, 44].

zbędne dla utrzymania wzrostu polarnego. Z przytoczonych tutaj danych wynika schemat przemian w białkach biegunowych niezbędnych dla realizacji kolejnych stadiów pączkowania [3] (Ryc. 4). Schemat ten jest uproszczony i nie uwzględnia kontroli przez działanie inhibitorów aktywacji Ras lub Rho typu GDI (ang. *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) wygaszających mechanizm sygnalizacji [16]. Prawdopodobnie w trakcie morfogenezy drożdży istnieje pewna hierarchiczna kolejność aktywacji GTPaz BUD1, CDC42 i Rho 1-4 uczestniczących w selekcji miejsca pączkowania, a więc w tworzeniu pierścienia szyjki [9, 13, 19, 20].

Rola CDC42 wraz z kompleksem białek nie ogranicza się do kontroli reorganizacji cytoszkieletu i wyznaczenia miejsca pączkowania we wczesnej fazie cyklu. Równocześnie ze stymulacją cyklu komórkowego i powstawaniem pączka, odbywa się aktywacja kinazy threoninowo-serynowej należącej do grupy MAP kinaz (uczestniczących w ścieżce aktywacji transkrypcji wczesnych genów w cyklu komórkowym) [21]. W badaniach *in vitro* wykazano, że CDC42 jest źródłem aktywacji pewnych charakterystycznych dla koniugacji kinaz białkowych [15]. Wynik ten oznacza, że CDC42 jako przekaźnik sygnałów feromonowych spełnia jednocześnie potrójną rolę; wyznacza miejsce inicjacji reorganizacji cytoszkieletu, utrzymania polarności wzrostu pączka i aktywatora ekspresji genów [22].

IV. Funkcje białek biegunowych w komórkach różnych typów

W przypadku fibroblastów myszy aktywacja GTPa-

zy typu Rho prowadzi do wytworzenia kabli aktywnych cytoszkieletu i do wytworzenia miejsc przylegania do podłoża (*adhesion foci*), a aktywacja CDC42 do wytworzenia wiodącej cienkiej nibynóżki zwanej filopodium. Mikroinjekcja białek Rho, Rac i CDC42 do komórek spoczynkowych stymulowała wyjście komórek ze stadium G1 i rozpoczęcie sDNA. W trakcie cytokinezy tych komórek, białko — Rho jest przemieszczane z cytosolu do bruzdy podziałowej, a towarzyszą temu przemieszczanie się aktyny i białek cytoszkieletowych z grupy ERM (ezryny, radiksyny i moezyny). Białka grupy ERM występują, albo w cytoszkielecie przyłg (regionów przylegania komórek do podłoża) w okresie interfazy, albo są w bruzdzie w trakcie cytokinezy [3].

Istnieją również pośrednie przesłanki, aby sądzić, że niektóre białka kompleksu białek biegunowych o charakterze septyny są przemieszczane do bruzdy podziałowej w trakcie cytokinezy i mogą pełnić funkcję zarówno przekaźnika w transdukcji sygnału jak i ośrodka polimeryzacji innych białek cytoszkieletu.

W badaniach nad podziałem drożdża *Schizosaccharomyces pombe* w obrębie sekwencji nukleotydów genu *cdc15* o charakterze septyny, znaleziono fragment homologiczny wobec domeny kodującej SH3, a także domeny charakterystycznej dla białek na których może odbywać się polimeryzacja innych białek. Białko CDC15 jest silnie ufosforylowaną fosfoproteiną w trakcie całego cyklu, za wyjątkiem mitozy i tylko wtedy staje się ośrodkiem kondensacji F-aktyny i pośrednikiem w podczepieniu cytoszkieletu do błony komórkowej. Białko CDC15 może być uniwersalnym pośrednikiem w wyznaczaniu miejsca bruzdy cytotkinetycznej

ponieważ sekwencje homologiczne względem sekwencji *cdc15* znaleziono w genomie *S. cerevisiae*, przywry i myszy [23]. Podobnie w trakcie tworzenia blastodermi w zarodku *Drosophila melanogaster* wykryto, że produkt prawidłowy genu *veanut* związany z cytokinezą wykazuje znaczne podobieństwo do septyn drożdży [24].

Należy sobie również zdawać sprawę, że podane tutaj wiadomości dotyczące podobieństw w składzie i organizacji bruzdy podziałowej w komórkach różnych typów, nie dotyczą kontroli sprzężenia położenia bruzdy podziałowej z wyznaczaniem osi wrzeciona mitotycznego. Wiadomości na ten temat są skąpe. Wiadomo, że w niektórych przypadkach sprzężenie osi wrzeciona mitotycznego i prostopadłego położenia bruzdy może być regulowane przez interakcję jednego z biegunów wrzeciona z białkami biegunowymi (Ryc. 3c) [25].

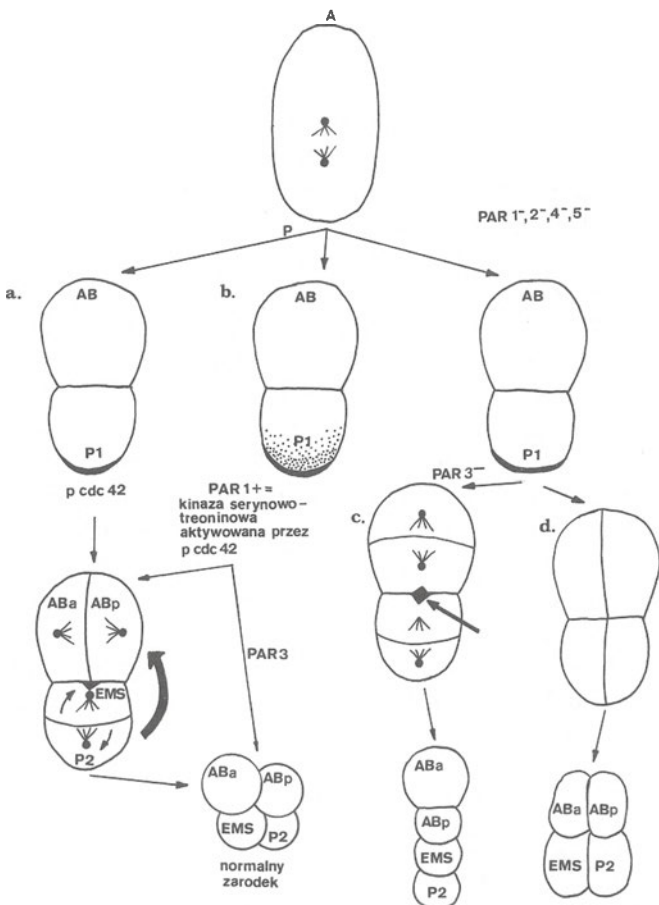
W fibroblastach myszy wykryto specjalizację funkcji poszczególnych GTPaz w przekazywaniu bodźców uruchamiających nowe transkrypcje [16]: wyłącznie Ras aktywuje kaskadę kinaz pobudzanych czynnikami wzrostu (Ryc. 1). Natomiast białka Rac i CDC42 (ale nie Rho) stymulowały aktywację specyficznej kinazy serynowo-treoninowej fosforylującej czynnik transkrypcyjny c-Jun. Fosforylacja ta wzmacnia transaktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1 (tzn. kooperujących c-Jun i c-Fos) niezbędnej dla wejścia komórek w podziały [17]. Rho i CDC42 aktywowały również kinazę serynowo-treoninową z mózgu (neuronalną)

[26]. Podobną specjalizację funkcji GTPaz, Rac, Rho i CDC42 wykazano w przebiegu odmiennych typów reorganizacji aktyny [22].

Badania molekularne dotyczące produktów genów *cdc42*, *rho*, *rac* oraz odkrycie funkcjonalnych homologów tych produktów w genomie ludzkim [27], a także u robaka *Caenorhabditis elegans* [28] i innych modelowych komórkach ssaków pozwalają przypuszczać, że mechanizm uzyskania polarności przez komórkę jest uniwersalny i bardzo konserwatywny ewolucyjnie. W zależności od bodźca i rodzaju komórki, białka biegunowe uczestniczą w uruchamianiu nowych transkrypcji, oraz różnych typów reorganizacji cytoszkieletu. Reorganizacja cytoszkieletu może prowadzić do wyznaczania kierunku i stymulacji ruchu komórki, w innych przypadkach do wytworzenia miejsc przyczepu do podłoża i prawdopodobnie do (słabo jeszcze poznanej) koordynacji powstawania osi wrzeciona i położenia bruzdy. Białka polarne (septyny) związane są również z wyznaczaniem miejsca i reorganizacją cytoszkieletu w trakcie tworzenia bruzdy podziałowej w stadium cytokinezy. Kolejne pytanie dotyczy roli białek biegunowych w rozwoju.

V. Biegunowość jaja robaka *Caenorhabditis elegans* i wyznaczanie położenia bruzd podziałowych w embriogenezie

W trakcie oogenezy *Metazoa*, albo po zapłodnieniu, bądź też po kilku podziałach bruzdkowania odbywa się determinacja przestrzenna rozwoju zarodka. Proces ten jest dobrze poznany w przypadku oogenezy robaka *C. elegans*. 70 minut po zapłodnieniu oocyta robaka, filamenty aktynowe gromadzą się na przednim końcu jaja, natomiast pęcherzyki P (ang. *P-granules*) gromadzą się w biegunie tylnym jaja. W trakcie następnych 30 min jądro jaja (pronucleus żeński) zlewa się z jądrem plemnika (pronukleusem męskim). Jądro zygoty przesuwa się do tylnego bieguna jaja i zaczyna tworzyć wrzeciono mitotyczne wzdłuż osi przednio-tylnej zygoty. Przesunięcie do tyłu wrzeciona mitotycznego powoduje, że bruzda cytokinetyczna rozdziela asymetrycznie większy przedni blastomer (nazywany blastomerem AB) od tylnego mniejszego blastomeru



Ryc. 5 Schemat dwóch podziałów bruzdkowania jaja robaka *Caenorhabditis elegans*. A i P — osi przednio-tylna jaja w trakcie pierwszego podziału, a. drugi podział bruzdkowania w normalnym zarodku; z blastomeru AB tworzą się dwie komórki ABa i ABp; w blastomerze P1 zachodzi rotacja wrzeciona mitotycznego i potomne komórki EMS i P2 uzyskują prawidłową konfigurację (strzałka), b. rozmieszczenie aktywnego produktu PAR1 przez interakcję z białkiem biegunowym (homolog białka CDC42); c. obrót wrzeciona mitotycznego w mutancie *par 3* uniemożliwiający otrzymanie prawidłowej konfiguracji blastomerów; występuje symetryczny charakter miejsca przyczepu wrzeciona (strzałka). d. fenotypy mutantów *par 1, 2, 4, 5* o złej konfiguracji czterech blastomerów związanej z brakiem rotacji wrzeciona mitotycznego w blastomerze P1 i brakiem miejsca podczepienia wrzeciona do bruzdy AB/P1. Inne objaśnienia w tekście. Rysunek kombinowany wg [28-30].

P1 (Ryc. 5). Migracja jądra do tyłu i orientacja położenia bruzd w trakcie bruzdkowania podlega kontroli genetycznej kilkunastu produktów genów typu *par* (ang. *partition*).

Sklonowanie genu *par-1* wykazało, że produkt tego genu stanowi kinazę serynowo-treoninową rozmieszczoną równomiernie w obrębie jaja [29]. W trakcie pierwszego podziału jaja białko PAR1 przemieszcza się do tylnego blastomeru, a na tylnym biegunie tej komórki pojawia się skupienie białka homologicznego do CDC42. W drugim podziale bruzdkowania, wyłącznie w blastomerze P1 wrzeczono mitotyczne podlega rotacji o 90°, a położenie bruzdy w tym blastomerze staje się prostopadłe w stosunku do osi jaja. Rotacja wrzeczona mitotycznego kończy się podczepieniem do błony komórkowej jednego z biegunów wrzeczona mitotycznego komórki P1 w miejscu znajdującym się na bruzdzie podziałowej (ang. *cortical site*) rozdzielającej blastomery AB i P1 [30, 31] (Ryc. 5a). W tym okresie, kinaza PAR1 jest aktywowana przez GTPazę CDC42 i powstaje gradient tylno-przedni aktywacji tej kinazy (Ryc. 5b).

Mutanty genu *par 1* nie są zdolne do segregowania PAR-1 na końcu ciała, a także zanikają inne cechy biegunowości jaja. Inhibicja funkcji każdego z dwóch enzymów, zarówno kinazy PAR1 jak i GTPazy CDC42 powoduje w zarodku depolimeryzację zarówno mikrotubuli jak i rusztowania aktynowego. Wobec tego takie zarodki nie są zdolne do przeprowadzenia rotacji i podczepienia wrzeczona mitotycznego do miejsca bruzdy podziałowej pomiędzy blastomerami AB/P1. Powstaje wtedy zarodek złożony z czterech komórek o nieprawidłowej segregacji granul P i zarodek ginie (Ryc. 5d) [29]. Działając inhibitorami polimeryzacji aktyny na prawidłowe i normalne genetycznie jaja uzyskano fenokopie takiego nieprawidłowego braku rotacji wrzeczona w blastomerze P1 [32].

Inne mutanty typu *par* powodują również nieprawidłowe wyznaczanie położenia bruzd podziałowych w trakcie cytokinezy i wszystkie prowadzą do złego wzajemnego położenia blastomerów i śmierci zarodków (Ryc. 5d). Nieco inny charakter ma mutacja *par 3*. Otóż fenotypy mutantów *par 3* mają dwa ośrodki podczepiania wrzeczona mitotycznych do bruzdy AB/P1 po obu stronach przegrody (Ryc. 5c; strzałka), podczas gdy w zarodkach dzikich taki ośrodek na przegrodzie jest tylko w blastomerze tylnym (porównaj schemat Ryc. 5a i 5c). Zatem w fenotypach *par 3* rotacji podlegają oba wrzeczona mitotyczne zarówno w blastomerze AB jak i P1. Prowadzi to do nieprawidłowego ułożenia względem siebie blastomerów i braku kontaktu komórki P2 z ABp (Ryc. 5c) i oczywiście zarodek ginie.

Prawdopodobnie białko biegunowe CDC42 aktywuje kinazę PAR1 wyznaczając gradient tylno-przedni aktywacji jaja, a inne białka PAR uczestniczą w wyznaczaniu biegunowości zarodka niezbędnej dla prawidłowego rozwoju robaka [19, 29, 31, 32]. Jednak wyniki

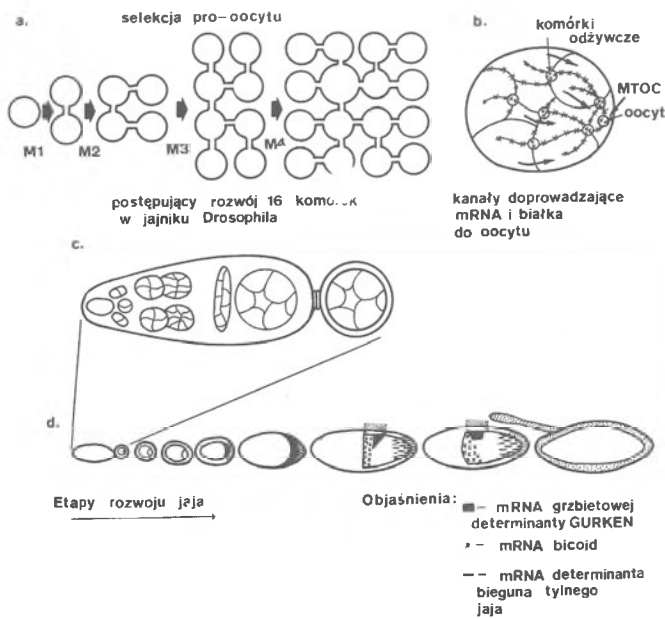
te, aczkolwiek imponujące, dotyczą tylko embriogenezy jaj o rozwoju determinacyjnym.

VI. Powstawanie osi w jaju *Drosophila melanogaster* jako przejaw wzajemnego oddziaływania na siebie oocytu i komórek folikularnych

W jaju *Drosophila melanogaster* białka biegunowe wykryto w bruzdach podziałowych w blastodermalnych komórkach, a więc w bardzo późnym stadium bruzdkowania [24]. Determinacja osi ciała odbywa się wcześniej, w trakcie oogenezy, i jest pod kontrolą somatycznych komórek folikularnych otaczających jajo. Badania wykazały, że powstanie osi ciała jest złożonym procesem kolejnych wzajemnych oddziaływań pomiędzy jajem a otaczającą warstwą komórek folikularnych. Te oddziaływania mają charakter pewnej sekwencji wysyłania sygnałów i odbierania ich, a następnie reakcji na sygnał w postaci reorganizacji cytoszkieletu i powstawania nowych transkryptów zarówno w jaju, jak i w poszczególnych komórkach folikularnych (metaforycznie mówiąc istnieje rozmowa pomiędzy oocytem, a komórkami folikularnymi). A więc instrukcja strukturalna w jaju muszki owocowej tworzy się przez pierwotne zróżnicowane podłoża cytoplazmatycznego jaja na etapie poprzedzającym pierwszy cykl mitotyczny przez kolejne interakcje jaja z poszczególnymi grupami przylegających komórek folikularnych.

Dla wyznaczenia osi przednio-tylnej i grzbietowo-brzuszej w oocyte *D. melanogaster* ma zasadnicze znaczenie określone rozmieszczenie poszczególnych rodzajów mRNA i białek wielu produktów genów matczynych. Wczesne stadia tworzenia polarności oocytu kontroluje kilka genów matczynych, które podlegają translacji w trakcie oogenezy. mRNA *bicoid* stanowi determinantę przedniego końca osi przednio-tylnej, a mRNA *staufer*, *nanos*, *oskar* i parę innych determinują tylny koniec osi. mRNA *gurken* i białko GURKEN determinują grzbietową część osi grzbietowo-brzuszej jaja, a następnie zarodka. Ustalenie tych osi w postaci gradientów skupienia tych mRNA i białek wyznacza porządek przestrzenny losów poszczególnych części zarodka (szczegółowe omówienie St. Johnston & Niisslein-Volhard [33]*). (W obrębie tych części zarodka odbywa się pierwotna i wtórna segmentacja, ale te późne etapy nie stanowią przedmiotu tego artykułu). Badania nad oogenezą wykazały jak ważną rolę w tym procesie odgrywa pierwotne funkcjonowanie cytoszkieletu, migracja jądra i różne formy kontaktu jaja z komórkami ościennymi. A oto główne stadia tego złożonego procesu [34, 35]:

* W utrzymywaniu tego porządku biorą udział m.in. wyspecjalizowane regulatory transkrypcyjne działające na poziomie chromatyny, o których mówi artykuł na stronie 238 niniejszego numeru „Postępów Biochemii”.



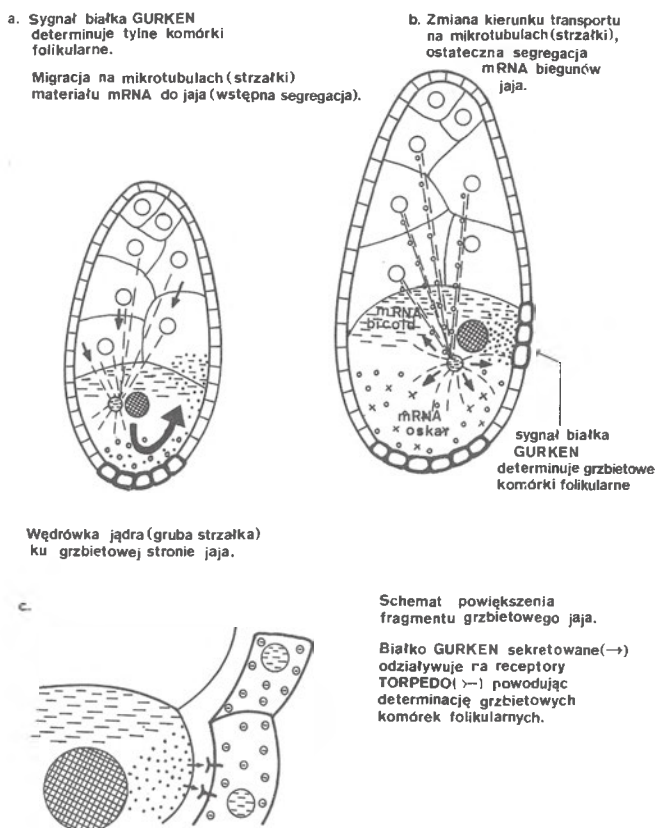
Ryc. 6 Oogeneza *Drosophila melanogaster*. Według [34] uproszczony, a. schemat selekcji oocyta i komórek odżywczych, b. schemat powstawania kanałów doprowadzających mRNA do oocyta, c. schemat powstawania w owarioli coraz bardziej zaawansowanych zespołów komórek składających się z komórek odżywczych i oocyta otoczonego warstwą komórek folikularnych, d. kolejne stadia rozwoju jaja w zespole komórek i stopniowe pojawianie się, strefowego występowania determinant w jaju. W późnym stadium rozwoju po stronie grzbietowej osłonki jajowej pojawiają się wyrostki (jeden przedstawiony na schemacie). Inne objaśnienia w tekście.

Jajnik *Drosophila* składa się z 16 owarioli; w których powstają zespoły komórek otaczających jajo. Wraz z rozwojem poszczególne zespoły komórek towarzyszące oogenezie są przesuwane ku tyłowi owarioli, a w przedniej części powtarza się proces tworzenia nowego zespołu (Ryc. 6a). Oogeneza *Drosophila* rozpoczyna się asymetrycznym podziałem komórki wyjściowej na proksymalny koniec owarioli na potomną komórkę wyjściową i na komórkę zwaną cytoblastem. Cytoblast przechodzi przez kolejne cztery podziały którym towarzyszą niepełne cytokinezy (Ryc. 6a; M1-M4). W rezultacie powstaje cysta 16 siostrzanych komórek połączonych między sobą mostami cytoplazmatycznymi zwanymi kanałami. Dwie komórki w obrębie 16-tu są połączone z innymi największą liczbą kanałów a jedna z tych dwóch uprzywilejowanych komórek staje się oocytem. Mechanizm tej determinacji nie jest znany. Tak więc tylko jedna komórka stanie się oocytem, a pozostałe 15 komórek stanowią poliploidalne komórki odżywcze (ang. *nurse cells*), które przekazują poprzez kanały mRNA i cytoplazmę do oocyta (Ryc. 6b). Taka cysta jest otoczona warstwą diploidalnych somatycznych komórek folikularnych i stanowi komorę jajową (ang. *egg chamber*) przesuwaną do części tylnej owarioli (Ryc. 6c, Ryc. 7a). W ciągu 79 godzin, kolejne 13 stadiów rozwoju prowadzi do powstania dojrzałej komórki jajowej (Ryc. 6d). Wraz z przesuwaniami się ku tyłowi oocyta wszystkie kanały początkowo gwiazdźdźście połączone między sobą stają się wydłużonymi kanałami z wiązkami mikrotubuli

skierowanymi ku centrosomowi (ang. *microtubule organization center, MTOC*) oocyta (Ryc. 7a).

Szczegółowe badania wykazały, że w stadiach 1-6 rozwoju, wiązki mikrotubuli są dekorowane dyneiną i wobec tego cytoplazma jest transportowana aktywnie z komórek odżywczych ku centrosomowi oocyta. W tym okresie jądro wraz z centrosomem znajduje się w środku oocyta i tam napływają przede wszystkim mRNA *oskar*, a także mRNA i białka STAUFEN i GURKEN, a nieco później mRNA *bicoid*. Mimo, że nie ma jeszcze wyraźnej strefowości w jajo, białka STAUFEN i GURKEN są w tylnej okolicy oocyta [34, 35] (Ryc. 6d).

Wyraźne strefowe rozmieszczenie poszczególnych typów mRNA i białek pojawia się w 7 i 8 stadium oogenezy i jest związane ze zmianą kierunku transportu cytoplazmy względem centrosomu. Centrosom wraz z jądrem przesuwa się ku tyłowi oocyta i wobec tego najpóźniej transportowany mRNA *bicoid* zostaje energicznie przesunięty do bieguna przedniego jaja, a pozostałe produkty do końca tylnego jaja. Szczegółowe badania nad mutantami tego procesu, i badania nad rolą mikrotubuli w polaryzowaniu się jaja [34, 35] zostały potwierdzone wykryciem udziału kinezy



Ryc. 7 Schemat podwójnego pojawiania się kolejno determinacji komórek folikularnych tylnych i grzbietowych przez sekretowanie białka GURKEN w trakcie migracji jądra w jaju *Drosophila melanogaster*.

a. determinacja tylnych komórek folikularnych (pogrubione obrysy komórek) w stadium 6-8 rozwoju, b. determinacja grzbietowych komórek folikularnych (pogrubione obrysy komórek) w stadium 8-10 rozwoju, c. schemat oddziaływania jaja w stadium 8-10 na przyległe komórki folikularne (system sygnałów GURKEN i receptorów TORPEDO). Według danych [40]. Inne objaśnienia w tekście.

w tym transporcie ku peryferiom jaja [36].

W tym okresie białko GURKEN znajdujące się na tylnym końcu oocytu jest wydzielane na zewnątrz jaja jako białko sekrecyjne i zaczyna oddziaływać jako bodziec na ościenne komórki folikularne. Odebranie tego sygnału przez tylne komórki folikularne powoduje ich określoną determinację jako tylne komórki folikularne (Ryc. 7a; pogrubione komórki folikularne). Jak się okazało białko GURKEN jest analogiem czynnika TGF alfa (ang. *transformation growth factor α*) i zawiera powtórzenia sekwencji charakterystycznych dla EGF. GURKEN uwalniane z tyłu oocytu oddziałują aktywnie na białko receptora błonowego (o charakterze TGF α) w przyległych komórkach folikularnych [37, 38]. To białko receptora komórek folikularnych jest kodowane przez gen *torpedo* i przyłączenie sygnału GURKEN powoduje uruchomienie syntezy czynników transkrypcyjnych w komórkach folikularnych i wyznacza ich nieodwracalną determinację (Ryc. 7c).

Najbardziej jednak niezwykłym odkryciem było stwierdzenie, że genotyp i determinacja losu poszczególnych komórek folikularnych oddziałują zwrotnie na polarność i losy jaja. Otóż mutanty genu *torpedo*, dotyczące przecież białek pojawiających się wyłącznie w komórkach folikularnych, a nie w jajach, nie tworzyły prawidłowej osi przednio-tylnej oocytu, a defektywny zarodek obumierał. Transplantacja dzikiego (normalnego) jaja do komory jajowej mutantu *torpedo* prowadziła do śmierci zarodka, podczas gdy zmutowane jajo *torpedo* implantowane do prawidłowej komory jajowej z normalnie zdeterminowanymi komórkami folikularnymi rozwijało się prawidłowo pomimo mutacji. Podobne badania wykazały, że mała grupa komórek folikularnych przednich kontroluje prawidłową lokalizację mRNA *bicoid* w jajach *Drosophila*. Dalsze badania potwierdziły, że determinacja osi przednio-tylnej jaja wymaga aby zdeterminowane komórki folikularne przednie i tylne wydzielili specyficzne białka sekrecyjne oddziałujące zwrotnie na odpowiednie receptory w przyległych częściach jaja. Procesy zwrotnego oddziaływania zdeterminowanych komórek folikularnych na poszczególne części oocytu mają istotnie charakter odbioru sygnału kontrolującego prawidłową polarność jaja, bo np. produkt genu *torso* wcześniej pojawiający się na powierzchni oocytu jest receptorem kinazą tyrozynową, a jej wczesna i prawidłowa aktywacja warunkuje prawidłowy rozwój zarodka [39].

W następnych stadiach rozwoju (8 do 10), jądro oocytu przemieszcza się wraz z przyległą cytoplazmą zawierającą białko GURKEN z położenia tylnego ku stronie grzbietowej oocytu (Ryc. 7a; gruba strzałka). Mechanizm tego przemieszczania jądra nie jest znany. W stadium 10 przemieszczone jądro aktywuje powtórnie sekrecję białka GURKEN. Przyległa cytoplazma bogata w GURKEN rozpoczyna sygnalizację oddziałując tym razem na przyległe komórki folikularne grzbietowe (Ryc. 7b; pogrubione komórki folikularne). Komórki folikularne odbierają ten sygnał i sta-

ją się komórkami zdeterminowanymi (grzbietowymi) (Ryc. 7c). Łatwo uchwytnym przejawem tej grzbietowej determinacji komórek folikularnych jest ich zdolność do wytwarzania charakterystycznego ukształtowania chorionu (czyli osłonki jaja) w postaci wyrostków (Ryc. 6d; ostatnie stadium rozwoju). Tak zdeterminowane grzbietowe komórki folikularne oddziałują zwrotnie na przyległą część jaja rozpoczynając serie kolejnych przemian w wyniku czego powstaje determinacja osi grzbietowo-brzuszej jaja. Tak więc obie osie jaja *Drosophila*: przednio-tylna i grzbietowo-brzusza powstają w wyniku dwukrotnego powtórzenia sekrecji sygnału GURKEN z oocytu, odbieranego przez komórki folikularne, które po zdeterminowaniu ich różnicowania oddziałują zwrotnie na ten oocyt nadając mu określoną determinację okolic przedniej, tylnej i grzbietowej [40].

VII. Wnioski i pytania

Wszystkie przytoczone tu przykłady wskazują na rolę procesów odbierania odpowiednich bodźców na determinację polarności ciała komórek. W wielu przypadkach udało się już powiązać rolę sygnałów z zewnątrz z nieprzypadkową reorganizacją cytoszkieletu, a nawet zbadać mechanizm transdukcji sygnału za pośrednictwem białek typu Ras, Rac, Rho i CDC42. Istnieją poważne przesłanki aby sądzić, że odkryte mechanizmy są uniwersalnymi mechanizmami tworzenia instrukcji przestrzennej w różnicowaniu i embriogenezie. Jest znaczny postęp w badaniach dotyczących organizacji i funkcjonowania bruzdy cytokinetycznej i septyn [41]. Niezwykle istotne są również badania nad wpływem sygnałów na uruchamianie i przełączanie jednego szlaku morfogenezy (np. podziałowej), na inny typ morfogenezy (np. pod wpływem gamonu) [42, 43].

Jak dotąd brak jednak wiadomości o udziale białek polarnych we wczesnej embriogenezie *Drosophila**, i kręgowców. Nadal nieznanym jest mechanizm regulujący instrukcję przestrzenną dotyczącą migracji aktywny w cyklu komórkowym i wyznaczania osi wrzeciona mitotycznego. Nieznane są mechanizmy wczesnych etapów tworzenia się pierwotnej organizacji cytoszkieletu jaj i migracji struktur wewnątrz komórki np. przesuwania się jądra jaja *Drosophila* niezbędnego dla prawidłowej determinacji osi ciała. Słabo poznany jest mechanizm regulacji kolejności (tzw. zegara) przemian cytoplazmatycznych w embriogenezie i różnicowaniu. W tej chwili badane są mechanizmy zwrotnych oddziaływań komórek różnych typów na przebieg ich różnicowania i uzyskania polarności. Odkrycie właśnie tych mechanizmów jest obecnym wyzwaniem; nic dziwnego, że właśnie tymi procesami zajmują się

* Właśnie ukazała się publikacja na ten temat: Murphy A M, Montell D J (1996) *J Cell Biol* 133: 617-630

obecnie ubiegłoroczny noblista Dr Wieschaus [44] i niemniej słynny Dr Nurse [45, 46] — odkrywca uniwersalnej roli cyklin w sterowaniu cyklem komórkowym.

Koszty artykułu są finansowane z grantu KBN Nr 6PO4C071 10.

Artykuł otrzymano 16 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 17 maja 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Chenevert J (1994) *Mol Biol Cell* 5: 1169-1175
2. Hall A (1990) *Science* 249: 635-640
3. Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakashini H (1995) *Trends Biol Sci* 20: 227-231
4. Rappaport R (1961) *J Exp Zool* 148: 81-89
5. Lew D, Reed SI (1995) *Curr Op Genetics Dev* 5: 17-23
6. Chant J, Herskowitz I (1991) *Cell* 65: 1203-1212
7. Chant J, Corrado K, Pringle JR, Herskowitz I (1991) *Cell* 65: 1213-1224
8. Konopka JB, DeMattei C, Davis C (1995) *Mol Cell Biol* 15: 723-730
9. Chant J, Stowers L (1995) *Cell* 81: 1-4
10. Adams AE, Johnson DI, Longnecker RW, Sloat BF, Pringle JR (1990) *J Cell Biol* 111: 131-142.
11. Johnson D, Pringle J (1990) *J Cell Biol* 111: 143-152
12. Ziman M, Preuss D, Mulholland J, O'Brien JM, Botstein D, Johnson DI (1993) *Mol Biol Cell* 4: 1307-1316
13. Miller PJ, Johnson DI (1994) *Mol Cell Biol* 14: 1075-1083
14. Zheng Y, Cerione R, Bender A (1994) *J Biol Chem* 269: 2369-2372
15. Simon M-N, De Virgilio C, Souza B, Pringle JR, Abo A, Reed SI (1995) *Nature (Lond)* 376: 702-705
16. Riedley AJ (1994) *J Cell Sci, Suppl* 18: 127-131
17. Olson MF, Ashworth A, Hall A (1995) *Science* 269: 1270-1272
18. Ron D, Zanini M, Lewis M, Wickner RB, Hunt LT, Grazia G, Tronick SR, Aaronson SA, Eva A (1991) *New Biol* 3: 372-379
19. Glotzer M, Hyman A (1995) *Curr Biol* 5: 1102-1105
20. Chenevert J, Valtz N, Herskowitz I (1994) *Genetics* 136: 1287-1297
21. Mazzoni C, Zarcov P, Rambourg A, Mann C (1993) *J Cell Biol* 123: 1821-1832
22. Zigmund SH (1996) *Curr Op Cell Biol* 8: 66-78
23. Frankhauser C, Reymond A, Cerutti L, Utzig S, Hofmann K, Simanis V (1995) *Cell* 82: 435-444
24. Neufeld TP, Rubin GM (1994) *Cell* 77: 371-379
25. Muhua I, Karpova TS, Cooper JA (1994) *Cell* 78: 669-679
26. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao Z, Lim L (1994) *Nature (Lond)* 367: 40-43
27. Shinjo K, Koland JG, Hart MJ, Narashimahan V, Johnson DI, Evans T, Cerione RA (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9853-9857
28. Kayne PS, Sternberg PW (1995) *Curr Op Genetics Dev* 5: 38-43
29. Guo S, Kemphues KJ (1995) *Cell* 81: 611-620
30. Strome S (1993) *Cell* 72: 3-6
31. Priess JR (1994) *Curr Op Genetics Dev* 4: 563-568
32. Allen VW, Kropf DL (1992) *Development* 115: 873-883
33. St. Johnston D, Nusslein-Volhard C (1992) *Cell* 68: 201-219
34. Theurkauf WE (1994) *Dev Biol* 165: 352-360
35. Sullivan W, Theurkauf WE (1995) *Curr Op Cell Biol* 7: 18-22
36. Clark I, Giniger E, Ruchola-Baker H, Jan LY, Jan NY (1994) *Curr Biol* 4: 289-300
37. Neumann-Silberberg FS, Schupbach T (1993) *Cell* 75: 165-174
38. Clifford RC, Schupbach T (1989) *Genetics* 123: 771-787
39. Duffy JB, Perrimon N (1994) *Dev Biol* 166: 380-395
40. Gonzales-Reyes A, Elliott H, St. Johnston D (1995) *Nature (Lond)* 375: 654-658
41. Chant J, (1996) *Cell* 84: 187-190
42. Herskowitz I (1995) *Cell* 80: 187-197
43. Kron SJ, Gow NAR (1995) *Curr Op Cell Biol* 7: 845-855
44. Scheiter ED, Wieschaus E (1993) *Annu Rev Cell Biol* 9: 67-99
45. Snell V, Nurse P (1994) *EMBO J* 13: 2066-2074
46. Chang F, Woollard A, Nurse P (1996) *J Cell Sci* 109: 131-142

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

Obecny adres:

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

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

Rola kompleksów chromatynowych w regulacji ekspresji genów podczas rozwoju

Chromatin complexes in regulation of gene expression during development

TOMASZ T. CALIKOWSKI*

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. *Drosophila melanogaster* — organizm modelowy do badań nad rozwojem
- III. Grupa genów *Polycomb* (*Pc-G*) — represory ekspresji genów
III-1. Modele działania *Pc-G*
- IV. Grupa genów *trithorax* (*trx-G*) i mechanizmy ich działania
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ANT-C — kompleks genów homeotycznych *Antennapedia*; BX-C — kompleks genów homeotycznych *Bithorax*; *Ubx* — gen homeotyczny *Ultra-bithorax*; *hb* — gen segmentacji *hunchback*; *Pc-G* — grupa genów *Polycomb* z *Drosophila*; *trx-G* — grupa genów *trithorax* z *Drosophila*.

I. Wstęp

Rozwój organizmu wielokomórkowego możliwy jest dzięki istnieniu systemu regulacyjnego, kierującego ekspresją genów w poszczególnych polach morfogenetycznych zarodka. Ekspresja genów u *Eukariota* zależy od dostępności matrycy DNA dla polimerazy RNA i czynników transkrypcyjnych. DNA w komórce eukariotycznej upakowany jest w złożone kompleksy nukleoproteinowe — chromatynę. Podstawową jednostką chromatyny są nukleosomy zbudowane z białek histonowych i owiniętego wokół nich DNA [32]. Struktura chromatyny wpływa w istotny sposób na dostępność DNA dla czynników regulacyjnych. Niektóre geny (tak zwane geny milczące, ang. *silent genes*), pozostają nieaktywne mimo obecności w komórce białek potrzebnych do ich transkrypcji. Geny te pozostają w stanie zablokowanym również po przejściu komórki przez mitozę. Tego rodzaju efekty przypisuje się często tworzeniu specyficznych struktur chromatynowych. Blokowanie ekspresji genów może wynikać nie tylko z występowania kompleksów nukleosomów w określonej pozycji (zwykle po promotorach genów

Contents:

- I. Introduction
- II. *Drosophila melanogaster* — a model for studying development
- III. The *Polycomb* gene group (*Pc-G*) — the repressors of gene expression
III-1. The models of *Pc-G*'s action
- IV. The *trithorax* gene group (*trx-G*) and its mode of action
- V. Conclusions

[33, 34]), ale również z tworzenia kompleksów chromatynowych wyższego rzędu. Chodzi tu w szczególności o kondensację chromatyny prowadzącą do utworzenia nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny.

Podczas rozwoju, w sterowaniu aktywnością za pomocą struktur chromatynowych biorą udział dwa złożone systemy regulatorowe — represyjnie działająca grupa genów *Polycomb* (*Pc-G*) i aktywatorowa grupa genów *trithorax* (*trx-G*). Geny *Pc-G* biorą udział w tworzeniu struktur silnie skondensowanej nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny w rejonach DNA zawierającego geny, które mają ulec trwałemu wyłączeniu. Geny *trx-G* przeciwdziałają tej represji rozluźniając chromatynę i czyniąc ją bardziej dostępną dla czynników aktywatorowych [3-5]. Produkty obu grup genów zaangażowane są również w wiele pozornie nie związanych ze sobą zjawisk takich jak wygaszanie ekspresji genów (*silencing*) u drożdży [52], kontrola genów rozwojowych u *Drosophila* i myszy a także powstawanie niektórych białaczek u człowieka [36, 39, 40].

II. *Drosophila melanogaster* — organizm modelowy do badań nad rozwojem

Wiele czynników zidentyfikowanych u *Drosophila* bierze udział w kształtowaniu podstawowego planu ciała już w bardzo wczesnych etapach rozwoju [2]. Geny związane z rozwojem u *Drosophila* podzielić można na trzy klasy: geny mateczne, geny segmentacji i geny homeotyczne. Różnią się one organizacją molekularną, sposobem działania i funkcją. I tak geny mateczne (około 30) działają jako pierwsze podczas oogenezy określając główne osie jaja. Geny te od-

* Mgr, Pracownia Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

powiadają za wykształcenie gradientów wzdłuż osi przód-tył i góra-dół zarodka, a tym samym za wytworzenie wstępnych wzorów rozwoju. Działanie ich rozpoczyna się jeszcze przed zapłodnieniem. Przedstawicielami genów matecznych są *bicoid*, *nanos* i *Toll* [1, 2, 6]. W kolejnym etapie rozwoju kaskadowa ekspresja genów segmentacji (około 25) dzieli zygotę na typowy u much szereg powtarzających się segmentów. Geny segmentacji ulegają ekspresji po zapłodnieniu jaja, zaś ich mutacje wpływają na liczbę lub orientację segmentów zarodka. Przedstawicielami tej grupy są geny *hunchback*, *even skipped* i *hedgehog*. Ostatnim typem genów rozwojowych są geny homeotyczne działające wzdłuż osi przód-tył. Dostarczają one segmentom, za pomocą specyficznej kombinacji produktów, informację niezbędną do wytworzenia struktur i przydatków charakterystycznych dla segmentów. Geny homeotyczne kontrolują tożsamość i położenie segmentów, lecz nie wpływają na ich liczbę, orientację lub wielkość. Mutacje w obrębie tych genów prowadzą do przekształcenia jednej części ciała w inną. I tak na przykład potrójna mutacja w genach homeotycznych *abx*, *bx* i *pbx* prowadzi do przekształcenia segmentu T3A (zawierającego przedmianki czyli zredukowane skrzydła) w tkankę typową dla segmentu T2 (niosącego skrzydła). W rezultacie powstaje mucha z dwiema parami skrzydeł zamiast jak zwykle z jedną [1, 2, 7]. Geny homeotyczne zgrupowane są w dwa bardzo duże kompleksy genowe liczące 300–350 kb (tysiący par zasad) każdy: kompleks genów *Antennapedia* (ANT-C), ulegający ekspresji w przedniej (tułowiowej) części zarodka oraz kompleks *Bithorax* (BX-C) związany z rozwojem segmentów odłokowych. W rozwój *Drosophila* zaangażowanych jest 8 genów homeotycznych, z czego 5 występuje w kompleksie ANT-C (między innymi geny *Antennapedia* i *Deformed*), a 3 w kompleksie BX-C (geny *Ultrabithorax*, *Abdominal-A* i *Abdominal-B*). Podobnie zorganizowane kompleksy genów homeotycznych występują również u kręgowców, w tym u myszy i człowieka [45]. Ekspresja genów homeotycznych jest konieczna nie tylko do przejścia komórek w stan zróżnicowany, ale również — w przeciwieństwie do wczesnych genów matecznych i segmentacji — do podtrzymania zróżnicowanego stanu komórki. Dlatego też geny homeotyczne są głównymi regulatorami rozwoju. Wszystkie czynniki działające na wczesnych etapach rozwoju (geny mateczne, segmentacji i homeotyczne, a także ich produkty) mają ściśle ograniczony czas działania. Na przykład produkt genu segmentacji *hunchback* (*hb*) działa jako represor homeotycznego genu *Ultrabithorax* (*Ubx*) przez około cztery godziny embriogenezy ograniczając ekspresję *Ubx* w przedniej części zarodka (granica ekspresji *Ubx* jest parasegment 5) [10]. Mimo krótkiego okresu działania *hb* ograniczona ekspresja genu *Ubx* jest zachowana podczas dalszych etapów rozwoju. Decyzje rozwojowe będące konsekwencją aktywności pierwotnych regulatorów

muszą być zatem podtrzymane przez osobny mechanizm zwany „pamięcią komórkową”. Taka działająca na dużą odległość i przez długi czas regulacja oparta jest u *Drosophila* na kontroli kondensacji chromatyny przez duże kompleksy białkowe, aktywujące lub reprimujące długie regiony chromosomowe. Ważną cechą „pamięci komórkowej” jest zdolność do rozpoznawania aktywnego lub nieaktywnego stanu ekspresji genów i do jego utrzymania przez wiele podziałów komórkowych. W przeciwieństwie do wczesnych regulatorów rozwoju, składniki takiej „pamięci” występują powszechnie we wszystkich komórkach.

III. Grupa genów *Polycomb* (*Pc-G*) — represory ekspresji genów

Geny *Pc-G* zostały zidentyfikowane jako represory genów homeotycznych. Mutacje w poszczególnych genach tej grupy prowadzą do transformacji przypominających transformacje wywołane mutacjami w samych genach homeotycznych [1] jak na przykład pojawienie się nóg pierwszej pary w miejscu nóg drugiej i trzeciej pary. Do tej pory poznano kilkanaście (11-15) genów tej grupy, z których najlepiej zbadane zostały geny *Polycomb* (*Pc*) [1, 11], *extra sex combs* (*esc*) [12], *Additional sex combs* (*Asx*), *Posterior sex combs* (*Psc*), *Sex comb on midleg* (*Scm*) [14], *Polycomb-like* (*Pcl*), *Super sex combs* (*Sxc*) [15], *polyhomeotic* (*ph*) [16], *Sex combs extra* (*Sce*) [17], *Enhancer of zeste* (*E(z)*) [18, 19] (Tab. 1). Liczbę genów tej grupy szacuje się na około 30-40 [8]. Geny grupy *Pc-G* są niezbędne do represji genów kontrolujących tożsamość segmentów (genów homeotycznych) ANT-C i BX-C w ciągu rozwoju. Zaobserwowano, że w zarodkach niosących mutację w genach *Pc-G* wczesny wzór ekspresji genów homeotycznych jest identyczny jak w zarodkach „dzikich”, nie mających mutacji w genach *Pc-G*. W ten sposób wykazano, że *Pc-G* nie są zaangażowane w wytworzenie wzorca ekspresji genów homeotycznych, ale raczej w jego podtrzymanie [20]. Z tego powodu geny *Pc-G* uważa się za kluczowe elementy systemu pamięci komórkowej. Zakłada się, że produkty *Pc-G* mogłyby rozpoznawać nieaktywny stan konkretnego genu homeotycznego, będący rezultatem działania wczesnych genów rozwojowych, a następnie utrzymywałyby ten stan w stabilny i dziedziczny sposób przez wiele podziałów komórki podczas rozwoju. Elementem kierującym kompleks białek *Pc-G* do właściwej sekwencji DNA może być represor wiążący się tylko przejściowo do celu (na przykład wczesny czynnik transkrypcyjny związany z DNA). Prawdopodobnym kandydatem do takiej funkcji może być produkt genu *hunchback* (*hb*) [42]. Stwierdzono, że geny *Pc-G* kontrolują nie tylko geny homeotyczne, ale również znaczną liczbę innych genów (będących często regulatorami procesów rozwojowych) prowadząc do ich inaktywacji [8, 21]. Ustalono na przykład, że jeden z genów *Pc-G*, *E(z)*, jest niezbędny do utrzymania

stabilnej represji dwóch genów segmentacji, które są przejściowo blokowane przez cząsteczki białka *hb* — *knirps* i *giant*. Wykazano, że fragment regionu regulacyjnego *knirps* (1.8 kb) zawierający liczne miejsca wiązania dla *hb* wykazuje prawidłowy wzór ekspresji genu reporterowego (podłączonego w opisywanym doświadczeniu do tego regionu) tylko w obecności *E(z)*, co świadczy o wspólnej sekwencji docelowej dla wczesnego represora *hb* oraz dla kompleksu *Pc-G* [41]. Do tej pory scharakteryzowano na poziomie molekularnym trzy geny grupy *Pc-G*. *Polycomb* (*Pc*) jest małym genem (4 kb) kodującym białko jądrowe o długości 390 aminokwasów (44 kDa) [22]. Zarówno sam transkrypt jak i białko rozmieszczone są równomiernie we wszystkich tkankach, chociaż najczęściej białka *Pc* stwierdza się w takich silnie proliferujących tkankach jak ośrodkowy układ nerwowy, dyski imaginalne i komórki hodowane *in vitro* [23, 27]. Białko *Pc* zawiera konserwowany ewolucyjnie motyw — chromodomenę, złożony z 48 aminokwasów i położony blisko N-końca cząsteczki. Motyw ten występuje między innymi w białku HP1 (białko związane z heterochromatyną *Drosophila melanogaster*) [25] jak również w białkach M31 i M32 myszy oraz w mysim białku CHD-1 zdolnym do wiązania DNA. Mimo tych związków z chromatyną nie wykryto ani wiązania białka *Pc* do DNA *in vitro*, ani też nie wykazano istnienia w tym białku znanych motywów wiążących się z DNA. Świadczy to o działaniu *Pc* poprzez dodatkowe czynniki. Białka *Pc*, *polyhomeotic* (*ph*) i *Posterior sex combs* (*Psc*) a także białko *Polycomb-like* (*Pcl*) wiążą się w około 80-100 różnych, lecz niemal wspólnych dla tych czterech białek, miejscach na chromosomach

politenicznych, przy czym białko *Pcl* wiąże się do chromosomów samodzielnie jeszcze w innych miejscach. Wyniki takie uzyskano za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko tym białkom [23, 24]. Białko *polyhomeotic* (*ph*) zostało dobrze poznane pod względem molekularnym; *ph* jest dużym białkiem (168 kDa) [24], zawierającym motyw pojedynczego palca cynkowego, co sugeruje zdolność wiązania do DNA. Również białko *Posterior sex combs* (170 kDa) zawiera region bogaty w cysteiny zdolny teoretycznie do tworzenia palców cynkowych i do wiązania DNA [26].

Białko *Psc* występuje w 75% miejsc chromosomowych, w których wiążą się białka *Pc* i *ph* [29]. Wspólna immunoprecypitacja białek tej grupy wskazuje, że *Pc-G* działają w dużych multimerycznych kompleksach zawierających co najmniej 10 składników [4]. Bezpośredni dowód na związek białek represyjnych ze strukturą chromatyny pochodzi z badań nad *Enhancer of zeste* (*E(z)*), jedynym przedstawicielem grupy *Pc-G*, dla którego opisano termowrażliwą mutację [29]. Inaktywacja białka *E(z)* poprzez podniesienie temperatury hodowli larw *Drosophila* do wartości niepermissywnej (zmiana z 23°C do 29°C) powodowała ogólną dekondensację (rozluźnienie struktury) chromosomów politeniczych. Brak produktu *E(z)* powodował dysrupcję kompleksu *Pc-G* i odłączenie białek *Psc*, *ph* i *Pc* od genów docelowych. Wyniki te świadczą o wpływie jaki multimeryczne białka *Pc-G* wywierają na wyższy poziom organizacji chromatyny — usunięcie jednego tylko białka tej grupy prowadzi do widocznych cyto logicznie zmian organizacji chromatyny.

Podobnie interesujące są wyniki badań nad ssaczym homologiem genów *Psc* i *Su(z)2* — mysim genem *bmi-1*

Tabela 1.

Sklonowane geny z grupy *Polycomb* i ich produkty [3].

Gen	Masa cząsteczkowa	Znane motywy białkowe	Homologi
<i>Polycomb</i> (<i>Pc</i>)	44 kDa	chromodomena	Su(var) 2-5 (<i>Drosophila</i>) M33 (mysz)
<i>polyhomeotic</i> (<i>ph</i>)	169 kDa	palec cynkowy	<i>rae 28</i> (mysz)
<i>Posterior sex combs</i> (<i>psc</i>)	170 kDa	palec RING	<i>BMI-1</i> (mysz/ człowiek) <i>mel18</i> (mysz)
<i>Polycomb-like</i> (<i>Pcl</i>)	95 kDa	nieznane	—
<i>Enhancer of zeste</i> (<i>E(z)</i>)	87 kDa	domena <i>trx</i> , palec cynkowy	<i>trx</i> , Su(var) 2-9, ssacze
<i>Suppressor of zeste 2</i> (<i>Su(z)2</i>)	144 kDa	palec RING	<i>BMI-1</i> (mysz/ człowiek)
<i>extra sex combs</i> (<i>esc</i>)	48 kDa	powtórzenia WD (oddziaływania białko-białko)	TUP-1 (drożdże) i ssacze

Chromodomena *Pc* jest niezbędna do działania białka [27], natomiast domeny typu palców cynkowych w białkach *ph* i *E(z)* i palców RING (*Psc*, *Su(z)2*) nie są nieodzowne do funkcjonowania tych białek [26, 28].

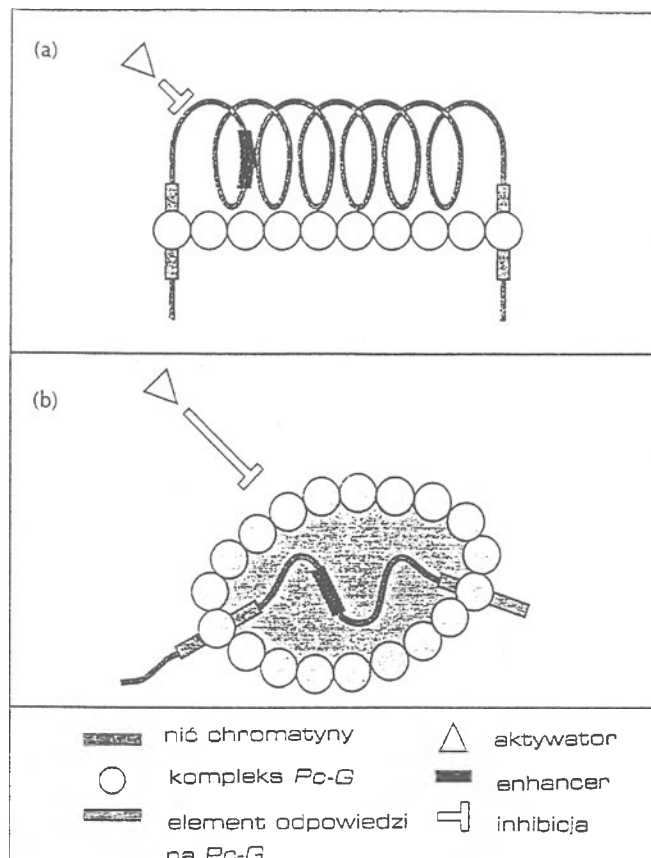
(znany jest również ludzki homolog tego genu [37]). Gen ten jest zaangażowany w powstawanie białeczek komórek B i T [35, 36], zaś jego brak u myszy *bmi1* prowadzi do przekształcenia przednich części szkieletu osiowego w struktury tylnych kręgów [37]. Nadekspresja *bmi-1* u zwierząt transgenicznych ujawnia przeciwny fenotyp: tym razem dochodzi do przesunięcia ekspresji licznych genów homeotycznych (w tym genu *Hoxc-5*) ku tyłowi ciała i szeregu deformacji rozwojowych. Deformacje te, to między innymi przemieszczenie wyrostka ościstego (*processus spinosus*) z drugiego kręgu piersiowego na trzeci (zmiana tożsamości kręgu z T3 na T2), wydłużenie i pogrubienie żeber L1 i zlanie się łuków neuronalnych na kręgach szyjnych C1 i C2 [38]. Represja genów *Hox* przez gen *bmi-1* przypomina zatem funkcję genów *Psc* i *Su(z)2* w stosunku do genów homeotycznych *Drosophila*. Natomiast produkt drożdżowego homologu genu *extra sex combs (esc)*, *Tup-1*, choć nie jest zdolny do bezpośredniego wiązania się z DNA, jest w stanie tworzyć duże multimeryczne kompleksy zdolne do stabilizowania nukleosomów w długich szeregach, co powoduje represję transkrypcyjną [43]. Jest więc możliwe, że podobne zjawisko zachodzi również podczas regulacji genów homeotycznych.

III-1. Modele działania genów grupy *Pc-G*

Zaproponowano dwa możliwe mechanizmy inaktywacji ekspresji genów przez białka *Pc-G*. Pierwszy polega na organizacji nici chromatynowej przez białka *Pc-G* w struktury wyższego rzędu (Ryc. 1a) [21]. DNA zawierałby miejsca reagujące na białka *Pc-G* (elementy odpowiedzi — ang. *Pc-G response elements, PREs*), od którego rozpoczynałoby się pakowanie chromatyny w struktury wyższego rzędu. Wewnątrz takiego kompleksu mogłyby zostać ukryte enhancery, niedostępne w ten sposób dla aktywujących czynników transkrypcyjnych. Drugi mechanizm to tworzenie przez kompleksy *Pc-G* przedziałów wewnątrzjądrowych (Ryc. 1b), w których elementy odpowiedzi (PRE) służą jako punkty zaczepienia chromatyny do białek *Pc-G*. Im więcej DNA zawiera taki kompleks, tym mocniejsza jest represja DNA [30, 31]. W związku z tym mogła to być jedna z przyczyn skupienia genów homeotycznych w dużych blokach (kompleksach) podczas ewolucji. Stabilna represja tych genów jest najłatwiejsza do osiągnięcia wtedy, gdy ich organizacja chromosomowa pozwala na zbudowanie dużych kompleksów represyjnych [21].

IV. Grupa genów *trithorax (trx-G)* — aktywatorów ekspresji genów

Drugą grupę genów biorących udział w regulacji genów homeotycznych jest grupa *trithorax (trx-G)* [44]. Produkty genowe przedstawicieli tej grupy są zdolne do aktywacji genów rozwojowych poprzez



Ryc. 1 Dwa modele działania *Pc-G* na chromatynę [21]

przeciwdziałanie represji wywołanej przez kompleksy *Pc-G*, nukleosomy i inne czynniki działające w *trans* na poziomie chromatyny. Mutacje w genach *trx-G* obniżają ekspresję genów homeotycznych podczas późniejszych etapów rozwoju. Niektóre z tych genów są supresorami mutacji w genach *Pc-G*, lecz w przeciwieństwie do tych ostatnich nie tworzą współdziałających kompleksów, zaś ich oczyszczone produkty mogą (przynajmniej w niektórych przypadkach) wiązać się do DNA *in vitro* [46]. Białka tej grupy są heterogenne pod względem sekwencji, struktury oraz miejsca i zapewne mechanizmu działania. Spośród poznanych do tej pory przeszło 18 przedstawicieli grupy [44, 47] dokładnie poznano trzy geny i ich produkty. Są to: *trithorax (trx)* [40, 48], *brahma* [49, 50] i *trithorax-like (trl)*, którego produkt zwany jest też czynnikiem GAGA [51] (Tab. 2).

brahma jest niezbędnym genem *Drosophila* — mutanty homozygotyczne *brahma* giną pod koniec embriogenezy [53]. Mutacje w *brahma* są supresorami transformacji spowodowanych przez mutacje w genach *Polycomb*. Białko *brahma* wykazuje uderzające podobieństwo do drożdżowego aktywatora transkrypcyjnego *Snf2/Swi2*, znanego również jako *GAM1* i *TYE3* [54]. U drożdży *Snf2/Swi2* jest czynnikiem koniecznym do transkrypcji wielu regulowanych genów. *Snf2/Swi2* nie wiąże się bezpośrednio do DNA, lecz łączy się z białkami *Swi1*, *Swi3*, *Snf5*, *Snf6* i pięcioma innymi, tworząc ogromny kompleks białkowy o masie 2 MDa zaangażowany w aktywację

Tabela 2.Konserwowane domeny w białkach grupy *trithorax* i ich homologi [4].

Białko	Motyw białkowy	Homologi
<i>trithorax (trx)</i>	domena SET palcie PHD	<i>Htrx-1, (HRX, MLL, ALL-1)</i> (człowiek/mysz)
<i>brahma (brm)</i>	bromodomena, DNA-zależna ATPaza, helikaza	<i>Swi2/Snf2</i> (drożdże) <i>brg1</i> (mysz/człowiek) <i>Hbrm</i> (człowiek)
<i>E(var)3-93D</i>	motyw tramtrack	—
<i>trithorax-like (trl)/czynnik GAGA</i>	motyw tramtrack, palec cynkowy	—

transkrypcyjną [50]. Podobieństwo białek *brahma* i *Swi2* jest największe w dwu regionach; pierwszym z nich jest domena ATPazy zależnej od DNA (500 aminokwasów), zaś drugim motyw tak zwanej bromodomeny (77 aminokwasów), występujący często w eukariotycznych białkach regulatorowych [4, 50]. Przyпуска się, że elementy te mogą brać udział w rozbijaniu struktur nukleosomowych i wspomagać czynniki i aktywatory transkrypcyjne w wiązaniu do odpowiednich elementów DNA (na przykład wiązanie aktywatorów transkrypcyjnych GAL4-VP16 i GAL4-AH) [55, 56]. Ludzki homolog genu *brahma*, *BRG1*, bierze również udział w kontroli cyklu komórkowego poprzez tworzenie kompleksów z białkiem *retinoblastoma*; odgrywa także rolę w integracji provirusów [57].

Czynnik *GAGA* jest aktywatorem transkrypcji wiążącym się do miejsc w DNA bogatych w powtórzenia $(GA)_n$ [46]. Czynnik ten kodowany jest przez gen z grupy *trx-G*, *trithorax-like (trl)*, i ma 519 aminokwasów [51]. Mutacje w genie *trl* prowadzą do transformacji homeotycznych przypominających mutacje w genach homeotycznych *Abd-B* i *Ubx* (na przykład powiększenie przedmianek i przekształcenie segmentów odwłoka), czyli prowadzą do obniżenia ekspresji tych genów homeotycznych. Stwierdzono, że *in vitro* czynnik *GAGA* wiąże się do DNA w pobliżu promotorowego bloku TATA, a następnie wykorzystując energię w postaci ATP, usuwa nukleosomy umożliwiając w ten sposób wiązanie się polimerazy II RNA i czynnika transkrypcyjnego TFIID [58, 59]. Ponadto czynnik *GAGA* przeciwdziała represji transkrypcyjnej będącej rezultatem działania histonu H1 [59].

Gen *trithorax (trx)* koduje co najmniej dwie izoformy białkowe — *trxI* o masie 368 kDa i *trxII* o masie 404 kDa, z których obie przechodzą złożony proces obróbki proteolitycznej [44, 48]. Białka *trx* zawierają region bogaty w cysteiny, położony w centralnej części białka i zdolny do tworzenia palców cynkowych [21, 44]. Mimo to nie udowodniono bezpośredniego wiązania *trx* do DNA. W *trx* występuje również drugi motyw białkowy, położony blisko jego C-końca i wspólny dla wielu białek *Drosophila*, w tym dla *Enhancer of zeste*, przedstawiciela grupy *Pc-G*. *trx* wiąże się do chromo-

somów politenicicznych w 16 różnych miejscach. Miejsca te w dużym stopniu pokrywają się z miejscami wiązania białka *Pc-G* (na przykład *E(z)* [48]). Wskazuje to na podobieństwa w mechanizmie działania białek obu tych grup. U *Drosophila* zarodki i dorosłe owady z mutacją *trx* wykazują transformacje homeotyczne podobne do obserwowanych w mutantach *Sex combs reduced (Scr)*, *Ubx*, *Antennapedia (Antp)*, *Abdominal-A* i *Abdominal-B*. Świadczy to, że *trx* jest konieczny do normalnej ekspresji tych genów, należących do kompleksów ANT-C i BX-C [60]. Niezwykle ciekawe jest działanie ludzkiego homologu *trx*, *ALL1 (MLL, HRX)*. Gen *MLL-1* (z ang. *mixed-lineage leukaemia*) położony jest na chromosomie 11, zaś jego rearanżacje (głównie typu translokacji) prowadzą do onkogenezy i powstawania białaczek u dzieci [61]. Gen *HRX (MLL)* jest niezwykle długi (około 100 kb), zawiera przynajmniej 21 eksonów, zaś jego produkt, białko o długości 3910 aminokwasów, ma trzy regiony homologii z *trithorax Drosophila*. Ocenia się, że 75% ostrych białaczek niemowlęcych związanych jest z rearanżacją genu *HRX* (lokus 11q23) [61, 62]. Heterozygotyczne mutacje w genie *MLL* u myszy prowadzą natomiast do zahamowania wzrostu, transformacji homeotycznych szkieletu osiowego i deformacji mostka [63]. Brak *MLL (-/-)* jest embrionalnie letalny. Dysrupcja jednej kopii genu (*MLL +/-*) powodowała przesunięcie granic ekspresji genów homeotycznych *Hoxa-7* i *Hoxa-9* ku tyłowi ciała, ale aktywność tych genów homeotycznych była zniesiona w zarodkach *MLL(-/-)*. Tak więc homolog genu *trithorax* jest konieczny do określenia tożsamości segmentów ciała i do kontroli ekspresji genów *Hox*.

Mechanizmy działania przedstawicieli grupy *trx-G* są zróżnicowane. Postuluje się [21], że białka *trx-G* tworzą kaskadę regulacyjną — czynniki *brahma* i *Trl/GAGA* mogłyby rozluźniać strukturę chromatyny z nakładem energii, a *trx* byłby czynnikiem „kotwiczącym” na poziomie DNA, koniecznym do przeciwdziałania represyjnym białkom *Pc-G*. Ważnym mechanizmem działania *trx-G* może być ponadto wypętlanie DNA, dzięki czemu odległe enhancery lokują się blisko miejsc promotorowych [44] i wzmacniają transkrypcję.

V. Podsumowanie

Omówione prace dowodzą, że regulacja ekspresji genów rozwojowych obejmuje nie tylko oddziaływanie białek z DNA, ale odbywa się w jądrze również na innych poziomach. W miarę poznawania składników kompleksów regulacyjnych będzie można wyjaśnić w jaki sposób stan transkrypcyjny genów utrzymywany jest stabilnie przez wiele podziałów komórkowych. Jest niemal pewne, że w procesach tych struktura chromatyny odgrywa istotną i trudną do przecenienia rolę.

Podziękowanie.

Chciałbym podziękować panu profesorowi dr hab. Andrzejowi Jerzmanowskiemu za wnikliwe i pomocne uwagi podczas przygotowywania tej pracy.

Artykuł otrzymano 5 marca 1996 r.
Zaakceptowano do druku 6 maja 1996 r.

Piśmiennictwo

- Lewis EB (1978) *Nature (Lond)* **276**: 565-570
- Lawrence PA (1992) W: The making of the fly Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Pirotta V (1995) *Curr Opin Gen Dev* **5**: 466-472
- Orlando V, Paro R (1995) *Curr Opin Gen Dev* **5**: 174-178
- Tamkun JW (1995) *Curr Opin Gen Dev* **5**: 473-477
- Ashburner A (1989) W: *Drosophila. A Laboratory Manual* Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Scott MP, Carroll SB (1987) *Cell* **51**: 689-698
- Elgin SCR (1995) W: *Chromatin Structure and Gene Regulation*, IRL Press, Oxford University Press, Oxford
- Urieli-Shoval S, Gruenbaum Y, Sedat J, Razin A (1982) *FEBS Lett* **146**: 148
- White RAH, Lehman R (1986) *Cell* **47**: 311-321
- Duncan I, Lewis EB (1982) W: *Subtelny S, Green FB, Developmental Order. Its Origin and Regulation* Alan R. Liss, New York
- Struhl G (1981) *Nature (Lond)* **293**: 36-41
- Dura J-M, Brock HW, Santamaria P (1985) *Mol Gen Genet* **198**: 213-220
- Jurgens G (1985) *Nature (Lond)* **316**: 153-155
- Ingham PW (1984) *Cell* **37**: 815-823
- Duncan I (1982) *Genetics* **102**: 49-70
- Breen TR, Duncan IM (1982) *Dev Biol* **118**: 442-456
- Jones RS, Gelbard WM (1990) *Genetics* **126**: 185-199
- Wu C-T, Jones RS, Lasko PF (1989) *Mol Gen Genet* **218**: 559-564
- Simon J, Chiang A, Bender W (1992) *Development* **114**: 493-505
- Paro R (1993) *Curr Opin Cell Biol* **5**: 999-1005
- Paro R, Hogness DS (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 263-267
- Paro R, Zink B (1992) *Mech Dev* **40**: 37-46
- De Camillis M, Cheng NS, Pierre D, Brock H (1992) *Genes Dev* **6**: 223-232
- Eissenberg JC, James TC, Foster-Harnett DM, Harnett T, Ngan V, Elgin S (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9923-9927
- Brunk BP, Martin EC, Adler PN (1991) *Nature (Lond)* **353**: 351-353
- Messmer S, Francke A, Paro R (1992) *Genes Dev* **6**: 1241-1254
- Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J (1991) *Cell* **64**: 483-484
- Rastelli L, Chan CS, Pirotta V (1993) *EMBO J* **12**: 1513-1572
- Simon J, Cheng A, Bender W, Shimamura MJ, O'Connor M (1993) *Dev Biol* **158**: 138-144
- Irvine KD, Helfland SL, Hogness D (1991) *Development* **111**: 407-424
- Kornberg RD (1974) *Science* **184**: 868-871
- Almer A, Rudolph H, Hinnen A, Horz W (1986) *EMBO J* **5**: 2689-2696
- Bresnick EH, John S, Berard DS, LeFebvre P, Hager GL (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3977-3981
- van Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, Wientjens E, van der Gulden H, Berns A (1991) *Cell* **65**: 737-752
- Haupt Y, Alexander WS, Barri G, Klinken SP, Adams JM (1991) *Cell* **65**: 753-763
- van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, te Riele H, van der Valk M, Deschamps J, Sofroniew M, van Lohuizen M (1994) *Genes Dev* **8**: 757-769
- Alkema MJ, van der Lugt NM, Bobeldijk RC, Berns A, van Lohuizen M (1995) *Nature (Lond)* **374**: 724-727
- Ford AM, Ridge SA, Cabero ME, Mahmood M, Steel CM, Chan LC, Greaves M (1993) *Nature (Lond)* **363**: 358-360
- Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML (1992) *Cell* **71**: 691-700
- Pelegri F, Lehmann R (1994) *Genetics* **136**: 1341-1353
- Bienz M (1992) *Curr Opin Cell Biol* **4**: 955-961
- Cooper JP, Roth SY, Simpson RT (1994) *Genes Dev* **8**: 1400-1410
- Kennison JA (1993) *Trends Genet* **9**: 75-79
- Lewin B (1994) W: *Genes V str 1166-1181* Oxford University Press, Oxford
- Biggin MD, Tijan R (1988) *Cell* **53**: 699-711
- Lindsley DL, Zimm GG (1992) W: *The Genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press
- Kuzin B, Tillib S, Sedkov Y, Mizrochi L, Mazo A (1994) *Genes Dev* **8**: 2478-2490
- Brizela BI, Elfring L, Ballard I, Tamkun JW, Kennison JA (1994) *Genetics* **137**: 803-813
- Peterson CL, Dingwall A, Scott MP (1994) *Proc Acad Sci USA* **91**: 1950-1954
- Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics M, Karch F (1994) *Nature (Lond)* **371**: 806-808
- Winston F, Carlson M (1992) *Trends Genet* **8**: 387
- Kennison JA, Tamkun JW (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8136-8140
- Tamkun JW, Denning R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA (1992) *Cell* **68**: 561-572
- Kwon H, Imbalzano AN, Khavan PA, Kingston RE, Green MR (1994) *Nature (Lond)* **370**: 477-481
- Imbalzano AN, Kwon H, Green MR, Kingson RE (1994) *Nature (Lond)* **370**: 481-485
- Dunaief JL, Strober BE, Guha S, Khavari PA, Alin K, Luban J, Begemann M, Crabtree GR, Goff SP (1994) *Cell* **79**: 119-130
- Tsukiyama T, Becker PB, Wu C (1994) *Nature (Lond)* **367**: 525-532
- Croston GE, Kerrigan LA, Lira LM, Marshak DR, Kadonaga J (1991) *Science* **251**: 643-649
- Breen TR, Harte PJ (1993) *Development* **117**: 119-134
- Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E (1992) *Cell* **71**: 701-708
- Zelevnik-Le NJ, Harden AM, Rowley JD (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10610-10614
- Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GAJ, Korsmeyer SJ (1995) *Nature (Lond)* **378**: 505-508

Kinazy MAP i ich rola w regulacji poziomu, składu podjednostkowego oraz stopnia fosforylacji czynnika transkrypcyjnego AP-1

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) — their role in regulation of protein level, subunit composition and degree of phosphorylation of the transcription factor AP-1

IRENEUSZ W. BIEDERMANN*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Ogólny schemat kaskady MAPK
- III. Kaskady MAPK występujące u kręgowców
- IV. Różnicowy wpływ czynników zewnątrzkomórkowych na aktywność poszczególnych kaskad MAPK
- V. Mechanizmy aktywujące kaskady MAPK
- VI. Czynniki transkrypcyjne jako substraty kinaz MAP
- VII. Regulacja aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 jako efekt współdziałania różnych kaskad MAPK
- VIII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: MAPK, kinaza MAP — kinaza białkowa aktywowana przez czynniki mitogenne, MKP — fosfataza kinazy MAP; MAPKK — kinaza kinazy MAP (kinaza aktywująca kinazę MAP); MAP3K — kinaza kinazy aktywującej kinazę MAP; MAP4K — kinaza kinazy kinazy aktywującej kinazę MAP; MAPKAPK — kinaza białkowa aktywowana przez kinazę MAP; ERK — kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ang. *Extracellular-signal Regulated Kinase*), dawniej określana jako kinaza MAP; MEK — kinaza aktywująca ERK; Raf — kinaza aktywująca MEK; PKC — kinaza białkowa C; AP-1 czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *Activator Protein-1*), dimer białek Fos i Jun; JNK — kinaza białka c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal Kinase*); SAPK — kinaza białkowa aktywowana przez stres, synonim dla JNK; JNKK, SEK — kinaza aktywująca JNK; MEKK — kinaza aktywująca JNKK, dawniej uważana za kinazę aktywującą MEK; FRK — kinaza białka c-Fos (ang. *c-Fos Regulating Kinase*); p38/RK — kinaza reaktywująca MAPKAP kinazę-2, (ang. *Reactivating Kinase*); RKK — kinaza aktywująca p38/RK; GTP — trójfosforan guanozyny; Ras, Rac1, Cdc42, RhoA — niskocząsteczkowe GTP-azy (niskocząsteczkowe białka wiążące GTP, niskocząsteczkowe białka G); PAK — kinaza aktywowana przez białka Rac1 i Cdc42 (ang. *p21-Cdc42/Rac-activated kinase*); SRF — czynnik transkrypcyjny (ang. *Serum Response Factor*) uczestniczący w regulacji genu *c-fos*; TCF — czynnik transkrypcyjny (ang. *Ternary Complex Factor*) uczestniczący w regulacji genu *c-fos*; ATF2 — czynnik transkrypcyjny uczestniczący w regulacji genu *c-jun*.

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

Contents:

- I. Introduction
- II. General scheme of the MAPK cascade
- III. MAPK cascades of vertebrate cells
- IV. Differential effect of extracellular stimuli on activity of particular MAPK cascades
- V. MAPK cascades — mechanisms of activation
- VI. Transcription factors as the substrates of MAPKs
- VII. Transcription factor AP-1 regulation as an effect of cooperation of different MAPKs
- VIII. Concluding remarks

I. Wstęp

Funkcjonalnym wyróżnikiem aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 jest zdolność do specyficznego wiązania się z sekwencją TGA(C/G)TCA, przy czym — o ile sekwencja ta występuje w regionie promotorowym jakiegoś genu — związanie się z nią czynnika transkrypcyjnego AP-1 może prowadzić do wzmożonej ekspresji produktu tego genu. Należy zauważyć, że termin „czynnik transkrypcyjny AP-1” jest używany jako zbiorowe określenie homo- i heterodimerów białek rodziny Jun (c-Jun, Jun B, Jun D), oraz heterodimerów białek Jun z białkami rodziny Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1 i Fra-2). Istotną cechą genów kodujących białka rodzin Jun i Fos, pozwalającą zaliczyć te geny do tzw. grupy genów odpowiedzi wczesnej (ang. *Immediate Early Genes, IEG*), jest to, że aktywacja transkrypcji tych genów nie wymaga uprzedniej biosyntezy białka [1, 2].

Aktywacja czynnika transkrypcyjnego AP-1, czy to poprzez *de novo* syntezę jego składników, czy też poprzez fosforylację uprzednio istniejących, następuje wskutek zadziałania na komórkę wielu różnych czynników (hormony, neuroprzekazniki, czynniki wzrostowe, cytokiny, czynniki rakotwórcze, szok osmotyczny, inne) i pośredniczy w różnorodnej, adekwatnej do działającego czynnika, odpowiedzi komórki (różnicowanie, proliferacja, transformacja nowotworowa, apoptoza, inne). Chociaż wobec dużej liczby możliwych

wariantów czynnika AP-1 nie powinno dziwić, że czynnik ten uczestniczy w tak różnorodnych reakcjach komórek, to jednak wyjaśnienia wymaga mechanizm, dzięki któremu działające czynniki zewnętrzne determinują poziom, skład podjednostkowy i stopień ufosforylowania czynnika AP-1.

Do odpowiedzi na postawione wyżej ważne i ciekawe pytanie zbliżyło nas niewątpliwie odkrycie w ostatnich latach nowych kinaz białkowych [3-6], należących do grupy tzw. kinaz aktywowanych przez czynniki mitogenne (kinazy MAP, MAPK). Kinazy MAP są kluczowym ogniwem łańcucha kolejno aktywowanych kinaz białkowych, tworzącego kaskadę fosforylacji, zwaną kaskadą MAPK. Ta ostatnia uważana jest za wspólny dla kręgowców, drożdży i innych organizmów eukariotycznych podstawowy mechanizm sprzęgający zachodzącą na poziomie błony komórkowej pierwotną reakcję komórki na działanie czynników zewnętrznych z właściwą, często wymagającą zmiany poziomu ekspresji odpowiednich genów, odpowiedzią komórki na dany bodziec [3, 4].

Dla omawianych tutaj zagadnień szczególne znaczenie ma fakt, że dwie z trzech nowoodkrytych kinaz MAP, a mianowicie JNK (ang. *c-Jun N-terminal Kinase*, [5] i FRK (ang. *Fos Regulatin Kinase*, [6] bezpośrednio fosforylują składniki czynnika AP-1. Warto również nadmienić, że dotychczas znana kinaza MAP, określana ostatnio jako ERK (ang. *Extracellular-signal Regulated Kinase*), najprawdopodobniej uczestniczy w aktywacji czynnika AP-1 [4] oraz, że udział kolejnej kinazy MAP w tym procesie jest postulowany [7].

Zasygnalizowane powyżej fakty jasno sugerują, że pytanie o mechanizm modulowania aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 poprzez działające na komórkę czynniki zewnętrzne można rozbić na dwie części, mianowicie: (i) jak czynniki zewnętrzne wpływają na aktywność poszczególnych kinaz MAP, oraz (ii) jak różne kinazy MAP modulują poziom, skład podjednostkowy i stopień fosforylacji czynnika transkrypcyjnego AP-1. Celem niniejszego artykułu jest, poprzedzona skrótową charakterystyką omawianych kinaz MAP i odpowiadających im kaskad MAPK, próba odpowiedzi na tak sformułowane pytania.

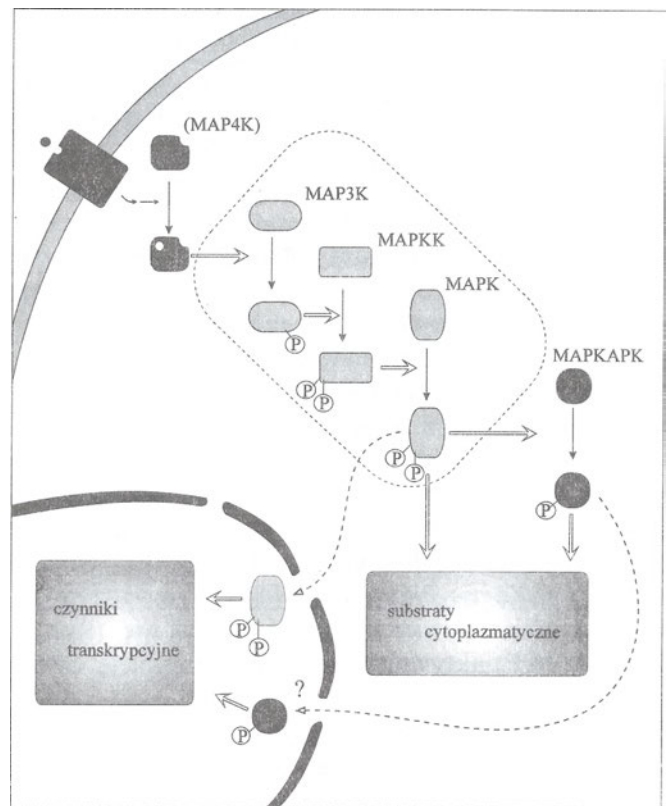
II. Ogólny schemat kaskady MAPK

Składnikami występującymi we wszystkich znanych obecnie wariantach kaskady MAPK, zarówno u kręgowców jak i u drożdży, są: (i) kinaza MAP (MAPK, ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*), (ii) kinaza aktywuująca kinazę MAP, określana jako MAPKK (ang. *MAP Kinase Kinase*), oraz (iii) kinaza kinazy aktywuującej kinazę MAP, określana jako MAPKKK lub MAP3K (ang. *MAP Kinase Kinase Kinase*). Ta ostatnia kinaza, podobnie jak dwie poprzednie, może być aktywowana przez fosforylację, z tym, że funkcję odpowiedzialnej za ten proces kinazy, określanej cza-

sami jako MAP4K, mogą w poszczególnych realizacjach kaskady MAPK pełnić różne, aktywowane przez receptory błonowe, kinazy białkowe, w szczególności kinaza białkowa C, kinazy tyrozynowe, czy też bliżej nieokreślone kinazy aktywowane przy współdziałaniu białek wiążących GTP [3, 4, 8]. Należy tutaj podkreślić, że mechanizmy aktywacji MAP3K nie są do końca wyjaśnione. W szczególności wydaje się, że przynajmniej niektóre MAP3K mogą być aktywowane w procesie nie wykorzystującym fosforylacji (patrz rozdział V).

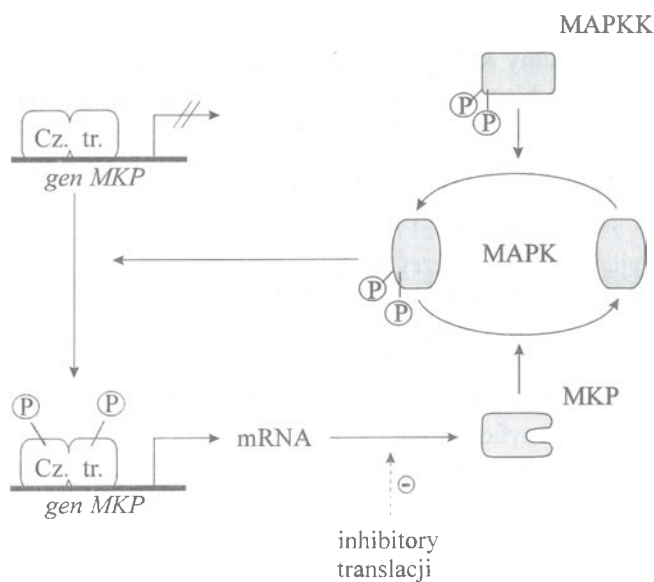
O ile zarówno MAP3K jest zwykle kinazą specyficzną dla odpowiadającej jej MAPKK, jak i MAPKK jest kinazą specyficzną dla określonej kinazy MAP, o tyle ta ostatnia może fosforylować różne substraty, również inne kinazy, określane jako „kinazy białkowe aktywowane przez MAPK” (MAPKAPK) i uważane za kolejne ogniwo kaskady MAPK. Istotną grupą substratów kinaz MAP stanowią czynniki transkrypcyjne [3-6, 8], fosforylowane *in vivo* po przemieszczeniu się kinazy MAP do jądra komórkowego [9].

Omówione powyżej relacje między kinazami i ich substratami zilustrowano na rycinie 1. Jak widać,



Ryc. 1 Aktywacja kaskady MAPK jako podstawowy mechanizm umożliwiający modulację aktywności czynników transkrypcyjnych w odpowiedzi na pobudzenie receptorów błonowych.

Poza przedstawioną tutaj aktywacją MAP3K poprzez fosforylację obecnie znane są inne, prawdopodobnie niezależne od fosforylacji, mechanizmy aktywacji tej kinazy. Ufosforylowana kinaza MAP może fosforylować substraty cytoplazmatyczne, lub — po przemieszczeniu się do jądra komórkowego — substraty jądrowe, głównie czynniki transkrypcyjne. Kinazy poziomu MAP4K i MAPKAPK nie występują (lub też nie zostały dotychczas zidentyfikowane) w części obecnie znanych kaskad MAPK. Stosowane skróty uwzględniono w wykazie pod spisem treści.



Ryc. 2 Regulacja aktywności kinazy MAP (MAPK) przez kinazę aktywującą kinazę MAP (MAPKK) i fosfatazę kinazy MAP (MKP).

Zaktywowana (ufosforylowana przez MAPKK) kinaza MAP (MAPK) po przemieszczeniu się do jądra komórkowego fosforyluje czynniki transkrypcyjne (Cz. tr.) związane ze specyficznymi sekwencjami w rejonie promotorowym genu fosfatazy kinazy MAP (MKP). Prowadzi to do syntezy *de novo* MKP. Nowopowstała fosfataza poprzez defosforylację inaktywuje MAPK. Inhibitory translacji przerywając widoczną tutaj pętlę sprzężenia zwrotnego prowadzą do nagromadzenia mRNA będącego produktem transkrypcji genu MKP i innych genów odpowiedzi wczesnej (ang. *Immediate Early Genes, IEG*). Opracowano wg [4, 11, 57]. Nie można wykluczyć udziału innych fosfataz białkowych w regulacji MAPK [10].

przedstawiony tam schemat pokazuje jak docierający do błony komórkowej sygnał aktywując kaskadę MAPK, uruchamia zależne od niej procesy. Na schemacie tym nie pokazano natomiast, poznanego w znacznie mniejszym stopniu, mechanizmu wyłączającego kaskadę MAPK. Wydaje się, że pewną rolę mogą odgrywać tutaj fosfatazy białkowe takie jak fosfataza PP-2A i fosfataza tyrozynowa [10]. Istnieją też dane wskazujące, że istotnym składnikiem tego mechanizmu jest specyficzna dla kinazy MAP fosfataza (MKP, ang. *MAP Kinase Phosphatase*) [11], kodowana przez jeden z genów odpowiedzi wczesnej [4]. Tak więc (Ryc. 2) kinaza MAP, aktywując poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych, transkrypcję genów odpowiedzi wczesnej, uruchamia jednocześnie pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego prowadzącą do jej dezaktywacji poprzez defosforylację w wyniku aktywności zsyntetyzowanej *de novo* fosfatazy kinazy MAP. W chwili obecnej nie są dostatecznie poznane mechanizmy prowadzące do wyłączenia kaskady MAPK na poziomie MAPKK czy MAP3K.

Opisany tutaj ogólny schemat kaskady MAPK jest, z niewielkimi modyfikacjami, wspólny dla wszystkich obecnie znanych kinaz MAP. Kinazy te wykazują także znaczne podobieństwa strukturalne i funkcjonalne. W szczególności należy odnotować, że (i) wszystkie kinazy MAP są aktywowane poprzez jednoczesną fosforylację reszty treoniny i tyrozyny oraz (ii) wszyst-

kie kinazy MAP fosforylują w substratach reszty seryny lub treoniny występujące w bezpośrednim sąsiedztwie reszty proliny (ang. *proline-directed kinases*) [3].

III. Kaskady MAPK występujące u kręgowców

Przeważająca większość badań nad kaskadami MAPK prowadzona jest na dwóch doświadczalnych układach modelowych: drożdżach i hodowanych *in vitro* komórkach zwierzęcych (zwłaszcza ssaczych). Ponieważ znaczna część wyników, dotyczących regulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1, pochodzi również z badań wykorzystujących ten ostatni model, ograniczę się w tym opracowaniu do bardziej szczegółowego omówienia czterech głównych klas kinaz MAP występujących u kręgowców. O trzech z nich wspomniano we wstępie do tego artykułu (ERK, JNK, FRK), czwarta określana bywa najczęściej jako p38/RK.

Pierwsza z wymienionych kinaz, ERK, występuje w dwóch izoformach: ERK1 (44 kDa) i ERK2 (42 kDa) [12]. Warto odnotować, że kinazę tę pierwotnie otrzymano ze stymulowanych insuliną adypocytów i na podstawie oznaczanej *in vitro* specyficzności substratowej nazwano kinazą białka MAP-2 (ang. *Microtubule-Associated Protein-2 kinase*) [13]. Później nazwę tej kinazy zmieniono na MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*), i to określenie, chociaż zalecane jest obecnie dla całej rodziny kinaz MAP, bywa używane jako synonim ERK [8].

Pod różnymi nazwami występuje również JNK. Mianowicie, występujące w komórkach człowieka izoformy tej kinazy określa się jako JNK1 (46 kDa) i JNK2 (55 kDa) [5, 14-16], a izozymy występujące u szczura oznaczają się jako SAPK α (55 kDa, ang. *Stress-Activated Protein Kinase*), SAPK β (55 kDa) oraz SAPK γ (45 kDa) [17].

Kolejna kinaza, odkryta we wrześniu 1994 r. FRK (88 kDa) jest jeszcze stosunkowo mało poznana i — jako jedyna z omawianych tutaj kinaz MAP — nie została dotychczas sklonowana [6].

Ostatnia z omawianych tutaj kinaz, p38/RK, została zidentyfikowana jako występujący u ssaków homolog drożdżowej kinazy MAP, określanej jako HOG1 (*High-Osmolarity Glycerol response 1*) [18, 19]. Niezależnie opisano ten enzym jako kinazę zdolną do reaktywacji zdefosforylowanej *in vitro* MAPKAP kinazy-2 (ang. *Reactivating Kinase, RK*) [20].

Wyżej wspomniano, że aktywacja kinaz MAP zachodzi poprzez jednoczesną fosforylację reszty treoniny i tyrozyny. Reszty te, wraz z rozdzielającym je pojedynczym aminokwasem, tworzą tak zwane miejsce podwójnej fosforylacji. Odpowiadającą temu miejscu sekwencją jest Thr-Glu-Tyr (TEY) w ERK [12], Thr-Pro-Tyr (TPY) w JNK [14-17] oraz Thr-Gly-Tyr (TGY) w p38/RK [18]. Te różne warianty miejsca

podwójnej fosforylacji rozpoznawane są przez specyficzne kinazy aktywujące kinazy MAP (MAPKK). Są nimi, odpowiednio, MEK [21], JNKK [22] (zwana też SEK [23, 24]) i RKK [20].

Znane są dwa izozymy MEK [21], określane jako MEK1 (44 kDa) i MEK2 (45 kDa) lub też jako MKK1 i MKK2. Scharakteryzowano też dwie dalsze MAPKK-MKK3 i MKK4 [25]. Pierwsza z tych kinaz aktywuje specyficznie p38/RK i przypuszczalnie jest izozymem RKK. Druga kinaza (MKK4) aktywuje zarówno JNK jak i p38/RK, ale pomimo tego uważana jest za izozym JNKK.

Jak się przypuszcza kinazy aktywujące kinazy MAP (MAPKK) są również aktywowane poprzez podwójną fosforylację, zachodzącą w tym przypadku w obrębie sekwencji złożonej z dwóch reszt seryny i/lub treoniny rozdzielonych trzema innymi aminokwasami [26]. Kinazą odpowiedzialną za aktywację MEK (poprzez fosforylację w obrębie sekwencji Ser-Met-Ala-Asn-Ser, SMANS) jest białko Raf-1 [27, 28], analogiczną funkcję w kaskadzie JNK pełni, przypisywane początkowo do kaskady ERK, białko MEKK [24, 29]. Przypuszcza się, że któryś z czterech znanych izozymów MEKK pełni funkcję MAP3K w kaskadzie p38/RK [3, 8]. Obecnie nie są znane białka poziomu MAPKK i MAP3K kaskady FRK.

Dwie z omawianych kaskad, ERK i p38/RK, są rozszerzone o kinazę białkową aktywowaną przez MAPK, odpowiednio MAPKAPK-1 [30] i MAPKAPK-2 [20, 30]. Pierwsza z tych kinaz, opisana pierwotnie jako kinaza fosforylująca rybosomalne białko S6, określana jest często jako RSK [31].

Opisana w kilku ostatnich akapitach organizacja występujących u kręgowców wersji kaskady MAPK została podsumowana w tabeli 1. Należy zaznaczyć, że w najbliższym czasie lista znanych kinaz MAP i odpowiadających im kaskad MAPK zostanie prawdopodobnie rozszerzona o nowych przedstawicieli.

Powyższy zarys obejmuje niezbędne minimum informacji o kaskadach MAPK. Więcej szczegółów zainteresowany Czytelnik znajdzie w poświęconych

kaskadom MAPK pracach przeglądowych [3, 4, 8]. Pominięte tutaj zupełnie kaskady MAPK drożdży omówiono w [32].

IV. Różnicowy wpływ czynników zewnątrzkomórkowych na aktywność poszczególnych kaskad MAPK

Kilkukrotny, czasami nawet kilkudziesięciokrotny, wzrost aktywności kinaz MAP można zaobserwować już w kilkanaście sekund po zadziałaniu na komórki wielu różnych czynników. Niektóre z tych czynników, przykładowo szok osmotyczny [7, 18], prowadzą zwykle do aktywacji wszystkich badanych kinaz MAP; inne — jak naskórkowy czynnik wzrostowy (EGF) — wykazują efekt zależny od rodzaju stosowanych w badaniach komórek [5]. Znane są też czynniki aktywujące stosunkowo selektywnie wybrane kinazy MAP. Jednakże, ponieważ JNKK (MKK4) może fosforylować zarówno JNK, jak i p38/RK, nie powinno dziwić, że czynniki wywołujące wzrost aktywności JNK pobudzają również w pewnym stopniu p38/RK [25].

Z omawianych kinaz jedynie ERK reaguje znacznym wzrostem aktywności na potraktowanie komórek znany aktywator kinazy białkowej C (PKC) — estrami forbolu [17, 18]. Z kolei ponad 30-krotny wzrost aktywności JNK obserwuje się w komórkach poddanych działaniu krótkofalowego promieniowania ultrafioletowego. W tych samych warunkach praktycznie nie obserwuje się zmiany aktywności ERK, natomiast widoczny jest kilkukrotny wzrost aktywności p38/RK [5, 7]. Do podobnych wyników prowadzi potraktowanie komórek kwasem okadajowym lub anizomycyną [5, 33]. Pierwsza z tych substancji jest znany inhibitorem fosfataz białkowych PP1 i PP2A, druga równie znany inhibitorem translacji. Jest ciekawe, że już przy stężeniach anizomycyny nie wystarczających do pełnego zahamowania translacji, obserwuje się wyraźny wzrost aktywności JNK [33].

Ważną grupę substancji aktywujących kinazy MAP stanowią, działające za pośrednictwem swoistych rece-

Tabela 1.

Obecnie znane kaskady MAPK występujące u kręgowców

	Kaskada ERK	Kaskada JNK	Kaskada p38/RK	Kaskada FRK
MAP3K	Raf [27, 28] Raf-1 (70-75 kDa)	MEKK [24, 29] 4 izoformy	?	?
MAPKK	MEK [21] MEK1 (44 kDa, MKK1) MEK2 (45 kDa, MKK2)	JNKK (SEK) [22-25] JNKK SEK1 MKK4	RKK [20, 25] RKK MKK3 MKK4 (?)	?
MAPK	ERK [8, 12, 13] ERK1 (44 kDa) ERK2 (42 kDa)	JNK (SAPK) [5, 14-17] JNK1 (46 kDa) JNK2 (55 kDa) SAPK α (55 kDa) SAPK β (55 kDa) SAPK γ (45 kDa)	p38/RK [18-20] p38 (RK, Mpk2)	FRK [6] FRK (88 kDa)
MAPKAPK	MAPKAPK-1 (RSK) [30, 31]	—	MAPKAPK-2 [20, 30]	—

ptorów błonowych hormony [13], neuroprzebieżniki [34], czynniki wzrostowe i cytokiny.

Aktywację JNK i p38/RK obserwowano w komórkach traktowanych, zaliczaną do cytokin, interleukiną-1 [14, 17]. Bardziej selektywną aktywację p38/RK wywołuje, działająca za pośrednictwem specyficznego receptora, endotoksyna bakteryjna (lipopolisacharyd, LPS) [18].

Stosunkowo niewiele wiadomo o czynnikach wpływających na aktywność FRK. Aktywność tego enzymu nie zmienia się w komórkach poddanych działaniu promieniowania ultrafioletowego, czy też potraktowanych estrami forboleu, natomiast kilkukrotnie wzrasta w komórkach traktowanych EGF [6]. Ten ostatni czynnik w większości badanych komórek wywołuje także wzrost aktywności zarówno ERK, jak też — chociaż zwykle w mniejszym stopniu — JNK [5, 33]. Z odwrotną sytuacją, czyli silnym wzrostem aktywności JNK a słabym ERK, mamy do czynienia w komórkach traktowanych, zaliczanym do cytokin, czynnikiem martwicy nowotworów (TNF, ang. *Tumor Necrosis Factor*) [15, 17].

Chociaż obecnie uważa się, że kinazy MAP pośredniczą w odpowiedzi komórki na większość czynników zewnątrzkomórkowych, to jednak powyższe omówienie właściwie wyczerpuje listę czynników, których wpływ na aktywność różnych kinaz MAP porównywano. Przyczyną tego stanu rzeczy jest to, że w ciągu niespełna dwóch lat, które upłynęły od odkrycia nowych kinaz MAP, główny wysiłek badaczy został skoncentrowany na próbach ustalenia mechanizmu wiążącego aktywację różnych receptorów błonowych z poszczególnymi kaskadami MAP. Przejdziemy teraz do omówienia wyników tych badań.

V. Mechanizmy aktywujące kaskady MAPK

Do niedawna jedynym stosunkowo dobrze poznany był mechanizm prowadzący do aktywacji kaskady ERK. Pod koniec czerwca 1995 r. ukazały się dwie prace [35, 36] wyznaczające główne zarysy mechanizmu aktywującego kaskadę JNK. Nadal niewiele wiadomo o mechanizmach aktywujących kaskady p38/RK i FRK.

Wyżej wspomniano, że do aktywacji kaskady ERK dochodzi w komórkach traktowanych estrami forboleu, co wskazuje na udział w tym procesie kinazy białkowej C. Faktycznie wykazano, że kinaza białkowa C, zarówno *in vitro* jak *in vivo*, jest zdolna do aktywacji białka Raf-1 poprzez bezpośrednią fosforylację [37].

Jest rzeczą ciekawą, że opisano drugi, niezależny od kinazy białkowej C, mechanizm prowadzący do aktywacji białka Raf-1, a tym samym do „włączenia” kaskady ERK. Mechanizmem ten pośredniczy w aktywacji kaskady ERK przez czynniki wzrostowe działające poprzez receptory wykazujące aktywność kinazy tyrozynowej.

Głównym ogniwem omawianego mechanizmu są

białka rodziny Ras, które wraz z białkami rodzin Rab, Arf i Rho tworzą nadrodzinę białek Ras [38, 39]. Wszystkie one zaliczane są do tak zwanych niskocząsteczkowych białek wiążących GTP, określanych też mianem niskocząsteczkowych białek G. Jak wiadomo białka G występują w formie nieaktywnej — związanej z GDP, i w formie aktywnej — związanej z GTP. Aktywację białek G, zachodzącą poprzez wymianę związanego z nimi GDP, na GTP, katalizują specyficzne białka określane jako „białka wymieniające nukleotydy” (ang. *nucleotide exchange protein*). Inaktywacja białek G jest wynikiem hydrolizy GTP, zachodzącej dzięki wykazywanej przez białka G aktywności GTP-azy. Proces ten zachodzi przy współdziałaniu specyficznych białek określanych jako GAP (ang. *GTP-ase Activator Protein*).

Zgodnie z obecnie panującymi poglądami [40-42], aktywacja kaskady ERK przez receptory czynników wzrostowych obejmuje następującą sekwencję zdarzeń: (i) związanie liganda z receptorem prowadzi do aktywacji kinazy tyrozynowej receptora, (ii) skutek autofosforylacji receptor uzyskuje zdolność do wiązania „adaptorowego” białka Grb2, (iii) to ostatnie białko łączy się z cytozolowym białkiem Sos, kotwicząc je przy cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej, (iv) tutaj Sos (będący białkiem wymieniającym nukleotydy guanidynowe) spotyka białko Ras, stale zakotwiczone przy cytoplazmatycznej powierzchni błony, (v) białko Ras, zaktywowane przez białko Sos, wiąże się z białkiem Raf-1 (vi) skutek bezpośredniego oddziaływania z białkiem Ras dochodzi w bliżej nie znany sposób do aktywacji białka Raf-1 [43, 44], co jest równoważne z „włączeniem” kaskady ERK.

Ważną rolę w badaniach prowadzących do rozwikłania wyżej omówionego mechanizmu, a także w badaniach nad mechanizmami aktywacji innych kaskad MAPK [6, 35, 36], odegrało wykorzystanie dwóch różnych typów mutacji białek G.

Pierwszy typ obejmuje mutacje które pozbawiając białka G aktywności GTPazy prowadzą do ich permanentnej aktywności. Ekspresja takiego zmutowanego białka G w badanych komórkach, możliwa w wyniku transfekcji tych komórek odpowiednio skonstruowanym plazmidem, jest wykorzystywana do aktywacji procesów zależnych od danego białka G. Aktywacja taka nie wymaga oczywiście stymulacji komórek czynnikami zewnątrzkomórkowymi. Warto nadmienić, że takie permanentnie aktywne mutanty białek G są znanymi onkogenami.

Drugi typ mutacji, określane jako „dominujący mutant negatywny”, powoduje zwiększone powinowactwo danego białka G do GDP. Tak zmutowane białko nie może zostać zaktywowane przez wymianę GDP na GTP, ale wiąże się z białkiem wymieniającym nukleotydy guanidynowe. Dlatego też ekspresja dominującego mutantu negatywnego białka G prowadzi do wysycenia komórkowej puli odpowiedniego białka wymieniającego nukleotydy guanidynowe i tym sa-

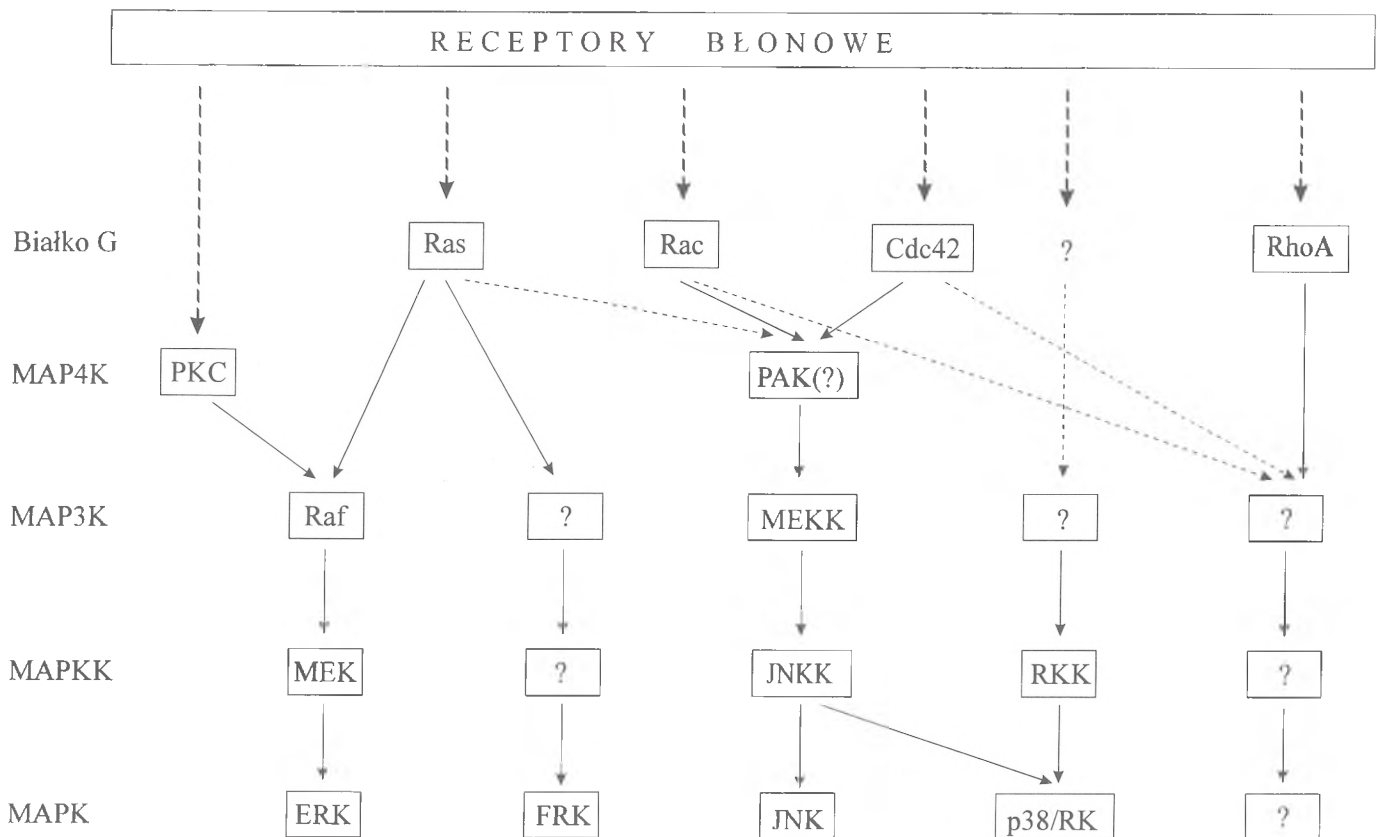
mym hamuje aktywację procesów zależnych od obecnego w komórce niezmutowanego białka G.

Właśnie stosując oba wymienione typy mutantów białka Ras wykazano udział tego białka w aktywacji FRK. Stwierdzono mianowicie, że w komórkach F9 (linia mysich komórek nowotworowych pochodzenia embrionalnego) kinaza ta jest aktywowana przez ekspresję permanentnie aktywnego mutantu białka Ras, natomiast w komórkach A431 (linia ludzkich komórek nowotworowych pochodzenia naskórkowego) aktywacja FRK przez EGF jest całkowicie znoszona przez ekspresję dominującego negatywnego mutantu białka Ras [6].

Podobne doświadczenia wykazały, że w stymulowanych EGF komórkach HeLa (linia ludzkich komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego) aktywacja JNK jest całkowicie znoszona przez ekspresję dominującego negatywnego mutantu białka Ras [35]. W tych samych komórkach ekspresja tak zmutowanego białka Ras nie miała za to większego wpływu na aktywację JNK w odpowiedzi na czynnik martwicy nowotworów (TNF). Wskazywało to, że białko Ras nie pośredniczy w odpowiedzi komórek HeLa na TNF. Ten sam zespół badaczy [35] wykazał dalej, że (i) wywołana przez EGF aktywacja JNK jest częściowo

znoszona przez ekspresję dominującego negatywnego mutantu białka Rac1 należącego do rodziny białek Rho, (ii) ekspresja permanentnie aktywnego mutantu białka Rac1, a także innego przedstawiciela białek Rho, białka Cdc42, prowadzi do aktywacji JNK, (iii) aktywacja JNK przez ekspresję badanych białek Rho jest addytywna z aktywacją wywołaną przez ekspresję permanentnie aktywnego mutantu białka Ras, oraz (iv) ekspresja permanentnie aktywnych białek Rac1 i Cdc42 nie aktywuje ERK. Niezależnie [36] podobne wyniki uzyskano w badaniach wykorzystujących komórki COS-7 (transformowane wirusem SV40 komórki nerki mały), przy czym dodatkowo stwierdzono, że (v) ekspresja dominujących negatywnych mutantów białek Rac1 i Cdc42 częściowo znosi aktywację JNK w komórkach stymulowanych TNF. Ponadto obydwa zespoły stwierdziły, że (vi) białko RhoA (także należące do rodziny białek Rho) nie jest zaangażowane w aktywację kaskady JNK [35, 36].

Omówione w poprzednim akapicie wyniki wskazują więc na udział białek rodziny Rho (Rac1 i Cdc42, ale nie RhoA) w aktywacji kaskady JNK. Jednocześnie obydwa zespoły sugerują, że w odróżnieniu od aktywacji kaskady ERK, gdzie dochodzi do bezpośredniej interakcji białka Ras z białkiem Raf, aktywacja



Ryc. 3 Rola niskocząsteczkowych białek G w aktywacji znanych kaskad MAPK występujących u kręgowców. Obecnie uważa się, że niskocząsteczkowe białka G pośredniczą w aktywacji kaskad MAPK w odpowiedzi na stymulację większości receptorów błonowych, aktywując odpowiednie MAP3K bezpośrednio lub za pośrednictwem MAP4K. Ze względu na stosowaną metodykę badań (patrz rozdział V) powiązania między różnymi receptorami a poszczególnymi białkami G nie są dokładnie poznane i zostały tutaj przedstawione schematycznie jako przerywane pogrubione linie. Ciągłymi i przerywanymi liniami normalnej grubości przedstawiono (odp. główne i alternatywne) drogi prowadzące do aktywacji poszczególnych kinaz MAP. Hipotetycznej kinazy MAP aktywowanej przez szlak zależny od białka RhoA przypisuje się pewną rolę w regulacji ekspresji genu *c-fos* (Ryc. 4). Stosowane skróty uwzględniono w wykazie pod spisem treści.

kaskady JNK nie jest wynikiem bezpośrednim oddziaływania białek Rho z białkiem MEKK. Przypuszcza się raczej, że pośredniczy tutaj białko PAK [45, 46], będące homologiem drożdżowego białka STE20, pełniącego funkcję MAP4K w jednej z drożdżowych kaskad MAPK [32].

Omawiane tutaj zależności między białkami G a kaskadami MAPK zilustrowano na rycinie 3. Funkcje przedstawionej tam hipotetycznej kaskady MAPK aktywowanej przez białko RhoA [7], będą dyskutowane w rozdziale VII.

VI. Czynniki transkrypcyjne jako substraty kinaz MAP

Istnieją dane wskazujące, że ERK fosforyluje białka c-Fos i c-Jun, jednakże, fosforylacja ta prowadzi do obniżenia aktywności czynnika transkrypcyjnego [47, 48]. Podobny efekt ma fosforylacja białka c-Fos przez aktywowaną przez ERK kinazę, określaną jako RSK [47]. Z kolei fosforylowanej przez RSK kinazie syntetazy glikogenu (GSK-3) przypisuje się analogiczną funkcję wobec białka c-Jun [49]. Należy jednak podkreślić, że niewiele wiadomo o znaczeniu fizjologicznym omawianych w tym akapicie procesów.

Wykazano też, że ERK *in vitro* fosforyluje, należące do rodziny Fos, białka Fra-1 i Fra-2, przy czym fosforylacja ta zachodzi w miejscach istotnych dla aktywacji tych czynników *in vivo* [50]. Czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez ERK jest, niewątpliwie, Elk1/TCF [51, 52]. Uważa się, że czynnik ten może być także aktywowany przez JNK [52].

Ta ostatnia kinaza została odkryta jako enzym fosforylujący dwie reszty seryny (Ser63 i Ser73) w białku c-Jun [5, 14-17]. Wykazano, że fosforylacja tych reszt prowadzi do zwiększenia aktywności białka c-Jun jako czynnika transkrypcyjnego. Innym czynnikiem transkrypcyjnym fosforylowanym przez JNK jest ATF-2 [53]. Również w tym przypadku fosforylacja czynnika transkrypcyjnego prowadzi do podniesienia jego aktywności. Warto w tym miejscu zauważyć, że wykazano iż białka c-Jun i ATF-2 mogą tworzyć heterodimer [54]. Jego rolę w regulacji genu *c-jun* omawiamy w następnym rozdziale.

Jedynym obecnie znanym substratem FRK jest białko c-Fos. Fosforylacja tego białka zachodzi na reszcie treoniny (Thr232), znajdującej się w pozycji homologicznej do jednej z reszt seryny (Ser73) fosforylowanej w białku c-Jun przez JNK [6].

Brak jest obecnie danych o czynnikach transkrypcyjnych fosforylowanych przez p38/RK.

VII. Regulacja aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 jako efekt współdziałania różnych kaskad MAPK

Przedstawione w poprzednim rozdziale dane jasno sugerują, że trzy z omawianych kinaz MAP, mianowicie

ERK, JNK i FRK, mogą poprzez bezpośrednią lub pośrednią fosforylację białek c-Fos i c-Jun modulować aktywność czynnika transkrypcyjnego AP-1.

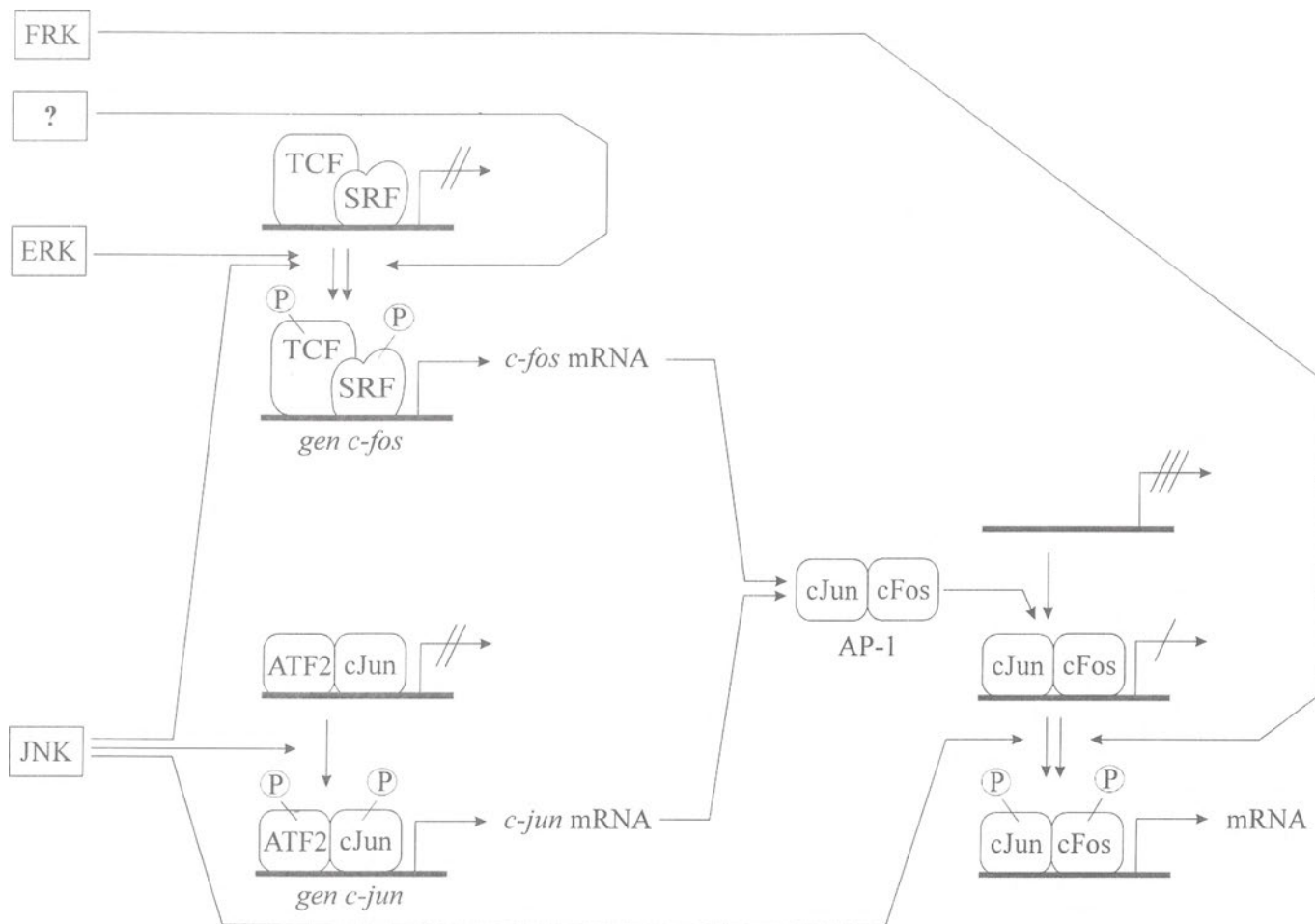
Jednakże wykazano też, że dwie z tych kinaz (ERK i JNK) wpływają z całą pewnością na poziom ekspresji białek c-Fos i c-Jun. Wyżej wspomniano, że substraty JNK, c-Jun i ATF-2, tworzą dimer. Uważa się, że dimer taki związany jest w regionie promotorowym genu *c-jun* i odpowiada za wzmożoną transkrypcję tego genu w odpowiedzi na fosforylację białek c-Jun i ATF-2 [54].

Jednym z ważniejszych elementów regulatorowych genu *c-fos* jest tak zwane miejsce SRE (ang. *Serum Response Element*) rozpoznawane przez specyficzny czynnik transkrypcyjny określaný jako SRF (ang. *Serum Response Factor*) [55]. Czynnikiem ten może wprawdzie sam aktywować transkrypcję, jednak aktywność jego zostaje znacznie zwiększona po utworzeniu kompleksu z czynnikiem określanym jako TCF (ang. *Ternary Complex Factor*) [56]. Jak wspomniano wyżej czynnik Elk1/TCF jest aktywowany przez ERK i JNK [51, 52].

Oczywiście kompleks czynników SRF/TCF może być regulowany również przez modulacje aktywności czynnika SRF. Ostatnio wykazano, że aktywacja czynnika SRF w komórkach stymulowanych występującym w osoczu czynnikiem mitogennym — kwasem lizofosfatydylowym — jest zależna od białek G z rodziny Rho (Rac1, Cdc42, a także RhoA). Udział w tym procesie kolejnej, nowej kinazy MAP uważa się za wysoce prawdopodobny [7].

Omówiony tutaj wpływ kinaz MAP na regulację ekspresji genów *c-fos* i *c-jun* został przedstawiony schematycznie na rycinie 4. Schemat ten uwzględnia również fosforylację białek c-Fos i c-Jun przez FRK i JNK. Chociaż pominięto tam pozostałych przedstawicieli rodzin Fos i Jun (których regulacja przez kinazy MAP nie jest dostatecznie poznana), ze schematu tego jasno wynika, że zarówno poziom, jak i skład podjednostkowy (w tym przypadku proporcja homodimeru c-Jun i heterodimeru c-Jun/c-Fos) a także stopień ufosforylowania czynnika transkrypcyjnego AP-1 są złożoną funkcją aktywności różnych kinaz MAP.

Warto zwrócić uwagę na jeszcze jeden ciekawy problem. Jest oczywiste, że fosforylacja nowopowstałego białka c-Jun jest możliwa jedynie w obecności aktywnej JNK. Tymczasem z porównania ryciny 4. i 2. jasno wynika, że jednocześnie z białkiem c-Jun syntetyzowana jest fosfataza (MKP) inaktywująca kinazy MAP [11, 57]. Względnie wysoka aktywność JNK w obecności MKP może być utrzymana jedynie wtedy gdy wciąż aktywna jest kinaza aktywująca JNK (JNKK). Zdaje się to wskazywać, że dodatkowym czynnikiem regulującym stopień ufosforylowania nowopowstałych czynników transkrypcyjnych może być czas przez jaki utrzymywana jest aktywność odpowiednich kaskad MAPK.



Ryc. 4 Współdziałanie różnych kinaz MAP w regulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 (schemat uproszczony).

Przedstawiając wpływ różnych kinaz MAP na regulację genów *c-fos* i *c-jun* pominięto większość miejsc regulatorowych występujących w promotorach tych genów. Uwzględniono jedynie miejsce regulatorowe SRE genu *c-fos* (złożone z sekwencji rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne SRF i TCF) oraz nietypowe miejsce regulatorowe AP-1 genu *c-jun* (rozpoznawane przez dimer ATF2/c-Jun). Pytajnikiem (?) oznaczono hipotetyczną kinazę MAP aktywowaną przez szlak zależny od białka RhoA (Ryc. 3) i uczestniczącą prawdopodobnie w regulacji ekspresji genu *c-fos* [7]. W prawej części ryciny schematycznie zaznaczono, że — przy braku współdziałania z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, czy też przy niedostatecznym ufosforylowaniu czynnika AP-1 — samo przyłączenie czynnika AP-1 do odpowiedniej sekwencji regulatorowej nie musi automatycznie prowadzić do transkrypcji regulowanego przez nią genu. Poza pokazanym tutaj heterodimerem c-Jun/c-Fos, znane są inne warianty czynnika transkrypcyjnego AP-1. Stosowane skróty uwzględniono w wykazie pod spisem treści.

VIII. Uwagi końcowe

Ogólny schemat kaskady MAPK znany był już od początku lat dziewięćdziesiątych, nie było jednak jasne jak ten pojedynczy szlak może pośredniczyć w przekazywaniu sygnałów między całą paletą różnorodnych receptorów obecnych na powierzchni każdej komórki a równie liczną i zróżnicowaną pulą obecnych w jej jądrze czynników transkrypcyjnych. Przypuszczano wprawdzie, że kaskada MAPK to raczej jakiś ogólny schemat, a nie jeden konkretny szlak, jednakże dopiero odkrycie, a właściwie sklonowanie, JNK zmieniło to przypuszczenie w pewność.

Chociaż postępu badań który dokonał się w ciągu ostatnich dwóch lat, nie sposób nie doceniać, warto uzmysłowić sobie, że jest to dopiero początek drogi do zadowalającego poznania wzajemnych relacji między różnymi receptorami błonowymi i różnymi kaskadami MAPK oraz różnymi kaskadami MAPK i różnymi czynnikami transkrypcyjnymi.

Zauważmy chociażby, że samo wyjaśnienie regulacji

aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 wymaga szczegółowej znajomości mechanizmów regulujących ekspresję trzech genów *jun* i czterech genów *fos*. Ekspresja tych genów prowadzi do powstania osiemnastu możliwych podstawowych wariantów czynnika AP-1 i znacznie większej liczby wariantów różniących się stopniem fosforylacji.

Podziękowania

Autor niniejszej pracy składa serdeczne podziękowania Panu doc. dr hab. Leszkowi Kaczmarskiemu za wszechstronną opiekę oraz Pani Ewie Kublik za pomoc w wykonaniu rycin.

Artykuł otrzymano 24 listopada 1995 r.
Zaakceptowano do druku 20 marca 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Angel P, Karin M (1991) *Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-157
2. Karin M (1995) *J Biol Chem* **270**: 16483-16486

3. Davis RJ (1994) *Trends Biochem Sci* 19: 470-473
4. Cano E, Mahadevan LC (1995) *Trends Biochem Sci* 20: 117-122
5. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993) *Genes Dev* 7: 2135-2148
6. Deng T, Karin M (1994) *Nature (lond)* 371: 171-175
7. Hill CS, Wynne J, Treisman R (1995) *Cell* 81: 1159-1170
8. Serger R, Krebs EG (1995) *FASEB J* 9: 726-735
9. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J (1992) *Mol Cell Biol* 12: 915-927
10. Alessi DR, Gomez NM, Moorhead G, Lewis T, Keyse SM, Cohen P (1995) *Current Biology* 5: 283-295
11. Liu Y, Gorospe M, Yang C, Holobrook NJ (1995) *J Biol Chem* 270: 8377-8380
12. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) *Science* 246: 64-67
13. Ray LB, Sturgill TW (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1502-1506
14. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) *Cell* 76: 1025-1037
15. Sluss HK, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1994) *Mol Cell Biol* 14: 8376-8384
16. Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis RJ, Karin M (1994) *Gen Dev* 8: 2996-3007
17. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) *Nature (lond)* 369: 156-160
18. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) *Science* 265: 808-811
19. Han J, Richter B, Li Z, Kravchenko V, Ulevitch RJ (1995) *Biochim Biophys Acta* 1265: 224-227
20. Rouse J, Cohen P, Tringon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994) *Cell* 78: 1024-1037
21. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (1992) *Science* 258: 478-480
22. Lin A, Minden A, Maartinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL, Karin M (1995) *Science* 268: 286-290
23. Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM, Zon LI (1994) *Nature (Lond)* 372: 794-798
24. Yau M, Dai T, Deak JC, Kyriakis JM, Zou LI, Woodgett JR, Templeton DJ (1994) *Nature (Lond)* 372: 798-800
25. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) *Science* 267: 682-685
26. Zheng CF, Guan KL (1994) *EMBO J* 13: 1123-1131
27. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992) *Nature (lond)* 358: 417-421
28. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marschal CJ, Cowley S (1994) *EMBO J* 13: 1610-1619
29. Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Derijard B, Davis RJ, Johnson GL, Karin M (1994) *Science* 266: 1719-1723
30. Stokoe D, Campbell DG, Nakielnny S, Hidaka H, Leever SJ, Marshall C, Cohen P (1992) *EMBO J* 11: 3985-3994
31. Alcorta DA, Crews CM, Sweet LJ, Bankston L, SW, Erikson RL (1989) *Mol Cell Biol* 9: 3850-3859
32. Herskowitz I (1995) *Cell* 80: 187-197
33. Cano E, Hazzalin CA, Mahadevan LC (1994) *Mol Cell Biol* 14: 7352-7362
34. Mitchell FM, Russell M, Johnson GL (1995) *Biochem J* 309: 381-384
35. Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M (1995) *Cell* 81: 1147-1157
36. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS (1995) *Cell* 81: 1137-1146
37. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR (1993) *Nature (Lond)* 364: 249-252
38. Hall A (1993) *Curr Opin Cell Biol* 5: 265-268
39. Bokoch GM, Der CJ (1993) *FASEB J* 7: 750-759
40. Egan SE, Weinberg RL (1993) *Nature (lond)* 365: 781-783
41. Buday L, Downward J (1993) *Cell* 73: 611-620
42. Aronheim A, Engleberg D, Li N, Al-Alawi N, Schlessinger J, Karin M (1994) *Cell* 78: 949-961
43. Leever SJ, Paterson HF, Marshall CJ (1994) *Nature (lond)* 369: 411-414
44. Stokoe D, MacDonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF (1994) *Science* 264: 1463-1467
45. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim M (1994) *Nature (lond)* 367: 40-46
46. Martin GA, Bollag G, McCormick F, Abo A (1995) *EMBO J* 14: 1970-1978
47. Chen RH, Abate C, Blenis J (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10952-10956
48. Minden A, Lin A, Smeal T, Derijard B, Cobb M, Davis R, Karin M (1994) *Mol Cell Biol* 14: 6683-6688
49. Sutherland C, Cohen P (1994) *FEBS Lett* 338: 37-42
50. Gruda MC, Kovary K, Metz R, Bravo R (1994) *Oncogene* 9: 2537-2547
51. Gille H, Kortjenann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE (1995) *EMBO J* 14: 951-962
52. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ (1995) *Science* 269: 403-407
53. Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ (1995) *Science* 267: 389-393
54. van Dam H, Duyndam M, Rottier R, Bosch A, de Vries-Smits L, Herrlich P, Zantema A, Angel P, van der Eb AJ (1993) *EMBO J* 12: 479-487
55. Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R (1988) *Cell* 55: 989-1003
56. Treisman R (1994) *Curr Opin Genet Dev* 4: 96-101
57. Brondello JM, McKenzie FR, Sun H, Tonks NK, Pouyssegur J (1995) *Oncogene* 10: 1895-1904



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

Molekularne podstawy cytoplazmatycznej męskosterylności u roślin wyższych

Molecular basis of cytoplasmic male sterility in higher plants

HANNA JAŃSKA¹
MAGDALENA WOŁOSZYŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Organizacja genomu mitochondrialnego
- III. Charakterystyka zmian towarzyszących CMS
- III-1. Zmiany w organizacji genomu mitochondrialnego
- III-2. Zmiany w ekspresji
- IV. Geny przywracające płodność
- V. Funkcja i lokalizacja URF13
- VI. Zastosowanie w hodowli
- VII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: CMS — cytoplazmatyczna męskosterylność; kp — tysiąc par zasad; mtDNA — mitochondrialny DNA; urf, orf — otwarta ramka odczytu; *cox I*, *cox II* — geny kodujące odpowiednio podjednostkę I, II mitochondrialnego kompleksu oksydazy cytochromowej; *rrn26* — gen kodujący 26S rybosomalny RNA; *trnR* (tRNA^{Arg}) — gen kodujący RNA transportujący argininę; kDa — kilodalton; *Rf* — gen przywracający płodność; *atp6* — gen kodujący podjednostkę 6 mitochondrialnej syntazy ATP; URF 13 — białko kodowane przez gen *urf13* występujący w linii CMS-T kukurydzy; HmT — *Helminthosporium maydis* szczep T; Pm — *Phyllosticta maydis*.

I. Wstęp

Informacja genetyczna komórek roślinnych jest podzielona między jądro, mitochondria i chloroplasty, a prawidłowe funkcjonowanie rośliny wymaga współdziałania produktów genów pochodzących z tych organelli. Zaburzenie interakcji jądra i mitochondriów jest przyczyną cytoplazmatycznej męskosterylności (CMS) u roślin wyższych. Najogólniej cechę tę można określić jako niezdolność rośliny do wytwarzania funkcjonalnego pyłku, a więc do zapylenia [1-3]. Rozwój pyłku może być zaburzony na różnych etapach. W większości przypadków morfologia roślin sterylnych jest normalna, a jedynie mikrosporogeneza jest nieprawidłowa [1, 4]. Często związane jest to z niewłaściwym funkcjonowaniem tapetum [1, 5] — tkanki pełniącej odżywczą funkcję w rozwoju pyłku [6]. Rzadziej rośliny sterylne nie wytwarzają pyłku z powodu zmienionej morfologii kwiatu. W kwiatach

Contents:

- I. Introduction
- II. Organization of mitochondrial genome
- III. Characterization of changes associated with CMS
- III-1. Changes in mitochondrial genome organization
- III-2. Changes in expression
- IV. Fertility restorer genes
- V. Function and localization URF13
- VI. Application in breeding
- VII. Concluding remarks

sterylnego tytoniu (*Nicotiana*) pręciki nie powstają lub są przekształcane w struktury podobne do płatków albo słupka [7]. W rzadkich przypadkach wytworzony pyłek nie jest zdolny do zapylenia [3]. Cytoplazmatyczną męskosterylność zaobserwowano u ponad 140 roślin kwiatowych. Sterylne osobniki pojawiają się niekiedy spontanicznie w populacji roślin, ale większość otrzymano w rezultacie krzyżowań wewnątrzgatunkowych, międzygatunkowych oraz międzyrodzajowych. Krzyżowanie międzygatunkowe prowadzące do alloplazmii, czyli umieszczenia jądra komórkowego jednego gatunku w środowisku cytoplazmy innego gatunku, jest źródłem 3/4 znanych fenotypów CMS.

Nazwa cytoplazmatyczna męskosterylność nawiązuje do pozajądrowego, matecznego dziedziczenia w odróżnieniu od męskosterylności warunkowanej przez genom jądrowy nazywanej jądrową lub Mendelowską męskosterylnością (MST) [3]. Uważa się, że mutacje w genomie mitochondrialnym, a nie chloroplastowym, są przyczyną cytoplazmatycznej męskosterylności [1]. Fenotypowe zmiany będące rezultatem tych mutacji są jednak obserwowane tylko w obecności odpowiedniego genomu jądrowego. Jeśli genom jądrowy zawiera specyficzne restorery (geny przywracające płodność) to roślina mimo mutacji w genomie mitochondrialnym jest płodna. Obecność restorerów nie jest warunkiem koniecznym do tego, aby rośliny z niezmutowanym genomem mitochondrialnym stały się płodne. Okazało się, że różne typy CMS (powodowane przez inny rodzaj mutacji w genomie mitochondrialnym) wymagają różnych genów przywracających płodność [8]. W niektórych przypadkach niezbędna

¹ Dr, ² mgr, Instytut Biochemii, UW, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

jest obecność nawet więcej niż jednego genu do odzyskania płodności [8, 9]. Zazwyczaj wpływ restorerów nie jest trwały — rośliny ponownie stają się sterylne, gdy usuniemy te geny poprzez odpowiednie krzyżowanie. Sugeruje się, że geny przywracające płodność uczestniczą w posttranskrypcyjnej i/lub posttranslacyjnej regulacji ekspresji genów związanych z cechą CMS.

Męskosterylne rośliny są cennym materiałem genetycznym nie tylko do badania oddziaływań między mitochondrium a jądrem, ale również odgrywają istotną rolę w produkcji nasion mieszańcowych.

II. Organizacja genomu mitochondrialnego

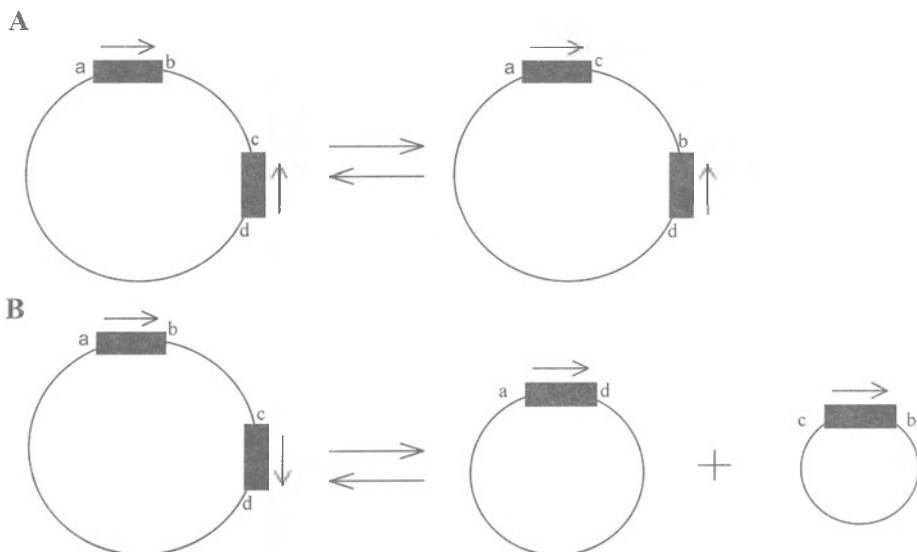
Genomy mitochondrialne roślin należą do największych wśród dotychczas poznanych. Ich wielkość waha się od 200 kpz [10] do 2500 kpz [11]. Dla porównania genom mitochondrialny ssaków ma wielkość około 15 kpz, a drożdży 75 kpz [12]. Innymi słowy najmniejszy genom mitochondrialny roślin wyższych jest ponad 10 razy większy od genomu mitochondrialnego człowieka, a największy jest wielkości połowy chromosomu *E. coli*. Zróżnicowanie wielkości wykryto nawet u roślin blisko spokrewnionych. Na przykład mtDNA arbuza (330 kpz) jest ponad siedmiokrotnie mniejszy od mtDNA melona (2500 kpz) [11]. Jak dotychczas nie znaleziono racjonalnego wytłumaczenia tak dużych różnic w rozmiarach mitochondrialnego DNA.

Mimo badań trwających już ponad pół wieku, organizacja roślinnego genomu mitochondrialnego jest ciągle kontrowersyjna. Nadal nie wiadomo, czy mitochondrialne DNA występuje w formie kolistej, czy liniowej [13, 14]. Kontrowersje dotyczą również ilości niezależnie replikujących się cząsteczek DNA (chromosomów) [15-18]. Według klasycznej teorii, mitochondrialny genom roślin wyższych składa się z wielu kolistych cząsteczek o różnej wielkości. Największa z nich, zwana chromosomem głównym (ang. *master chromosome*), zawiera całą informację genetyczną genomu i jest jedyną cząsteczką mtDNA zdolną do

replikacji [19, 20]. Pozostałe cząsteczki są produktami rekombinacji homologicznych zachodzących między dużymi sekwencjami powtórzonymi chromosomu głównego (ang. *large repeated sequence*) [21, 22]. Duże jednostki powtórzone są to sekwencje nukleotydowe długości 1-14 kpz występujące przeważnie w dwóch trzech kopiach. W zależności od wzajemnej orientacji sekwencji powtórzonych powstają formy izomeryczne (Ryc. 1A) lub cząsteczki koliste o innej wielkości (Ryc. 1B). Zdaniem badaczy tego zjawiska rekombinacja homologiczna dużych sekwencji powtórzonych jest procesem odwracalnym, a uczestniczące w niej cząsteczki mtDNA są w stanie równowagi dynamicznej. Liczba, układ i orientacja dużych sekwencji powtórzonych określa złożoność mitochondrialnego genomu [22-24].

Roślinne genomy mitochondrialne zawierają również małe sekwencje powtórzone (ang. *small repeated sequence*) o długości 10-1000 pz. [25]. Rekombinacje zachodzą między nimi rzadko i są źródłem nowych struktur. Tak powstałe cząsteczki DNA występują w niskim stężeniu, ale mogą być w trakcie ewolucji amplifikowane, co doprowadza do zmiany struktury genomu [26, 27]. Nieodwracalność rekombinacji małych sekwencji powtórzonych jest przypuszczalnie spowodowana ograniczonym prawdopodobieństwem ich ponownego połączenia się ze względu na wielkość tych sekwencji. Uważa się, że często obserwowane u roślin duplikacje i delecje fragmentów mitochondrialnego DNA są konsekwencją rekombinacji między małymi sekwencjami powtórzonymi [25-27].

W przeciwieństwie do ogromnej zmienności strukturalnej, genomy mitochondrialne roślin wyższych wykazują małe zróżnicowanie sekwencji nukleotydowych [28]. Nawet u blisko spokrewnionych gatunków roślin obserwuje się różną kolejność genów w mtDNA, pomimo że sekwencje nukleotydowe tych genów są konserwatywne. Geny mogą być prostymi ramkami odczytu bądź zawierać introny [29]. Rezultatem częstych rekombinacji są geny chimeralne składające się z fragmentów DNA pierwotnie nie sąsiadujących ze



Ryc. 1 Rekombinacja homologiczna dużych sekwencji powtórzonych zlokalizowanych w kolistej cząsteczce DNA mitochondrialnego.

A. Produktem rekombinacji dużych sekwencji powtórzonych o przeciwnej orientacji (ang. *inverted repeat*) jest izomeryczna forma, w której nastąpiła inwersja fragmentu b-c.
B. Produktami rekombinacji dużych sekwencji powtórzonych o tej samej orientacji (ang. *direct repeat*) są dwie kolisty cząsteczki DNA zwane subgenomowymi (ang. *subgenomic circles*).

sobą, geny te mogą również zawierać sekwencje o nieznanym pochodzeniu [24]. W DNA genomu mitochondrialnego roślin zidentyfikowano regiony homologiczne z DNA chloroplastowym i jądrowym [30, 31]. Sądzi się, że obecność tych fragmentów jest wynikiem przenoszenia informacji genetycznej pomiędzy organelami w czasie ewolucji.

Mitochondria niektórych roślin mogą zawierać, specyficzne dla gatunku, liniowe i koliste plazmidy oraz dwuniciowe cząsteczki RNA [2, 32, 33]. W niektórych przypadkach próbowano skorelować obecność tych cząsteczek z cechą cytoplazmatycznej męskosterylności. Mimo że zaobserwowano więcej plazmidów w liniach roślin męskosterylnych niż w liniach roślin płodnych, ich związek z CMS nie jest potwierdzony.

III. Charakterystyka zmian towarzyszących CMS

Mitochondrialny genom roślin jest zbyt duży, aby można było lokalizować w nim zmiany specyficzne dla linii męskosterylnych poprzez sekwencjonowanie. Dlatego najczęściej identyfikuje się zmutowane regiony, porównując profile restrykcyjne (podrozdział III-1), transkrypcyjne czy polipeptydowe (podrozdział III-2) roślin sterylnych z płodnymi. W przypadku niektórych gatunków roślin porównano takie profile właściwe dla okazów płodnych i sterylnych somatycznych hybrydów [34, 35]. Nie każda zaobserwowana różnica w profilach musi wskazywać na gen, transkrypt lub białko odpowiedzialne za pojawienie się męskosterylności. Jest to spowodowane zróżnicowaniem organizacji mitochondrialnego genomu roślin wyższych, nawet w obrębie tego samego gatunku. Poszukuje się zatem roślin jak najbliższej spokrewnionych, aby zminimalizować ilość różnic nie związanych ze sterylnością. Dlatego cennym materiałem są rewertanty pojawiające się czasami spontanicznie wśród roślin sterylnych. W badaniach nad CMS wykorzystuje się również rośliny będące rezultatem krzyżówek linii CMS z linią, której genom jądrowy różni się tylko obecnością genów przywracających płodność. Rośliny te odzyskały płodność, czyli nie mogą zawierać transkryptów bądź białek powodujących wystąpienie cytoplazmatycznej męskosterylności lub zawierają ich mniej.

III-1. Zmiany w organizacji genomu mitochondrialnego

Fragmenty genomu mitochondrialnego charakterystyczne dla CMS można identyfikować, porównując wzory restrykcyjne mtDNA linii sterylnych i płodnych. Izolacja czystego mtDNA jest często trudna i pracochłonna, dlatego najczęściej do wykrycia różnic struktury genomu mitochondrialnego linii sterylnych i płodnych stosuje się hybrydyzację sond mitochondrial-

nych z całkowitym DNA komórkowym strawionym enzymami restrykcyjnymi [36-39]. Jako sondy często stosowane są heterologiczne geny mitochondrialne. Metoda ta jest również używana do odróżniania typów CMS w obrębie jednego gatunku [40, 41]. Najpełniejszych jednak danych o zmianach w organizacji genomu mitochondrialnego dostarcza porównanie map fizycznych mtDNA (kolejności fragmentów restrykcyjnych w genomie) linii płodnych i sterylnych [16, 34, 42-44].

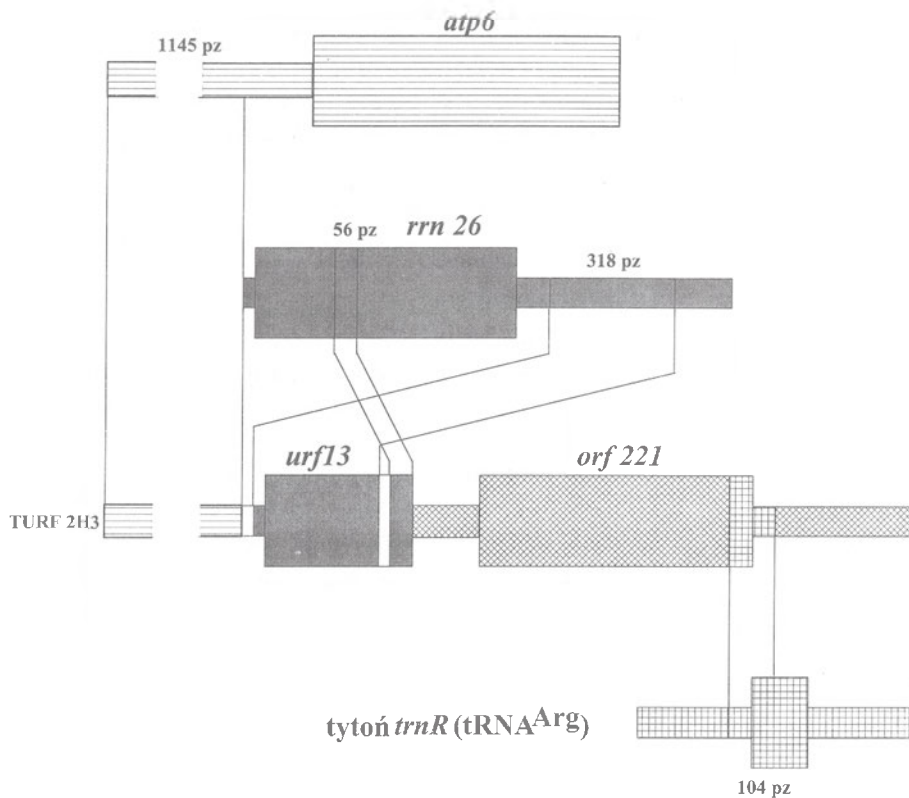
Zidentyfikowane regiony genomu mitochondrialnego specyficzne dla linii męskosterylnych bardzo często zawierają unikalne geny chimeralne, w których powstawaniu biorą udział wielokrotne rekombinacje. Geny chimeralne odkryto w mtDNA kukurydzy typu T-CMS (*urf13*) [1, 9], fasoli zwykłej (*pvs*) [4, 45], słonecznika (*orfH522*) [46], hybrydach petunii (*pcf*) [1, 47]. Dwa typy CMS rzepaku zawierają dwa różne geny chimeralne — *orf138* jest charakterystyczny dla typu Ogura [35], a *pol-urf* dla typu polima [44].

W innych przypadkach okazało się, że regiony skorelowane z cechą CMS zawierają zmutowane geny mitochondrialne. Rearanżacje sekwencji nukleotydowych mogą występować w regionie kodującym genu (np. *cox I* sorgo [48]) lub w 5' i 3' sekwencjach flankujących (np. 5' flankujący region genu *cox II* buraka cukrowego [49], 3' flankująca sekwencja *atp6* u ryżu [50]).






Poniżej dokładnie opisano region charakterystyczny dla CMS typu T kukurydzy — najlepiej poznanego systemu cytoplazmatycznej męskosterylności na poziomie molekularnym (Ryc. 2). Region ten zawiera dwie ramki odczytu: *urf13* i *orf221* (poprzednia nazwa *orf25*) [1, 9]. Gen *urf13* jest chimeralny i składa się z fragmentów 3' sekwencji flankującej i kodującej genu *rrn26* oraz fragmentu o nieznanym pochodzeniu. Jest unikalny — występuje tylko u męskosterylności typu T kukurydzy. W kierunku 3' w stosunku do chimeralnego genu znajduje się gen *orf221*, normalny mitochondrialny gen zawierający fragment sekwencji chloroplastowego genu *trnR* (tRNA^{Arg}) [51]. Obie ramki odczytu są regulowane przez tę samą sekwencję homologiczną do regionu regulatorowego *atp6*. Uważa się, że przynajmniej 7 zdarzeń rekombinacyjnych brało udział w tworzeniu regionu skorelowanego z męskosterylnością u kukurydzy. W pobliżu tego regionu znajduje się rekombinacyjnie aktywna sekwencja powtórzona. Jej bliskie położenie może być przypadkowe bądź odzwierciedlać jej udział w powstawaniu locus CMS. Regiony mtDNA powiązane z cechą cytoplazmatycznej męskosterylności u petunii i fasoli zwykłej również są zlokalizowane w pobliżu długich jednostek rekombinacyjnych [16, 18].

III-2. Zmiany w ekspresji

Przedstawione w poprzednim podrozdziale wyniki badań dotyczyły różnic w organizacji mitochondrial-



Ryc. 2 Struktura regionu mtDNA skorelowanego z CMS typu T kukurydzy (TURF 2H3). Duże prostokąty reprezentują otwarte ramki odczytu. Pierwsze 1145 par zasad tego regionu jest homologiczne do 5' sekwencji flankującej *atp6*. Gen chimeralny *urf13* złożony jest z fragmentów 3' sekwencji flankującej i kodującej *rrn26*. *Orf221* jest normalnym genem mitochondrialnym zawierającym sekwencję homologiczną z odpowiednią sekwencją chloroplastowego genu *trnR* pochodzącego z tytoniu. Wg [1] zmodyfikowano.

-  sekwencja *atp6*
-  sekwencja *rrn26*
-  sekwencja o nieznanym pochodzeniu
-  sekwencja *orf221*
-  sekwencja chloroplastowego *trnR* tytoniu

nego DNA roślin sterylnych i płodnych. Badania porównawcze prowadzi się również nad ekspresją genomu mitochondrialnego. Transkrypty pojedynczego genu mitochondrialnego roślin często różnią się pod względem wielkości [32, 52]. Jest to konsekwencją wielu miejsc inicjacji i terminacji w procesie transkrypcji oraz zjawisk posttranskrypcyjnych. Transkrypty genów chimeralnych czy zmutowanych genów mitochondrialnych skorelowanych z cytoplazmatyczną męskosterylnością wykazują również taką heterogenność. Geny chimeralne są często kotranskrybowane z jednym [46, 53-56] lub wieloma normalnymi genami mitochondrialnymi [1, 57]. Opisane różnice wzorów transkrypcyjnych roślin sterylnych i płodnych dotyczą pojawienia się u roślin sterylnych specyficznych transkryptów [9, 35, 36, 38, 39, 53, 58, 59]. Dalsze badania niekiedy ujawniają, że niektóre zaobserwowane specyficzne transkrypty nie mają związku z cytoplazmatyczną męskosterylnością [58, 60]. Bliższych informacji o transkryptach odpowiedzialnych za sterylność dostarczają porównania map transkrypcyjnych roślin sterylnych z roślinami o takim samym genomie mitochondrialnym, ale płodnych dzięki obecności restorów w genomie jądrowym (rozdział IV).

Ostatnio opublikowano kilka prac sugerujących, że zaburzenia procesu redagowania (ang. *editing*) [50, 61, 62] lub składania RNA (ang. *splicing*) [53] mogą być przyczyną CMS. Jeden z takich przypadków przedstawimy w rozdziale IV. Zmiany na poziomie transkrypcji zostały opisane u wielu gatunków roślin, ale tylko w kilku przypadkach zidentyfikowano białka unikalne dla roślin sterylnych. Dwie metody badawcze umożliwiają taką identyfikację. Jedna z nich opiera się na porównaniu białek powstających w obecności ra-

dioaktywnych aminokwasów w mitochondriach izolowanych ze sterylnych i płodnych roślin. Druga metoda wykorzystuje przeciwciała skierowane przeciw syntetycznemu peptydowi skonstruowanemu na podstawie sekwencji genu skorelowanego z męskosterylnością. Stosując te metody, najwcześniej wykryto białko URF13 o masie 13 kDa, występujące tylko w CMS typu T kukurydzy [1, 63]. Podobne badania umożliwiły rozpoznanie produktów genów chimeralnych u petunii (gen *pcf*, białko o masie 25 kDa) [1, 64], u rzodkiewki (*orf138*, białko o masie 20 kDa) [65], u pszenicy (*orf256*, białko o masie 7 kDa) [66] i u słonecznika (*orfC*, białko o masie 15 kDa) [67, 68]. Cechą wspólną tych białek jest ich lokalizacja w błonie mitochondrialnej. Jednak sposób ich połączenia z błoną jest najprawdopodobniej różny [1].

IV. Geny przywracające płodność

Jak już wspomniano, fenotypowe ujawnienie się mitochondrialnej mutacji odpowiedzialnej za CMS jest uzależnione od jądrowej informacji genetycznej. Z badań wynika, że większość genów jądrowych przywracających płodność działa posttranskrypcyjnie i/lub posttranslacyjnie [1-3]. Powodują one zmiany lokalizacji końców transkryptów regionów skorelowanych z cechą CMS [69, 70] i/lub inne stosunki ilościowe między transkryptami [57]. W konsekwencji obserwuje się obniżenie ilości [64, 65, 71] lub brak [66] białek charakterystycznych dla cytoplazm męskosterylnych. Stwierdzono, że redukcja poziomu tych białek może zachodzić tylko w pewnych częściach rośliny, na przykład w tkance rozrodczej fasoli zwykłej [71], w kwiatach i liściach rzodkiewki [65]. Ciągłe

jednak bardzo mało wiadomo o mechanizmach opisanych zmian. Niedawno, próbując wyjaśnić działanie genu *Rf-1* w procesie przywracania płodności u ryżu zaproponowano hipotezę [50], zgodnie z którą gen ten koduje enzym uczestniczący w dojrzewaniu prekursora mtRNA jednej z kopii genu *atp6*. Kopia ta jest obecna wyłącznie w mitochondriach roślin sterylnych. Badania wykazały, że tylko mtRNA powstały w wyniku działania tego enzymu może być efektywnie redagowany, tak aby następnie mógł stanowić matrycę do syntezy funkcjonalnego białka. Pod nieobecność restorera nieprzekształcony transkrypt nie jest prawidłowo redagowany, a syntetyzowane białko jest zmienione i zaburza dojrzewanie pyłku przez obniżenie aktywności ATPazowej.

Wśród restorerów wyjątkowym działaniem charakteryzuje się jeden z jądrowych genów przywracających płodność męskosterylnej linii fasoli zwykłej [72, 73]. Powoduje on usunięcie regionu mtDNA odpowiedzialnego za sterlność poprzez eliminację cząsteczki zawierającej ten region [16]. W związku z tym, nawet po jego usunięciu, kolejne pokolenia roślin są płodne. Z ostatnich badań wynika, że zmiana struktury genu mitochondrialnego kierowana tym genem zachodzi w czasie rozwoju kwiatu, jest zależna od ekspresji regionu CMS oraz wymaga dwóch alleli dominujących do trwałego przywrócenia płodności [74].

Obecnie trwają badania nad lokalizacją genów restorerów [8, 75], ale żaden z nich nie został jak dotąd sklonowany i zsekwencjonowany.

V. Lokalizacja i funkcja URF13

Białko URF13 jest odpowiedzialne nie tylko za CMS typu T u kukurydzy, ale również za jej wrażliwość na grzybowe toksyny HmT i Pm oraz ich funkcjonalny analog — środek owadobójczy metomyl [76]. Działanie toksyn i metomyłu powoduje pęcznienie mitochondriów, rozprzęgnięcie fosforylacji oksydacyjnej, zahamowanie oddychania, zwiększenie przepuszczalności błony, co w konsekwencji doprowadza do masowego „przecieku” jonów. Objawów tych nie obserwowano w mitochondriach roślin płodnych.

Brak efektywnego sposobu transformacji kukurydzy spowodował zastosowanie innych organizmów do badania roli URF13. Transformacja *E. coli* potwierdziła jego błonową lokalizację i odpowiedzialność za wrażliwość na toksyny i metomyl [77]. Drożdże również stawały się wrażliwe na toksyny i metomyl, ale tylko wtedy gdy produkt translacji zakotwiczał się w błonie wewnętrznej mitochondriów [78, 79]. Dlatego były one transformowane genem chimeralnym złożonym z genu *urf13* i mitochondrialnej sekwencji kierującej. W obecności metomyłu transformanty drożdżowe wykazywały brak aktywności oddechowej. Badania transgenicznego tytoniu pokazały, że produkt genu *urf13* nie musi być związany z błoną mitochondrialną, aby te rośliny wykazywały wrażliwość na

toksyny [3]. Gdy białko URF13 zlokalizowane jest w mitochondriach, staje się toksyczne dla tytoniu.

Prowadzone są również intensywne badania struktury kompleksu URF13 z toksynami (lub metomylem) [80]. Związane z błoną białko jest receptorem toksyn i w wyniku oddziaływania pomiędzy nimi tworzą się hydrofilowe pory w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Mimo ogromnego postępu w zrozumieniu związku białka URF13 z wrażliwością mitochondriów CMS-T kukurydzy na toksyny i metomyl, sposób, w jaki to białko zaburza rozwój pręcików, jest ciągle nieznan. Według hipotezy F l a v e l l a [81] pręciki zawierają organospecyficzne białko oddziałujące z URF13 tak jak grzybowe toksyny i metomyl.

VI. Zastosowanie w hodowli

Męskosterylne rośliny są od dawna wykorzystywane w hodowli odmian mieszańcowych [82, 83]. Otrzymane z nich rośliny przewyższają swoich rodziców wielkością plonów, odpornością na choroby i zmiany środowiskowe. Użycie linii męskosterylnych jako żeńskiego partnera w krzyżówce wyklucza niebezpieczeństwo samozapylenia, dzięki temu nie ma potrzeby ręcznego usuwania pręcików. Bardzo często rośliny pokolenia F1 są również męskosterylne. Nie ma to znaczenia, jeśli produktem ważnym dla hodowcy są tkanki wegetatywne (liście tytoniu, bulwy ziemniaka). Jeśli natomiast rośliny są uprawiane dla nasion, jak w przypadku słonecznika czy kukurydzy, płodność mieszańca jest niezbędna. W takiej sytuacji jako partnera męskiego stosuje się linię zawierającą w swym genomie restorery. Linie CMS po skrzyżowaniu z taką linią dają płodne potomstwo.

Najstarszym sposobem otrzymywania roślin męskosterylnych w hodowli jest krzyżowanie konwencjonalne. Stosuje się również somatyczną hybrydyzację, której celem jest przeniesienie cechy CMS z jednego gatunku do drugiego [3]. W czasie fuzji protoplastów może nastąpić rekombinacja rodzicielskich genomów mitochondrialnych — powstaje wtedy nowy typ genomu. Do takiej rekombinacji nie może dojść w czasie krzyżowania konwencjonalnego, ponieważ roślinie potomnej przekazywany jest wyłącznie genom mitochondrialny linii męskiej. Ostatnio pokazano, że sterlność roślin można wywołać, stosując metody inżynierii genetycznej [2, 83]. Rośliny transformuje się genem zaburzającym rozwój pręcików, którego ekspresja regulowana jest przez promotor aktywny jedynie w tej części rośliny. Rybonukleaza, powstająca wyłącznie w tapetum dzięki specyficznemu dla tej tkanki promotorowi, powodowała męskosterylność transgenicznego tytoniu i rzepaku [84]. Tego samego promotora użyto do ekspresji inhibitora rybonukleazy w innych roślinach transgenicznym działających w krzyżowaniu tak, jak linie przywracające płodność [85]. Stworzono w ten sposób sztuczny system z genem

powodującym sterylność i genem działającym jak restorer.

VII. Uwagi końcowe

Może powstać pytanie, dlaczego defekt mitochondriów, obecnych przecież we wszystkich tkankach rośliny, w sposób specyficzny upośledza pyłek. Fakt ten tłumaczy się wzrostem ilości mitochondriów w czasie rozwoju męskich komórek rozrodczych [86]. Liczba mitochondriów wzrasta wtedy dwudziestokrotnie w tkance sporogenicznej, a w tapetum — aż czterdziestokrotnie. Mutacja w genomie mitochondrialnym może więc mieć o wiele bardziej drastyczne konsekwencje dla rozwoju pyłku niż dla innych procesów nie wymagających tak dużej aktywności mitochondriów [1]. Możliwe jest również, że zwiększenie liczby mitochondriów doprowadza do wzrostu ilości białka mitochondrialnego, które jest toksyczne dla komórek roślinnych. Sugeruje się również, że białka występujące tylko w pręcikach odpowiadają za organospecyficzne ujawnianie się mutacji mitochondrialnej [81].

Mimo niewątpliwego postępu w identyfikacji mitochondrialnych regionów, specyficznych transkryptów i białek związanych z CMS, molekularny mechanizm wywoływania sterylności przez te białka jest ciągle hipotetyczny. Wyjaśnienie jest trudne ze względu na brak bezpośredniej metody transformacji mitochondriów roślinnych. Coraz powszechniej uważa się, że mechanizm ten nie jest uniwersalny, a raczej specyficzny dla każdego typu CMS.

Artykuł otrzymano 5 grudnia 1995 r.

Zaakceptowano do druku 20 marca 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Hanson MR (1991) *Annu Rev Genet* **25**: 461-486
2. Nair CK K (1993) *J Biosci* **18**: 407-422
3. Vedel F, Pla M, Vitart V, Gutierrez S, Chetrit P, De Paepe R (1994) *Plant Physiol Biochem* **32**: 601-618
4. Johns C, Lu M, Lyznik A, Mackenzie S (1992) *Plant Cell* **4**: 435-449
5. Warmke HE, Lee SLJ (1977) *J Hered* **68**: 213-22
6. Tanaka I (1993) *J Plant Res* **106**: 55-63
7. Kofer W, Glimelius K, Bonett HT (1991) *The Plant Cell* **3**: 759-769
8. Wise RP, Schnable PS (1994) *Theor Appl Genet* **88**: 785-795
9. Dewey RE, Levings CS III, Timothy DH (1986) *Cell* **44**: 439-449
10. Palmer JD, Herbon LA (1987) *Curr Genet* **11**: 565-570
11. Ward BL, Anderson RS, Bendich AJ (1981) *Cell* **25**: 792-803
12. Bonen L (1991) *Curr Opin in Genet and Develop* **1**: 515-522
13. Bendich AJ, Smith S (1990) *Curr Genet* **17**: 421-425
14. Bendich AJ (1993) *Curr Genet* **24**: 279-290
15. Yamato Y, Ogura Y, Kanegae T, Yamada Y, Ohyama K (1992) *Theor Appl Genet* **83**: 279-288
16. Janska H, Mackenzie SA (1993) *Genetics* **135**: 869-879
17. Andre CP, Walbot V (1995) *Mol Gen Genet* **247**: 255-263
18. Folkerts O, Hanson MR (1991) *Genetics* **129**: 885-895
19. Palmer JD, Shields CR (1984) *Nature (Lond)* **307**: 437-440
20. Lonsdale DM (1984) *Plant Mol Biol* **3**: 201-206
21. Stern DB, Palmer JD (1984) *Nucleic Acids Res* **12**: 6141-6157
22. Lonsdale DM, Brears T, Hodge TP, Melville SE, Rottmann WH (1988) *Phil Trans R Soc Lond B* **319**: 149-163
23. Conklin P, Hanson M (1993) *Curr Genet* **23**: 477-482
24. Fauron C, Casper M, Gao Y, Moore B (1995) *Trends Genet* **11**: 228-235
25. Andre C, Levy A, Walbot V (1992) *Trends Genet* **8**: 128-132
26. Small ID, Isaac PG, Leaver CJ (1987) *EMBO J* **6**: 865-869
27. Small ID, Suffolk R, Leaver CJ (1989) *Cell* **58**: 69-76
28. Palmer JD, Herbon LA (1988) *J Mol Evol* **28**: 87-97
29. Wissinger B, Brennicke A, Schuster W (1992) *Trends Genet* **8**: 322-328
30. Palmer JD (1990) *Trends Genet* **6**: 115-120
31. Watanabe N, Nakazono M, Kanno A, Tsutsumi N, Atsushi H (1994) *Curr Genet* **26**: 512-518
32. Levings III CS, Brown GG (1989) *Cell* **56**: 171-179
33. Finnegan PM, Brown GG (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5175-5179
34. Folkerts O, Hanson M (1991) *Genetics* **129**: 885-895
35. Bonhomme S, Budar F, Ferault M, Pelletier G (1991) *Curr Genet* **19**: 121-127
36. Dudareva NA, Popovsky AV, Kasjanova UV, Veprev SG, Mglinets AV, Salganik RI (1991) *Theor Appl Genet* **83**: 217-224
37. Holford P, Croft JH, Newbury HJ (1991) *Theor Appl Genet* **82**: 737-744
38. Rouwendal GJA, Creemers-Molenaar J, Krens FA (1992) *Theor Appl Genet* **83**: 330-336
39. Sane AP, Nath P, Sane PV (1994) *J Biosci* **19**: 43-45
40. Saumiton-Laprade P, Rouwendal GJA, Cuguen J, Krens FA, Michaelis G (1993) *Theor Appl Genet* **85**: 529-535
41. Rajeshwari R, Sivaramakrishnan S, Smith RL, Subrahmanyani NC (1994) *Theor Appl Genet* **88**: 441-448
42. Siculella L, Palmer JD (1988) *Nucleic Acid Research* **16**: 3787-3799
43. Fauron C, Havlik M (1989) *Curr Genet* **15**: 149-154
44. L'Homme Y, Brown GG (1993) *Nucleic Acid Research* **21**: 1903-1909
45. Chase CD, Ortega VM (1992) *Curr Genet* **22**: 147-153
46. Kohler RH, Horn R, Lossi A, Zetsche K (1991) *Plant Cell* **3**: 369-376
47. Young EG, Hanson MR (1987) *Cell* **50**: 41-49
48. Bailey-Serres, Hanson DK, Fox TD, Leaver CJ (1986) *Cell* **47**: 567-576
49. Senda M, Dagless E, Hodge R, Paul W, Peterson PA, Saedler H (1991) *Curr Genet* **19**: 175-181
50. Iwabuchi M, Kyojuka J, Shimamoto K (1993) *EMBO J* **12**: 1437-1446
51. Prioli L, Huang J, Levings CS III (1993) *Plant Mol Biol* **23**: 287-295
52. Gray M, Hanic-Joyce PJ, Covello PS (1992) *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* **43**: 145-175
53. Chase CD (1994) *Curr Genet* **25**: 245-251
54. Singh M, Brown G (1993) *Curr Genet* **24**: 316-322
55. Akagi H, Sakamoto M, Shinjo C, Shimada H, Fujimura T (1994) *Curr Genet* **25**: 52-58
56. Song J, Hedgcoth C (1994) *Genome* **37**: 203-209
57. Pruitt KD, Hanson MR (1991) *Mol Gen Genet* **227**: 348-355
58. Makaroff C, Apel IJ, Palmer JD (1991) *Curr Genet* **19**: 183-190
59. Senda M, Harada T, Mikami T, Sugiura M, Kinoshita T (1991) **19**: 175-181
60. Makaroff C, Apel I, Palmer JD (1990) *Plant Mol Biol* **15**: 735-746
61. Hernould M, Suharsono S, Litvak S, Araya A, Mourmas A (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**: 2370-2374
62. Stahl R, Sun S, L'Homme Y, Ketela T, Brown GG (1994) *Nucl Acids Res* **22**: 2109-2113
63. Wise RP, Fliss AE, Pring DR, Gengenbach BG (1987) *Plant Mol Biol* **9**: 121-126
64. Nivison HT, Hanson MR (1989) *Plant Cell* **1**: 1121-1130

65. Krishnasamy S, Makaroff CA (1994) *Plant Mol Biol* 26: 935-946
66. Song J, Hegoth C (1994) *Plant Mol Biol* 26: 535-539
67. Horn R, Rainer HK, Zetsche K (1991) *Plant Mol Biol* 17: 29-36
68. Laver HK, Reynolds SJ, Moneger F, Leaver CJ (1991) *Plant J* 1: 185-193
69. Kennell JC, Pring DR (1989) *Mol Gen Genet* 216: 16-24
70. Singh M, Brown GG (1991) *Plant Cell* 3: 1349-1362
71. Abad A, Mehrtens B, Mackenzie S (1995) *Plant Cell* 7: 271-285
72. Mackenzie S, Pring D, Bassett M, Chase C (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2714-2717
73. Mackenzie S, Chase C (1990) *Plant Cell* 2: 905-912
74. He S, Lyznik A, Mackenzie S (1995) *Genetics* 139: 955-962
75. He S, Yu ZH, Vallejos CE, Mackenzie (1995) *Theor Appl Genet* 90: 7-8
76. Levings CS III, Siedow JN (1992) *Plant Mol Biol* 19: 135-147
77. Dewey RE, Siedow JN, Timothy DH, Levings CS (1988) *Science* 239: 293-295
78. Glab N, Wise RP, Pring DR, Jacq C, Slonimski P (1990) *Mol Gen Genet* 223: 24-32
79. Huang J, Lee SH, Liu C, Medici R, Hack E, Myers AM (1990) *EMBO J* 9: 339-347
80. Rhoads DM, Kaspi CI, Levings CS III, Siedow JN (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8253-8257
81. Flavell R (1975) *Physiol Plant Pathol* 6: 107-116
82. Duvick DN (1959) *Econ Bot* 13: 167-195
83. Rogers HJ, Lonsdale DM (1992) *Plant Growth Regulation* 11: 21-26
84. Mariani C, Beukeleer MD, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990) *Nature (Lond)* 347: 737-741
85. Mariani C, Block MD, Goldberg RB, Greef WD, Leemans J (1992) *Nature (Lond)* 357: 384-387
86. Warmke HE, Lee SL (1978) *Science* 200: 561-63

Rola genomu jądrowego w regulacji funkcjonowania mitochondriów *Saccharomyces cerevisiae*

Nuclear control of mitochondrial functions in *Saccharomyces cerevisiae*

MAGDALENA BOGUTA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mitochondrialny genom *Saccharomyces cerevisiae*
- III. Mutacje mitochondrialne
- IV. Dziedziczenie mitochondriów i mechanizm utrzymywania mtDNA
- V. Replikacja i transkrypcja mtDNA
- VI. Stabilność i obróbka transkryptów mitochondrialnych
- VII. Translacja mitochondrialna
- VIII. Modyfikacja, degradacja i włączanie białek mitochondrialnych w kompleksy
- IX. Mitochondria regulują funkcję jądra komórkowego
- X. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: mt — mitochondrialny; bp — para zasad.

I. Wstęp

Mitochondria są organellami obecnymi w prawie wszystkich komórkach eukariotycznych (wyjątek stanowią eryocyty i niektóre ameby). Podstawową funkcją mitochondriów jest wytwarzanie energii w kaskadzie reakcji utleniania zachodzących w mitochon-

Contents:

- I. Introduction
- II. Mitochondrial genome in yeast
- III. Mitochondrial mutations
- IV. Mitochondrial inheritance and maintenance of mtDNA
- V. Replication and transcription of mtDNA
- VI. RNA stability and splicing
- VII. Mitochondrial translation
- VIII. Modification, assembly and degradation of mitochondrial protein
- IX. Mitochondrial control of nuclear functions
- X. Conclusions

drialnym łańcuchu oddechowym. Warunkiem kompetencji oddechowej komórki eukariotycznej jest ekspresja genomu mitochondrialnego. System organizacji i ekspresji mitochondrialnego DNA jest unikalny z punktu widzenia biologii molekularnej, choć w obrębie różnych eukariotów mtDNA wykazuje wysokie zróżnicowanie wielkości i ilości genów. Ilość informacji genetycznej zawartej w mtDNA jest znikomą małą w porównaniu z informacją pochodzącą z chromosomalnego DNA i dotyczącą funkcji mitochondrialnych. Wysoki stopień złożoności organizacji mtDNA i sprzężenia ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego sugerują, że nawet drobne defekty

* Dr Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Tabela 1.

Testowanie mutacji zmieniających funkcję mitochondriów *S. cerevisiae*.

Typ mutacji	Wzrost na glukozie	Wzrost na glicerolu
typ dziki	+	+
jądrowa, w genie kodującym białko mitochondrialne	+	-
mitochondrialna	+	-
supresor mutacji mitochondrialnej	+	-

genetyczne mogą powodować u organizmów wyższych krytyczne efekty patologiczne. Szybko rośnie dokumentacja molekularna chorób człowieka związanych z mtDNA. Zaburzenia funkcji mitochondrialnych u roślin wyższych, które mogą wynikać z defektów w mtDNA lub nieprawidłowej komunikacji mitochondrium-jądro komórkowe mogą prowadzić do zjawiska męskiej sterility, kluczowego dla produkcji rolnej. Dlatego poznanie molekularnych mechanizmów regulacji funkcjonowania mitochondriów ma też ważne znaczenie praktyczne.

S. cerevisiae jest modelowym organizmem służącym do badań genetyki i funkcji mitochondrialnych gdyż, w odróżnieniu od większości innych organizmów, jest fakultatywnym anaerobem. W praktyce oznacza to, że jeśli oddychanie nie jest możliwe, organizm jest żywotny, gdyż może czerpać energię z procesu fermentacji. Testowanie funkcji mitochondrialnych może się odbywać poprzez proste manipulowanie pożywkami zawierającymi glukozę jako fermentowalne i glicerol lub etanol jako niefermentowalne źródło węgla (Tab. 1).

II. Mitochondrialny genom *Saccharomyces cerevisiae*

DNA mitochondrialny (mtDNA) *S. cerevisiae* jest kolistą cząsteczką o wielkości 74-85 kb, w zależności od szczepu i stanowi 5-15% całkowitego DNA komórkowego [1]. Kołowa mapa mtDNA jest przedstawiona na rycinie 1. Należy jednak pamiętać, że cząsteczki koliste stanowią tylko część populacji mtDNA *S. cerevisiae*, która w warunkach *in vivo* zawiera także długie liniowe konkatamery [2].

Poznano dotychczas sekwencję 92% mtDNA *S. cerevisiae*. Analogicznie jak w mtDNA innych organizmów, w skład mtDNA drożdży wchodzi dwa geny kodujące rRNA, pełen zestaw genów tRNA oraz geny kodujące niektóre podjednostki enzymów oddechowych (Tab. 2). Dwa geny kodujące białka (COB i COXI, patrz Ryc. 1) oraz gen *LSU* kodujący 21S rRNA posiadają introny. Dodatkowe geny, *VARI* i *RPMI*, które nie zawsze mają swoje odpowiedniki w mitochondrialnych genomach innych organizmów, kodują białko Var1p związane z małą podjednostką rybosomów mitochondrialnych oraz RNA wchodzące w skład

mitochondrialnej RNAzy P odpowiedzialnej za obróbkę tRNA. Sekwencjonowanie ujawniło ponadto dwie ramki odczytu, z których jedna, *ENS2*, koduje podjednostkę endonukleazy zaangażowanej w rekombinację mtDNA. Sekwencje intronowe, często w połączeniu z poprzedzającymi eksonami, kodują endonukleazy odpowiedzialne za propagację intronów oraz maturazy wymagane do obróbki mitochondrialnych transkryptów. mtDNA drożdży nie zawiera genów kodujących podjednostki NADH dehydrogenazy, obecnych w większości mtDNA innych organizmów [3].

Charakterystyczną cechą mtDNA drożdży jest niezwykle niska zawartość par GC (18%), które tworzą skupiska. Poszczególne geny są rozdzielone długimi sekwencjami AT o nieznanym celu. Wysoce homologiczne sekwencje bogate w GC o długości 50-100 bp odgrywają prawdopodobnie rolę w procesach rearanżacji mtDNA [4]. Mitochondrialny genom drożdży wykazuje stosunkowo wysoką zmienność ze względu na możliwość tworzenia delekcji o dużym zasięgu [5] oraz duplikacji i transpozycji intronów.

U drożdży, jak też u grzybów nitkowatych, obserwuje się również frapujące zjawisko migracji mtDNA do jądra komórkowego, które prawdopodobnie odgrywa rolę w ewolucji. W genomie jądrowym drożdży zidentyfikowano sekwencje pochodzące z mtDNA [6]. Wędrówkę DNA z mitochondriów do jądra badano eksperymentalnie i zidentyfikowano jądrowy gen *YME1* odpowiedzialny za to zjawisko [7]. Transmisja materiału genetycznego z mtDNA do jądra komórkowego wiąże się z procesem starzenia u *Neurospora crassa*.

Klasyczne metody transformacji są zawodne przy

Tabela 2.

Produkty genów mitochondrialnych *Saccharomyces cerevisiae*.

gen/intron	kodowany produkt
<i>COXI</i>	podjednostka I oksydazy cytochromu c
intron ai1	maturaza ai1
intron ai2	maturaza ai2
intron ai3	endonukleaza ISceIII
intron ai4	endonukleaza ISceII
intron ai5a	endonukleaza ISceIV
intron ai5b	
<i>COX2</i>	podjednostka II oksydazy cytochromu c
<i>COX3</i>	podjednostka III oksydazy cytochromu c
<i>ATP6</i>	podjednostka VI ATPazy
<i>ATP8</i>	podjednostka VIII ATPazy
<i>ATP9</i>	podjednostka IX ATPazy
<i>COB</i>	cytochrom b
intron bi2	maturaza bi2
intron bi3	maturaza bi3
intron bi4	maturaza bi4
<i>VARI</i>	białko rybosomalne
<i>ENS2</i>	endonukleaza
<i>RF1, RF2</i>	?
<i>LSU</i>	rybosomalny RNA 21S
intron ω	endonukleaza ISceI
<i>SSU</i>	rybosomalny RNA 15S
<i>RPMI</i>	składnik RNA mt RNAzy P
25 genów tRNA	komplet mt tRNA

wprowadzaniu DNA do mitochondriów. Sukces osiągnięto bombardując komórki cząstkami metali pokrytymi DNA. Udało się w ten sposób wprowadzić do mitochondriów fragmenty mtDNA, które były stabilne i ulegały replikacji [8, 9].

III. Mutacje mitochondrialne

Wspólną cechą mutantów mitochondrialnych *S. cerevisiae* jest brak zdolności do wzrostu na pożywce zawierającej niefermentowalne źródło węgla. Wyróżnia się trzy podstawowe typy mutacji związanych z defektami oddechowymi: *mit⁻*, *rho⁻* i *rho⁰*. Mutacje *mit⁻* są to mutacje punktowe lub małe delecje w genach kodujących białka wchodzące w skład enzymów oddechowych. Zasadniczo efektem mutacji *mit⁻* jest brak syntezy lub aktywności pojedynczego białka. Mutacje *mit⁻* w intronach mitochondrialnych mogą mieć bardziej skomplikowane fenotypy [10].

Mutacje *rho⁻* zwane petite, są ogromnymi delecjami obejmującymi co najmniej 50% całej cząsteczki mtDNA. Zachowany odcinek ulega kompensacyjnej amplifikacji, prowadzącej w efekcie do odtworzenia cząsteczki mtDNA o wielkości odpowiadającej mtDNA szczepu dzikiego. Fragmenty mtDNA zachowane u mutantów *rho⁻* są wiernie replikowane, choć nie muszą zawierać miejsc inicjacji replikacji [11]. mtDNA może być także całkowicie wydeletowany i takie szczepy nazywamy *rho⁰*.

Podstawowym problemem, nie do końca rozstrzygniętym przez genetyków, jest segregacja wielokopijnych genomów mitochondrialnych, która nie stosuje się do klasycznych praw Mendla. Jeśli z dwóch komórek o genetycznie różnych mtDNA tworzy się zygota lub jeśli w pojedynczej cząsteczce mtDNA powstaje mutacja to mamy do czynienia z komórką heteroplazmatyczną. Bez względu na to w jaki sposób tworzy się heterogenna populacja mtDNA, obserwuje się szybką segregację mitochondrialnych genomów w czasie kolejnych podziałów i utworzenie populacji homogenicznej [12]. Nie dokładnie wiadomo w jaki sposób określony wariant genomu mt osiąga przewagę selektywną nad całą populacją. Szczególna sytuacja dotyczy heteroplazmatycznego diploida powstałego w wyniku krzyżówki pomiędzy szczepem *rho⁺* i szczepem *rho⁻*. Jeśli sekwencja amplifikowana w mutancie *rho⁻* zawiera jeden z głównych startów replikacji (Ryc. 1), to może zajść sytuacja, że genom *rho⁻* będzie się replikował szybciej niż *rho⁺*. Mamy wtedy do czynienia ze zjawiskiem supresyjności petitów.

Stwierdzono, że mtDNA tworzy w komórce agregaty zwane chondrillami, które można uznać za niezależnie segregujące „jednostki” mtDNA. Skłonność mtDNA do agregacji związana jest z wydajną rekombinacją. Ilość chondrilli zależy od produktu genu *MGT1*, endonukleazy przecinającej złącza rekombinacyjnych struktur DNA. Inaktywacja genu *MGT1* powoduje zmniejszenie ilości chondrilli, a co za tym idzie

zwiększenie wydajności rekombinacji i zmniejszenie ilości podziałów wymaganych do osiągnięcia homogenicznej populacji mtDNA [13].

IV. Dziedziczenie mitochondriów i mechanizm utrzymywania mtDNA

Transmisja mitochondriów do komórki potomnej zależy od szeregu genów jądrowych, których funkcje nie są do końca znane. W komórce drożdży obserwowano ułożenie mitochondriów wzdłuż włókien aktyny [14]. Znane są mutanty w genie kodującym aktynę *ACT1*, w których morfologia i dziedziczenie mitochondriów są zaburzone [15]. Przypuszcza się, że białko analogiczne do miozyny pośredniczy w ATP-zależnym wiązaniu mitochondriów do włókien aktyny, a konsekwencją tych oddziaływań jest sterowanie ruchem mitochondriów wzdłuż torów wyznaczonych przez cytoszkielet, czyli kontrola pozycji mitochondriów w komórce oraz ich transmisja do komórki potomnej w czasie podziału. Niezależnie od cytoszkieletu aktynowego sugeruje się istnienie w komórce drożdży struktury mikrofilamentów, która jest zaangażowana w proces dystrybucji organelli. Opisało mutantą *mdm1*, który w temperaturze restryktywnej wykazuje brak transmisji jądra i mitochondriów do komórki potomnej [16]. Gen *MDM1* koduje białko niezbędne dla komórki, które wykazuje podobieństwo sekwencji do białek ludzkich, będących składnikami cytoplazmatycznej siateczki mikrofilamentów. Innym dowodem na powiązanie mitochondriów z cytoszkieletem jest zmieniona morfologia i degradacja mtDNA w mutantach w genie *MGM1*, który koduje dynaminę, białko wiążące mikrotubule [17]. Niezależnie stwierdzono, że zmiany w cytoszkielecie wywołane mutacją w genie *VPRI/MDP2* kodującym werprolinę wpływają pośrednio na funkcje mitochondrialne zmieniając transport białek do mitochondriów [18].

Drugim, poza cytoszkieletem, elementem zasadniczym dla dystrybucji mitochondriów jest właściwa struktura błon. Charakterystyka mutantą *mdm2* wskazuje na niezbędny udział nienasyconych kwasów tłuszczowych w dziedziczeniu mitochondriów. W temperaturze restryktywnej nie następuje w mutancie *mdm2* transmisja mitochondriów do pączka komórki potomnej, podczas gdy inne organelle są przenoszone prawidłowo. Białko Mdm2p jest desaturazą $\Delta 9$ kwasów tłuszczowych [19].

Aby zapewnić komórce kompetencję oddechową, transmisji mitochondriów w czasie podziału musi towarzyszyć przenoszenie mtDNA. Dokładny mechanizm segregacji mtDNA i molekularny mechanizm kontroli tego procesu nie są do końca poznane. Wiadomo, że stabilność genomu mitochondrialnego *rho⁺* wymaga aktywnej translacji mitochondrialnej, czego nie wymaga dziedziczenie genomu *rho⁻* [20]. Nie wiadomo jednak czym różni się mechanizm zapewniający stabilność genomu *rho⁺*, od analogicznego

mechanizmu dla genomu ρ^- . Istnieje możliwość, że uboczny produkt translacji mitochondrialnej uczestniczy w replikacji lub transmisji mtDNA ρ^+ , a jest zbędny dla utrzymania mtDNA ρ^- [3]. Podobnie nie wiadomo, na jakiej zasadzie do stabilności mtDNA wymagana jest obecność produktu genu *PIM1*, proteazy odpowiedzialnej za degradację nieprawidłowo fałdowanych białek importowanych do mitochondriów [21]. Wykryto też ostatnio interesujące powiązanie między syntezą aminokwasów a stabilnością mtDNA. Stwierdzono, że inaktywacja genu *ILV3* kodującego reduktiozomerazę kwasu hydroksyoctowego, która katalizuje jeden z etapów syntezy aminokwasów o łańcuchu rozgałęzionym, powoduje niestabilność mtDNA [22].

Istnieje ścisła zależność między żywotnością komórki, mitochondriami i funkcjonalnym mtDNA. Jakkolwiek mitochondria są absolutnie niezbędne dla życia komórki, utrata funkcjonalnego mtDNA jest tolerowana przez *S. cerevisiae* [23]. Istnieją jednak mutanty, które nie tolerują utraty lub degradacji mtDNA. Tolerancja ta jest warunkowana poprzez oksydacyjną fosforylację; szczepy z mutacją *op1* w genie kodującym przenośnik ADP/ATP są letalne w połączeniu z genomem mitochondrialnym ρ^- [224]. Warunkiem utraty funkcjonalnego mtDNA jest zatem aktywna fosforylacja oksydacyjna. Letalność mutantów ρ^- powodują także mutacje w genie *YME1* odpowiedzialnym za migrację mtDNA do jądra komórkowego [7].

V. Replikacja i transkrypcja mtDNA

W zależności od szczepu drożdży, mtDNA zawiera 7-8 startów replikacji (ori), które zidentyfikowano na podstawie podobieństwa sekwencji do analogicznych startów w DNA innych organizmów [25]. Delecja przynajmniej trzech sekwencji startowych (ori 1, 2 i 7) pozostaje bez efektu, podczas gdy inne starty (ori 3) są konieczne do przebiegu replikacji [3]. Zidentyfikowana szereg lat temu mitochondrialna polimeraza DNA nigdy nie została oczyszczona [26]. Prawdopodobnie enzym ten jest kodowany przez jądrowy gen *MIP1* [27], który wykazuje podobieństwo sekwencji polimerazy mtDNA do polimeraz *E. coli*, bakteriofagów i eukariontów. O naprawie uszkodzeń w mtDNA niewiele wiadomo; prawdopodobnie białko kodowane przez gen jądrowy *MSH1*, homolog genu *MutS* z *E. coli*, uczestniczy w naprawie postreplikacyjnej typu „mismatch” [28]. Zidentyfikowano dwa białka kodowane w jądrze związane z rekombinacją mtDNA: endonukleazę kodowaną przez gen *MGT1* (patrz Rozdz. III) oraz ATP-zależną DNA helikazę kodowaną przez gen *PIF1* [29]. Wiadomo, że gen *PIF1* kontroluje równocześnie długość telomerów w DNA jądrowym. *PIF1* stanowi ciekawy przykład genu, który poprzez wykorzystanie dwóch alternatywnych startów translacji koduje dwa białka różniące się sekwencją N-końca — białko dłuższe kierowane do

mitochondriów i białko krótsze transportowane do jądra komórkowego [30].

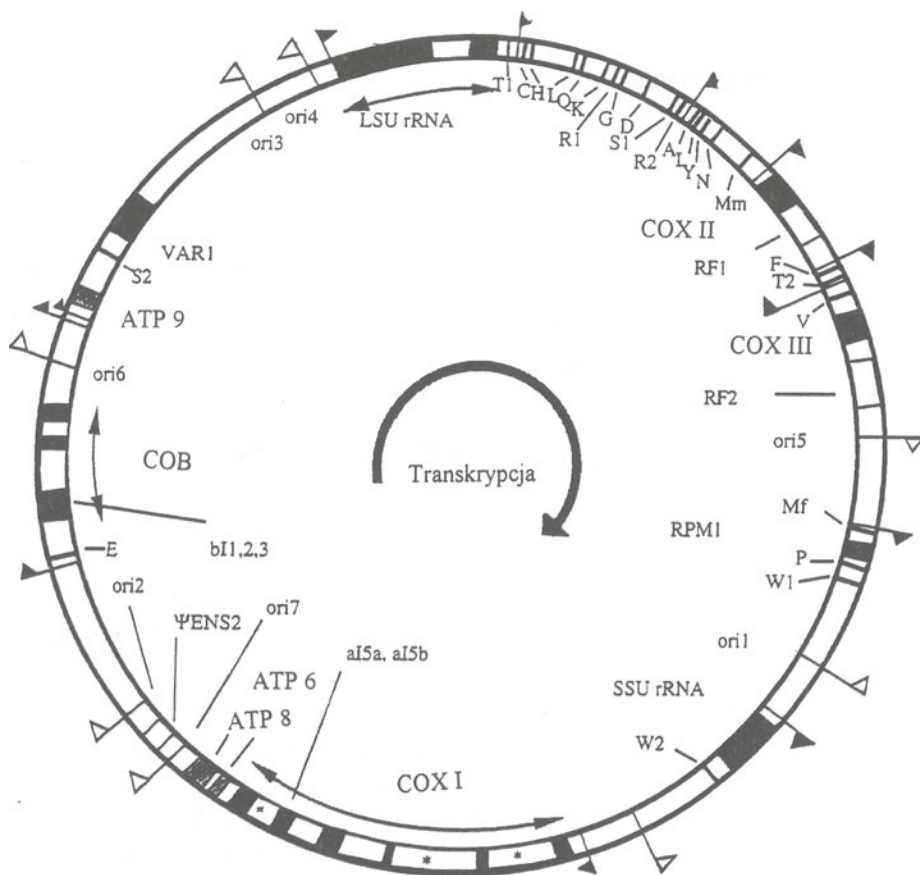
Transkrypcja mtDNA zachodzi z udziałem mitochondrialnej polimerazy RNA kodowanej przez gen jądrowy *RPO41*. Białko to przypomina raczej polimerazy RNA bakteriofagów T3, T7 i SP6 niż RNA polimerazy eukariotyczne [31]. Mitochondrialna polimeraza RNA współdziała z czynnikiem transkrypcyjnym kodowanym przez gen *MTF1* i przypominającym bakteryjny czynnik δ [31]. Miejsca inicjacji transkrypcji w mtDNA drożdży oznaczono na rycinie 1. Mitochondrialne transkrypty są wielogenowe, a poszczególne geny w mtDNA nie posiadają własnych promotorów, co umożliwia wielostopniowy system regulacji. Pierwotne transkrypty są cięte, a motywem rozpoznawanym przez endonukleazę jest charakterystyczna sekwencja dodekameru [33]. mRNA nie mają struktury czapeczki na 5' końcu ani posttranskrypcyjnie syntetyzowanego poliA na 3' końcu [3].

Transkrypty mt tRNA są dodatkowo przycinane na obu końcach. W procesie obróbki końca 5' mt tRNA bierze udział mitochondrialny analog RNazy P. Enzym ten składa się z części białkowej kodowanej przez jądrowy gen *RPM2* [34] oraz RNA kodowanego przez mitochondrialny gen *RPM1* [35]. Poszczególne zasady w mt tRNA są chemicznie modyfikowane z udziałem enzymów kodowanych przez jądrowe geny *CCA1*, *MOD5*, *TRM1* i *TRM2*. Poprzez wykorzystanie alternatywnych startów transkrypcji i translacji geny te kodują izoenzymy, które są sortowane do różnych kompartmentów komórkowych i odpowiadają za analogiczne modyfikacje tRNA mitochondrialnych i tRNA cytozolowych [36]. Rycina 2 przedstawia schematycznie ekspresję genu *MOD5* oraz lokalizację wewnątrzkomórkową powstających izoenzymów [37].

VI. Stabilność i obróbka transkryptów mitochondrialnych

3' końce transkryptów mitochondrialnych powstają poprzez cięcie specyficznej dodekamerowej sekwencji (patrz wyżej). Sekwencja ta pełni prawdopodobnie dodatkową rolę wiążąc kompleks białek, które odpowiadają za stabilność transkryptu [38]. Stwierdzono, że w skład kompleksu stabilizującego wchodzi białka kodowane przez geny jądrowe *SUV3* i *DSS1* [39-41]. Sekwencje stabilizujące 5' koniec mt transkryptów nie zostały dotychczas scharakteryzowane.

Zidentyfikowano szereg genów jądrowych odpowiedzialnych, w sposób bardziej lub mniej specyficzny, za stabilność transkryptów mitochondrialnych. Opisano szczegółowo gen *CBP1*, którego ekspresja warunkuje specyficzną stabilność mRNA cytochromu b [42]. Dwa inne geny jądrowe, *AEP1* i *AEP2*, kodują białka odpowiedzialne za obróbkę i trwałość mRNA podjednostki 9 ATPazy [43]. Zidentyfikowano także mutanty jądrowe, takie jak *SUV3* czy *NAMI*, które oprócz destabilizacji transkryptów miały wpływ na wycinanie



Ryc. 1 Genom mitochondrialny *S. cerevisiae* [3]. Geny kodujące rRNA i znane białka oznaczano na czarno. W przypadku genów zawierających introny, na czarno oznaczono kodujące sekwencje eksonowe. Introny pozostawiono białe, a w przypadku intronów, które występują tylko w niektórych szczepach drożdży, zaznaczono miejsca ich insercji. Introny grupy II oznaczono gwiazdką. Na biało oznaczono także geny kodujące hipotetyczne białka RF1, RF2 i ENS2. Geny tRNA oznaczono według odpowiednich aminokwasów w kodzie jednoliterowym. Cyfry podano dla tRNA izoakceptorowych. Miejsca występowania sekwencji startu replikacji oznaczono białymi trójkącikami, zaś miejsca startu transkrypcji — czarnymi trójkącikami.

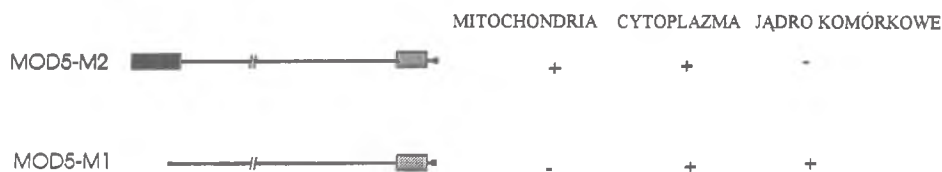
intronów mitochondrialnych. Gen *SUV3* koduje helikazę RNA, a produkt genu *NAM1* nie wykazuje istotnego podobieństwa do innych białek [40, 44, 45].

Trzy geny mitochondrialne *S. cerevisiae*, *COXI*, *COB* i *LSU* zawierają introny (Ryc. 1). Ilość intronów jest zależna od szczepu; gen *COXI* zawiera maksymalnie 7 intronów, gen *COB* — maksymalnie 5 intronów, zaś gen *LSU* posiada 1 intron lub występuje w formie bezintronowej. Skonstruowano szczep laboratoryjny, który nie posiadał w ogóle intronów mitochondrialnych. Brak intronów nie wywołuje zauważalnych zmian fenotypowych i nie zaburza funkcji mitochondrialnych [46].

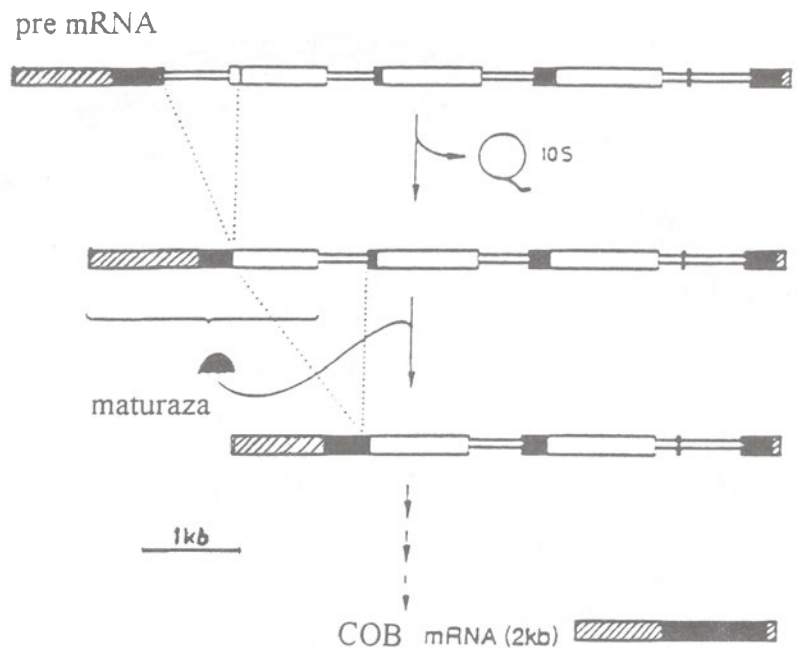
Introny mitochondrialne dzieli się na dwie grupy (I i II) w zależności od przewidywanej struktury drugorzędowej. Wykazano, że w warunkach *in vitro* introny mitochondrialne są zdolne do samowycinania, a mechanizm tej reakcji różni się nieznacznie dla intronów obu grup [47]. Większość intronów mitochondrialnych grupy I zawiera otwartą ramkę odczytu (ORF) kodującą bądź białko uczestniczące w wycinaniu (maturazę), bądź w rozprzestrzenianiu (endonukleazę)

kodującego je intronu. Należą one do rodziny białek zawierających charakterystyczne motywy sekwencji aminokwasowej LAGLI-DADG. Introny grupy II kodują maturazy, które wykazują znaczące podobieństwo sekwencji do odwrotnych transkryptaz retrovirusów [3].

Sekwencje intronowe kodujące maturazy są zgodne w fazie i ciągle z sekwencjami poprzedzających eksonów, co umożliwia kaskadowy proces wycinania kolejnych intronów przedstawiony schematycznie na rycinie 3. Wycięcie pierwszego intronu genu *COB*, niezależne od maturazy, powoduje połączenie się dwóch pierwszych eksonów, B1 i B2. Translacja obu tych eksonów wraz z sekwencją kodującą stanowiącą 5' koniec drugiego intronu prowadzi do powstania maturazy. Katalityczna ilość maturazy wystarcza do wycięcia drugiego intronu, co prowadzi do połączenia B1, B2 i B3. Teraz sekwencja kodująca intronu trzeciego leży bezpośrednio za sekwencją trzech połączonych eksonów i tak może ulegać translacji następną maturazą, która bierze udział w wycinaniu trzeciego intronu. Ilość maturazy w komórce jest tak niska, że jej



Ryc. 2 Lokalizacja subkomórkowa powstających izoenzymów MOD5 [37]. Dwa kodony inicjacyjne AUG są zgodne w fazie i odległe o 12 aminokwasów. Sekwencje odpowiedzialne za transport do mitochondriów przedstawiono jako czarny blok, sekwencje kierujące do jądra komórkowego zakreskowano.



Ryc. 3 Wstępne etapy dojrzewania mRNA cytochromu b (*COB*) *S. cerevisiae* [25]. Eksony B1-B6 zaczer-niono, obszary 5' i 3' nie ulegające translacji zakreskowano, zaś sekwencje kodujące w intronach pozostawiono białe.

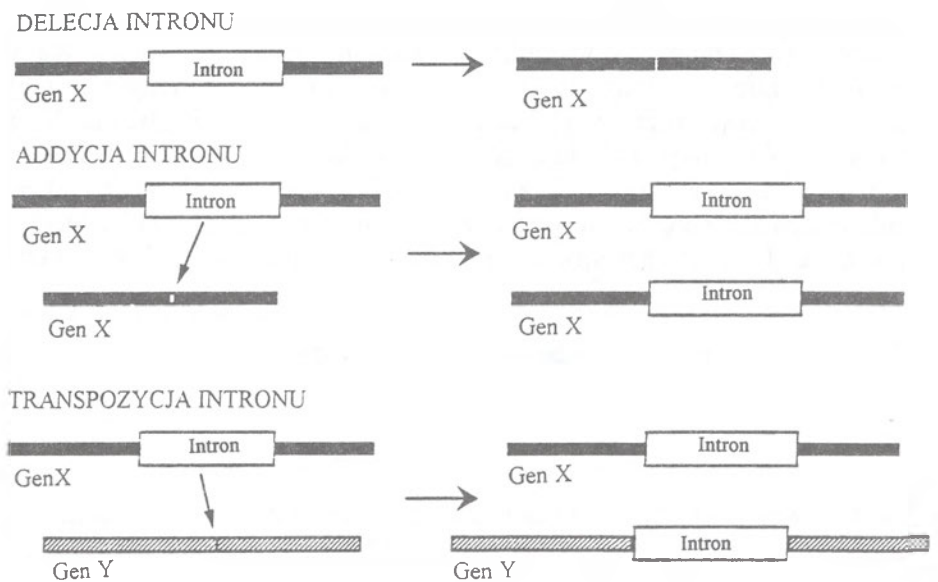
identyfikacja jest możliwa jedynie w mutantach, w których występują specyficzne defekty w wycinaniu intronów [48].

Część intronów mitochondrialnych grupy I koduje endonukleazy, które umożliwiają mobilność intronu, co wykazano metodami klasycznej genetyki [11]. Mechanizm procesów związanych z mobilnością intronów grupy I przedstawiono schematycznie na rycinie 4 [49]. Delecje i addycje intronów mitochondrialnych znajdują potwierdzenie doświadczalne. Zarówno powielanie intronów jak ich delecje nie wpływają na funkcję oddechową mitochondriów. Stwierdzono istnienie spontanicznych mitochondrialnych rewertantów, w których następuje delecja jednego lub większej ilości intronów. Delecja intronu następuje dokładnie na granicy intron-ekson. Addycję intronu grupy I w homologiczne miejsce genu bezintronowego nazwano "intron homing". Endonukleaza powstała w wyniku translacji sekwencji intronowej rozpoznaje specyficzne miejsce w DNA homologicznego genu nie

posiadającego intronu i nacina obie nici. Dwuniciowa przerwa jest naprawiana na bazie istniejącej matrycy, którą stanowi gen wraz z intronem. Także i sekwencje sąsiadujące z intronem ulegają powieleniu. Wbudowany intron może ulegać ekspresji produkując endonukleazę.

Ostatnio opisano także mechanizm addycji dla intronów grupy II na przykładzie intronu ai2 genu *COXI*. Proces ten nazwano "retrohoming", gdyż przeniesienie intronu do allelu bezintronowego zachodzi poprzez odwrotną transkrypcję mRNA allelu zawierającego intron. Białko kodowane przez intron ai2 spełnia równocześnie 3 funkcje: maturazy, endonukleazy i odwrotnej transkryptazy, przy czym za każdą z funkcji odpowiada określona domena białka [50].

Opisano ciekawą mutację w sekwencji endonukleazy intronu czwartego genu *COXI*, która kompensuje defekt maturazy genu *COB* [51]. Zatem pojedyncza substytucja aminokwasu wystarczy aby endonukleaza była zdolna do funkcjonowania jako maturaza.



Ryc. 4 Uproszczone schematy procesów związanych z mobilnością intronów mitochondrialnych [49].

Transpozycja intronu nie została potwierdzona doświadczalnie. Opisano jednak u drożdży efektywny mechanizm rozprzestrzeniania się sekwencji intronowych obejmujący wstawienie sekwencji intronowych w niehomologiczne miejsca poprzez odwrotną transkrypcję i integracją powstałego cDNA do genomu mitochondrialnego [52].

W procesie wycinania intronów z mt transkryptów bierze także udział szereg białek kodowanych w jądrze i transportowanych do mitochondriów. Większość tych białek zidentyfikowano metodami genetycznymi. Niektóre z nich uczestniczą także w mitochondrialnej syntezie białek. Wykazano na przykład, że mitochondrialna syntetaza tRNA kodowana przez gen *NAM2* jest bezpośrednio zaangażowana w wycinanie określonych intronów genów *COB* i *COXI* [53, 54]. Produkty innych genów jądrowych regulują syntezę maturaz, przez co mają pośredni wpływ na wycinanie intronów mitochondrialnych [55].

Bezpośredni związek między translacją a procesem wycinania intronów jest teoretycznie możliwy właśnie jedynie w mitochondrialnym systemie ekspresji genów. Mitochondria stanowią bowiem unikalny system, gdzie oba procesy mogą zachodzić „fizycznie” w tym samym miejscu podczas gdy oddzielenie jądra komórkowego komórki eukariotycznej poprzez błonę jądrową powoduje ich rozdzielenie.

VII. Translacja mitochondrialna

Naszą obecną wiedzę o mitochondrialnym systemie translacji drożdży zawdzięczamy głównie eksperymentom genetycznym. Badania biochemiczne są ograniczone, gdyż do tej pory nie udało się odtworzyć mitochondrialnego systemu translacji *in vitro*. Szacuje się, że w skład mitochondrialnego aparatu translacji wchodzi około 150 różnych białek i cząsteczek RNA [56]. Co najmniej 77 białek wchodzi w skład rybosomu mitochondrialnego, czyli mitorybosomu [57]. Za syntezę, obróbkę, modyfikację i aminoacylację mt tRNA odpowiada co najmniej 50 genów. Ostatnią grupę białek stanowią generalne czynniki translacyjne oraz specyficzne dla poszczególnych mitochondrialnych transkryptów aktywatory translacji. Należy podkreślić, że mitochondrialny system translacji wymaga skoordynowanej ekspresji genomu jądrowego i mtDNA. Kompletny zestaw tRNA, 15S i 21S rRNA, a także Var1p, jedno z białek mitorybosomów oraz podjednostka enzymu odpowiedzialnego za obróbkę mt tRNA są kodowane w mt DNA. Wszystkie, poza Var1p, białka mitorybosomów oraz pozostałe składniki aparatu translacji są kodowane w jądrze komórkowym, syntetyzowane w cytozolu, a następnie transportowane do mitochondriów.

Mitorybosomy, które dysocjują na podjednostki 54S i 37S, przypominają pod pewnymi względami rybosomy prokariotów, a mniej są podobne do cytozolowych rybosomów eukariotycznych [58]. Po

pierwsze szereg zidentyfikowanych białek mitorybosomów wykazuje podobieństwo sekwencji do białek rybosomów bakteryjnych. Zestaw antybiotyków, które hamują translację mitochondrialną przypomina te, które działają na rybosomy bakteryjne. Także mitochondrialne czynniki translacyjne przypominają bardziej czynniki translacyjne prokariotów niż eukariotów [3]. Mitorybosomy zawierają jednak większą liczbę białek, które też często są inne, a czasem podobne, ale większe od analogicznych białek bakteryjnych [59]. Spośród 23 białek mitorybosomalnych, których sekwencje są znane, prawie wszystkie są niezbędne dla funkcjonowania translacji, ale tylko 10 wykazuje homologię do znanych białek rybosomalnych *E. coli* [60]. Unikalną cechą mitorybosomów jest zdolność do oddziaływania ze specyficznymi aktywatorami translacji oraz z błoną mitochondrialną.

Translacja co najmniej pięciu spośród ośmiu podstawowych mt mRNA wymaga jednego lub większej ilości specyficznych aktywatorów [25]. Sugeruje się, że białka te funkcjonują poprzez oddziaływanie z mitorybosomem, 5' sekwencją wiodącą mRNA i wewnętrzną błoną mitochondrialną [61]. Rola aktywatorów polega na rozpoznaniu miejsca startu translacji, co może być utrudnione, gdyż mitochondrialne mRNA nie mają czapeczki, są długie, a ich drugorzędowa struktura jest mało zróżnicowana ze względu na znaczącą przewagę reszt AT. Sugeruje się także, że aktywatory translacji prawdopodobnie ułatwiają wbudowanie powstającego produktu białkowego w kompleksy oddechowe, które funkcjonują w błonie mitochondrialnej [62, 63]. Natomiast niespecyficznym represorem translacji mitochondrialnej, białkiem, które wiąże się do 5' końca wszystkich mitochondrialnych mRNA, jest dehydrogenaza izocytrynianu. Jest to jeden z podstawowych enzymów cyklu Krebsa, który, jak się niedawno okazało posiada zdolność wiązania się z RNA i pełni alternatywną funkcję w regulacji translacji mitochondrialnej. Ten dualizm funkcji dehydrogenazy izocytrynianu pozwala na sprzężenie translacji mitochondrialnej z generalnym metabolizmem komórkowym [64]. Zidentyfikowano też białka o nieznannej funkcji, które są prawdopodobnie związane z rybosomami mitochondrialnymi [65].

Poza pewnymi aspektami struktury mitorybosomów, specyficzność mitochondrialnego systemu translacji polega na stosowaniu kodu genetycznego odmiennego od kodu uniwersalnego [66, 67]. U *S. cerevisiae* kodony AUA i CUN oznaczają odpowiednio metioninę i treoninę, zaś kodon UGA jest tłumaczony na tryptofan [68]. Ograniczona liczba 25 typów mt tRNA uniemożliwia translację według reguły chwiejności sformułowanej przez Cricka, a brak izoakceptorowych tRNA wymusza uproszczoną regułę odczytywania [69]. W odróżnieniu od roślin, u drożdży nie ma konieczności transportu cytozolowych tRNA do mitochondriów. Stwierdzono jedynie import cytoplazmatycznego tRNA lys, który jednak nie fun-

kjonuje w aparacie translacyjnym, a jego funkcja w mitochondriach jest nieznaną [70].

Mitochondrialne rRNA nie zawierają metylowanych zasad, a metylacja rybozy jest ściśle ograniczona do jednej guanozyny w pozycji w 21S rRNA, podczas gdy 16S rRNA pozostaje niezmodyfikowany. Za modyfikację odpowiada gen *PET56*, którego ekspresja warunkuje powstanie mitorybosomów [71].

Unikalną cechą mitorybosomów *S. cerevisiae* jest brak cząsteczki 5S rRNA.

VIII. Modyfikacja, degradacja i włączanie białek mitochondrialnych w kompleksy

Wszystkie produkty mitochondrialnej translacji, za wyjątkiem Var1p i białek kodowanych w intronach, są hydrofobowymi białkami błonowymi wchodzącymi w skład kompleksów oddechowych zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Pomimo, że powiązanie mitorybosomów i aktywatorów translacji z błoną mitochondrialną powinno ułatwiać włączanie powstających polipeptydów w błonę, zidentyfikowano białka, które ułatwiają ten proces. Gen *ABC1* jest niezbędny do utworzenia kompleksu bc1 [72]. Geny *SCO1* i *OXA1* są niezbędne do powstania oksydazy cytochromu c, a brak ich aktywności prowadzi do destabilizacji określonych podjednostek tego enzymu [73, 74].

Kodowane jądrowo i transportowane do mitochondriów białka są w większości przypadków pozbawiane N-końcowej sekwencji kierującej. Obróbka ta zachodzi podczas lub zaraz po transporcie z udziałem wysoce specyficznych proteaz zlokalizowanych w matrix lub wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Metaloproteaza MPP, złożona z dwóch podjednostek kodowanych przez geny *MAS1* i *MAS2*, odcina sekwencje kierujące do matrix i część sekwencji kierującej do przestrzeni międzybłonowej [75]. Odpowiednik proteazy MPP u *Neurospora* i u roślin wchodzi w skład kompleksu oddechowego bc1 [76], co wskazuje na wspólną regulację biogenezy mitochondriów i ich aktywności energetycznej. Proteaza IMP odpowiada za odcinanie sekwencji kierującej do przestrzeni międzybłonowej. Enzym ten składa się z katalitycznych podjednostek IMP1 i IMP2 o odmiennej specyficzności [77].

Oprócz specyficznych enzymów, mitochondria posiadają proteazy, które funkcjonują w ATP-zależnym procesie degradacji białek o nieodpowiedniej konformacji lub takich, których synteza nie była kompletna [78]. W mitochondriach występują homologi proteaz La i Clp *E. coli*, kodowane odpowiednio przez geny drożdżowe *PIM1* i *HSP78*. Białko Pim1 współdziała z mitochondrialnym białkiem szoku cieplnego w rozpoznaniu i degradacji niewłaściwie pofałdowanych białek, a jednocześnie warunkuje stabilność mtDNA [79]. Brak białka Hsp78 nie zaburza istotnej funkcji mitochondriów i jego rola nie jest poznana [80].

Rośnie liczba białek mitochondrialnych ATPazopodobnych z rodziny nazwanej AAA, których funkcja nie jest wyjaśniona. Do tej klasy należą produkty genów jądrowych *BCS1*, *AGF3*, *RCA1* i *YME1*. Sekwencje wszystkich tych białek posiadają dwie domeny po około 200 aminokwasów, które zawierają charakterystyczne dla ATPaz motywy odpowiedzialne za wiązanie nukleotydów. Pomimo podobieństwa sekwencji nie można przypisać wymienionym białkom analogicznych funkcji. Bcs1p i Rca1p mają udział w formowaniu mitochondrialnych kompleksów oddechowych [81, 82]. Wspomniane uprzednio w obecnym artykule białko Yme1 wpływa na migrację mtDNA do jądra komórkowego [7]. Agf3 prawdopodobnie pełni równocześnie funkcje białka chroniącego (chaperon) i proteazy, przez co jednocześnie pomagałoby białkom mitochondrialnym przybrać właściwą konformację i degradowałoby „nienormalne” polipeptydy [3].

IX. Mitochondria regulują funkcję jądra komórkowego

Komórka drożdżowa jest w stanie zmieniać ekspresję różnych genów jądrowych w zależności od stanu fizjologicznego mitochondriów, a także stanu mtDNA. Zjawisko to jest znane jako regulacja typu retro, co podkreśla możliwość komunikacji organelli w przeciwnym kierunku w stosunku do udokumentowanego obszernie ruchu informacji jądro komórkowe-mitochondria. Przykładem regulacji retro jest wpływ niefunkcyjnych mitochondriów w mutantach *rho⁰* na podwyższenie poziomu transkrypcji genu *CIT2*, który koduje peroksysomalną formę syntazy cytrynianu. Efekt ten jest sterowany przez sekwencje UAS w 5' niekodującej sekwencji genu *CIT2* za pośrednictwem białek regulatorowych kodowanych przez geny *RTG1* i *RTG2* [83]. Produkty genów *RTG* warunkują wzrost drożdży na pożywce z kwasem olejowym i są niezbędne do syntezy białek peroksysomalnych. Sugeruje się, że białka Rtg funkcjonują w systemie komunikacji między mitochondriami, peroksysomami i jądrem komórkowym [84].

X. Podsumowanie

W ciągu ostatniego dziesięciolecia wyizolowano kilkaset genów jądrowych odpowiedzialnych za funkcje mitochondrialne *Saccharomyces cerevisiae*. Poprzez identyfikację genów związanych z importem białek do mitochondriów, dziedziczenie mitochondriów i ich oddziaływaniem z cytoszkieletem stwierdzono istotną rolę mitochondriów w procesach wzrostu i podziału komórki. Metody klonowania pozwoliły na izolację genów, które w wypadku nadekspresji są supresorami znanych mutacji mitochondrialnych. Strategia ta umożliwiła określenie hipotetycznego współdziałania produktów różnych genów odpowie-

działnych za funkcje mitochondrialne. Wreszcie poprzez realizację projektu sekwencjonowania genomu *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano szereg genów, których inaktywacja powodowała defekty w funkcjonowaniu mitochondriów. Analiza sekwencji pozwoliła na stworzenie rodzin białek homologicznych gdyż białkom danej rodziny przypisuje się analogiczne funkcje. Przykładem jest rodzina białek mitochondrialnych AAA, które regulują oddziaływania białko-białko warunkując powstawanie kompleksów i czas życia białek. Stwierdzono też, że mitochondria mogą wpływać na ekspresję genów jądrowych. Niewątpliwie charakterystyka oddziaływań jądro komórkowe-mitochondria pozwala na głębsze zrozumienie zjawiska komunikacji między organelami komórkowymi.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu grantowego KBN nr 6PO4A06208.

Artykuł otrzymano 21 lutego 1996 r.
Zaakceptowano do druku 15 maja 1996 r.

Piśmiennictwo

- Bolotin-Fukuhara M, Grivell LA (1992) *Antonie van Leeuwenhoek; J Gen Microbiol* **62**: 131-153
- Maleszka R, Skelly PJ, Clark-Walker GD (1991) *EMBO J* **10**: 3923-3929
- Grivell LA (1995) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**: 121-164
- Grosman LI, Cryer DR, Goldring ES, Marmur J (1971) *J Mol Biol* **62**: 565-
- Bernardi G (1982) *Trends Biochem Sci* **7**: 404-408
- Farrelly F, Butow RA (1983) *Nature (Lond)* **301**: 296-301
- Thorsness PE, White KH, Fox TD (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 5418-5426
- Jonston SA, Anziano PQ, Shark K, Sanford JC, Butow RA (1988) *Science* **240**: 1538-1541
- Fox TD, Sanford JC, McMullin TW (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7288
- Kruszewska A, Boguta M (1988) *Post Biol Kom* **15**: 327-346
- Blanc H, Dujon B (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3942
- Birky CW (1994) *J Hered* **85**: 355-365
- Lockson D, Zweifel SG, Freeman-Cook LL, Lorimer HE, Brewer BJ, Fangman WL (1995) *Cell* **81**: 947-955
- Drubin DG, Jones HD, Wertman KF (1993) *Mol Biol Cell* **4**: 1277-1294
- Lazzarino DA, Boldogh I, Smith MG, Rosand J, Pon L (1994) *Mol Biol Cell* **5**: 807-818
- McConnell SJ, Yaffe MP (1993) *Science* **260**: 687-689
- Jones BA, Fangman WL (1992) *Genes Dev* **6**: 380-389
- Zoladek T, Vaduva G, Hunter LA, Boguta M, Go BD, Martin NC, Hopper AK (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 6884-6894
- Stewart LC, Yaffe MP (1991) *J Cell Biol* **115**: 1249-1257
- Myers AM, Pape LK, Tzagoloff A (1985) *EMBO J* **4**: 2087-2092
- Wagner LH, Arlt H, van Dyck L, Langer T, Neupert W (1994) *EMBO J* **13**: 5135-5145
- Zelenaya-Troitskaya O, Perlman PS, Butow RA (1995) *EMBO J* **14**: 3268-3276
- Słonimski PP, Perrodin G, Croft JH (1968) *Biochem Biophys Res Com* **30**: 232-239
- Kolarov J, Kolarova N, Nelson N (1990) *J Biol Chem* **265**: 12711-12716
- Pon L, Schatz G (1991) *The Molecular Biology of Saccharomyces cerevisiae* t1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 333-406
- Wintersberger U, Blutsch H (1976) *Eur J Biochem* **13**: 11-19
- Genga A, Bianchi L, Foury F (1986) *J Biol Chem* **261**: 9328
- Reenan RA, Kolodner RD (1992) *Genetics* **132**: 975-985
- Foury F, Van Dyck E (1985) *EMBO J* **4**: 3225-3530
- Schulz VP, Zakian VA (1994) *Cell* **76**: 145-155
- Schinkel AH, Tabak FH (1989) *Trends Genet* **5**: 149-154
- Jang SH, Jaehning JA (1991) *J Biol Chem* **266**: 22671-22677
- Hofmann TJ, Min JJ, Zassenhaus HP (1993) *Yeast* **9**: 1319-1330
- Dang YL, Martin NC (1993) *J Biol Chem* **268**: 19791-19796
- Miller DL, Martin NC (1983) *Cell* **34**: 911-917
- Martin NC, Hopper AK (1994) *Biochimie* **76**: 1161-1167
- Boguta M, Hunter LA, Shen WC, Gilman EC, Martin NC, Hopper AK (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 2298-2306
- Min JJ, Zassenhaus HP (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 4167-4173
- Dmochowska A, Golik P, Stępień PP (1995) *Curr Genet* **28**: 108-112
- Stępień PP, Kokot L, Leski T, Bartnik E (1995) *Curr Genet* **27**: 234-238
- Stępień PP, Margossian SP, Landsman D, Butow RA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6813-6817
- Mittelmeier TM, Dieckman CL (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 4203-4213
- Ziaja K, Michaelis G, Lisowsky T (1993) *J Mol Biol* **229**: 909-916
- Groudinsky O, Bosquet I, Wallis MG, Slonimsky PP, Dujardin G (1993) *Mol Gen Genet* **240**: 419-427
- Golik P, Szczepanek T, Bartnik E, Stępień P, Łazowska J (1995) *Curr Genet* **28**: 217-224
- Seraphin B, Boulet A, Simon M, Faye G (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6810-6814
- Lambowitz AM, Belfort M (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 587-622
- Łazowska J, Jacq C, Slonimski PP (1980) *Cell* **22**: 333-342
- Dujon B (1989) *Gene* **82**: 91-114
- Curcio MJ, Belfort M (1996) *Cell* **84**: 9-12
- Dujardin G, Jacq C, Slonimski PP (1982) *Nature (Lond)* **298**: 628-632
- Mueller M, Allmaier M, Eskes R, Schweyen RJ (1993) *Nature (Lond)* **366**: 174-176
- Labouesse M (1990) *Mol Gen Genet* **224**: 209-221
- Zagórski W, Castaing B, Herbert CJ, Labouesse M, Martin R, Slonimski PP (1991) *J Biol Chem* **266**: 2357-2541
- Pel H, Rep M, Grivell LA (1992) *Nucleic Acid Res* **20**: 6339-6346
- Pel H, Grivell LA (1994) *Mol Biol Rep* **19**: 183-194
- Boguta M, Mieszczak M, Zagórski W (1988) *Curr Genet* **13**: 129-135
- Kitakawa M, Isono K (1991) *Biochimie* **73**: 813-825
- Boguta M, Dmochowska A, Borsuk P, Wróbel K, Gargouri A, Łazowska J, Slonimski PP, Szcześniak-Kruszewska A (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 402-412
- Fearon K, Mason TL (1992) *J Biol Chem* **267**: 5162-5170
- Constanzo MC, Fox TD (1990) *Annu Rev Genet* **24**: 91-113
- Brown NG, Constanzo MC, Fox TD (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 1045-1053
- Mulero JJ, Fox TD (1993) *Mol Biol Cell* **4**: 1327-1355
- Elzinga SD, Bednarczyk AL, van Oosterum K, Dekker PJ, Grivell LA (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 5328-5331
- Konopińska A, Szcześniak B, Boguta M (1995) *Yeast* **11**: 1513-1518
- Fox TD (1987) *Annu Rev Genet* **21**: 67-91
- Boguta M, Putrament A (1987) *Kosmos* **34**: 67-87
- Martin NC, Pham HD, Underbrink-Lyon K, Miller DL, Donelson JE (1990) *Nature (Lond)* **285**: 579-581
- Martin RP, Sibling AP, Gehrke CW, Kuo K, Ed-

- mons CG, McCloskey JA, Dirheimer G (1990) *Biochemistry* 29: 956-959
70. Martin RP, Schneller JM, Stahl JC, Dirheimer G (1979) *Biochemistry* 18: 4600-4605
71. Sirum-Connelly K, Mason TL (1993) *Science* 262: 1886-1889
72. Bosquet I, Dujardin G, Slonimski PP (1991) *EMBO J* 10: 2023-2031
73. Bonneffoy N, Chalvet F, Hamel P, Slonimski PP, Dujardin G (1994) *J Mol Biol* 239: 201-212
74. Krummeck G, Rodel G (1990) *Curr Genet* 18: 13-15
75. Yaffe MP, Schatz G (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4819-4823
76. Erickson AC, Glaser E (1992) *Biochem Biophys Acta* 1140: 208-214
77. Nunnari J, Fox TD, Walter P (1993) *Science* 262: 1997-2004
78. Goldberg AL (1992) *Eur J Biochem* 203: 9-23
79. Suzuki CK, Suda K, Wang N, Schatz G (1994) *Science* 264: 273-276
80. Leonardt SA, Fearon K, Daese PN, Mason TL (1993) *Mol Cell Biol* 13: 6304-6313
81. Norberga FG, Norberga MP, Tzagoloff A (1992) *EMBO* 11: 3821-3829
82. Tzagoloff A, Dieckamn CL (1990) *Microbiol Rev* 54: 211-225
83. Liao X, Butow RA (1993) *Cell* 72: 61-71
84. Chelstowska A, Butow RA (1995) *J Biol Chem* 270: 18141-18146

Roślinny łańcuch oddechowy

Plant respiratory chain

ANNA M. RYCHTER*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Dehydrogenazy NAD(P)H roślinnego łańcucha oddechowego
 - II-1. Zewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H
 - II-1.1. Charakterystyka zewnętrznych dehydrogenaz NAD(P)H
 - II-1.2. Rola fizjologiczna zewnętrznych dehydrogenaz NAD(P)H
 - II-2. Wewnętrzne dehydrogenazy NADH
 - II-2.1. Kompleks I, dehydrogenaza NADH (hamowana przez rotenon)
 - II-2.2. Dehydrogenaza NADH niewrażliwa na rotenon
- III. Oksydaza alternatywna
 - III-1. Charakterystyka oksydazy alternatywnej
 - III-2. Regulacja przepływu elektronów przez drogę cytochromową i alternatywną
 - III-3. Oznaczanie aktywności drogi alternatywnej
 - III-4. Rola fizjologiczna drogi alternatywnej
- IV. Uwagi końcowe

I. Wstęp

Wydajność energetyczna oddychania wpływa na wiele procesów związanych ze wzrostem i rozwojem roślin. Końcowy etap oddychania zachodzi w mitochondriach, gdzie zlokalizowany jest łańcuch oddechowy i cykl Krebsa. Rośliny oddychają nie tylko w ciemności, ale również na świetle, podczas fotosyntezy. W komórkach fotosyntetyzujących źródłem sub-

Contents:

- I. Introduction
- II. Plant respiratory chain NAD(P)H dehydrogenases
 - II-1. External NAD(P)H dehydrogenases
 - II-1.1. Characteristics of external NAD(P)H dehydrogenases
 - II-1.2. Physiological role of external NAD(P)H dehydrogenases
 - II-2. Internal NADH dehydrogenases
 - II-2.1. Internal NADH dehydrogenase (inhibited by rotenon), Complex I
 - II-2.2. Internal NADH dehydrogenase, rotenon insensitive
- III. Alternative oxidase
 - III-1. Characteristics of alternative oxidase
 - III-2. Regulation of electron flux between cytochrome and alternative pathways
 - III-3. Determination of the activity of alternative pathway
 - III-4. Physiological role of alternative pathway
- IV. Concluding remarks

stratów oddechowych dla mitochondriów może być nie tylko glikoliza (pirogonian, jabłczan), ale również pośrednio fotosynteza (jabłczan) lub fotooddychanie (glicyna). Dopływ tych substratów może podlegać zmianom, nie tylko w warunkach światło-ciemność, ale również na świetle w zależności od intensywności fotosyntezy lub fotooddychania. W komórkach niefotosyntetyzujących ilość substratów również może się zmieniać w zależności od metabolizmu i od wpływu warunków środowiskowych, np. przy zmianach temperatury.

Mitochondria uważa się za centrum przetwarzania energii w komórce. Główną ich funkcją jest utlenianie

* Prof. dr hab., Zakład Bioenergetyki Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5A.

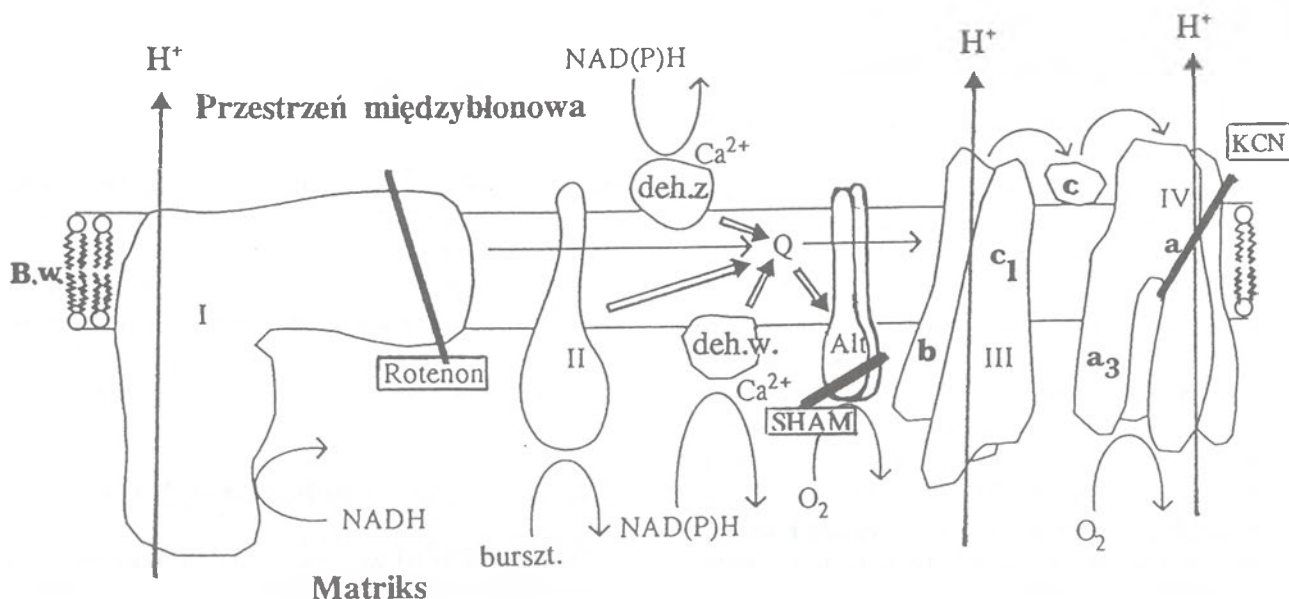
substratów związane z transportem elektronów sprzężonych z syntezą ATP. Łańcuch oddechowy składa się z wielobiałkowych kompleksów biorących udział w przenoszeniu elektronów z różnych substratów na tlen cząsteczkowy. Cztery główne kompleksy to: kompleks I — oksydoreduktaza NADH: ubichinon, kompleks II — oksydoreduktaza bursztynian: ubichinon, kompleks III — oksydoreduktaza ubichinol:cytochrom c i kompleks IV — oksydaza cytochromowa (Ryc. 1). W błonie mitochondrialnej znajduje się rozpuszczony w niej mobilny ubichinon, który łączy ze sobą kompleksy enzymatyczne dehydrogenaz łańcucha oddechowego z oksydazami regulując przepływ i dystrybucję elektronów na łańcuch cytochromowy (kompleks III, cytochromy b-c₁ oraz kompleks IV, oksydaza cytochromowa) lub oksydazę alternatywną. Zlokalizowany po zewnętrznej stronie błony wewnętrznej, cytochrom c działa jako mobilny przenośnik elektronów łączący kompleks III z kompleksem IV. Podobnie jak w mitochondriach zwierzęcych kompleksy I, III i IV są ułożone w poprzek błony i uczestniczą w wytwarzaniu gradientu protonów. Gradient ten wykorzystywany jest przez syntazę ATP (F₀ F₁ — ATPazę) do syntezy ATP.

W mitochondriach roślinnych, dzięki obecności dodatkowych kompleksów enzymatycznych, możliwy jest transport elektronów na tlen z pominięciem tych fragmentów łańcucha oddechowego, które są związane z translokacją protonów (Ryc. 1). Ze względu na możliwość przeniesienia elektronów bez syntezy ATP, mitochondria roślinne mogą charakteryzować się niższym stopniem sprzężenia (stosunek P/O). Roślinny łańcuch oddechowy jest więc bardziej złożony niż zwierzęcy łańcuch oddechowy, a centralnym jego członem jest ubichinon. Mitochondria roślinne różnią

się od mitochondriów zwierzęcych:

- rozbudowanym systemem utleniania NAD(P)H; dodatkową (oprócz kompleksu I), wewnątrz mitochondrialną dehydrogenazą NADH, niewrażliwą na rotenon oraz możliwością utleniania cytosolowego, zewnątrz mitochondrialnego NAD(P)H przez związaną z łańcuchem oddechowym zewnętrzną dehydrogenazą NAD(P)H;
- obecnością tzw. oksydazy alternatywnej, niewrażliwej na cyjanek, dzięki której możliwy jest transport elektronów na tlen z pominięciem łańcucha cytochromowego.
- obecnością w mitochondriach enzymu jabłczanowego (dehydrogenazy jabłczanowej dekarboksylującej, specyficznej dla NAD).
- zdolnością do utleniania glicyny przez mitochondria izolowane z liści roślin, u których występuje fotooddychanie.

Wszystkie te cechy odzwierciedlają bardziej „plastyczną” funkcję mitochondriów w komórce roślinnej. Wynika ona z konieczności szybkiego przystosowywania się do zmiennych warunków metabolicznych oraz współdziałania z innymi organellami przetwarzającymi energię (chloroplasty) lub z peroksyzomami biorącymi udział w fotooddychaniu. Z tego też względu funkcja mitochondriów w komórce roślinnej nie może być rozważana w oderwaniu od innych organelli oraz od tkanki (np. liści lub korzeni) i warunków zewnętrznych (np. światło, ciemność) w jakich znajduje się cała roślina. Wiele cech wspólnych z mitochondriami roślin wyższych wykazują mitochondria ameb [1]. W ostatnich latach ukazały się artykuły przeglądowe opisujące zarówno budowę roślinnego łańcucha oddechowego jak i funkcję mitochondriów [2-6]. Badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej okazały się



Ryc. 1 Schemat roślinnego łańcucha oddechowego, zmodyfikowano wg [6 i 10]. B.w. — wewnętrzna błona mitochondrialna, w której umieszczony jest łańcuch oddechowy; I, II, III i IV — oznaczono kolejno kompleksy łańcucha oddechowego, strzałkami oznaczono miejsca i kierunek translokacji protonów; podwójnymi strzałkami oznaczono fragmenty łańcucha, z których przeniesienie elektronów nie jest związane z translokacją protonów; grubą kreską oznaczono miejsce hamowania przez rotenon, KCN i SHAM; Q — ubichinon; deh.z. i deh.w. — odpowiednio zewnętrzne i wewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H, niewrażliwe na rotenon; Alt. — oksydaza alternatywna; b, c₁, c, a₃, a — cytochromy tworzące tzw. łańcuch cytochromowy.

niezmiernie przydatne do określenia struktury i miejsca powiązania niektórych komponentów łańcucha oddechowego (oksydaza alternatywna) oraz mechanizmów regulacji przepływu elektronów. Artykuł ten jest podsumowaniem ostatnich badań dotyczących struktury i funkcji dodatkowych, charakterystycznych dla roślin, fragmentów łańcucha oddechowego.

II. Dehydrogenazy NAD(P)H roślinnego łańcucha oddechowego

Roślinny łańcuch oddechowy ma dwa systemy dehydrogenaz związane z utlenianiem NAD(P)H: zewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H, utleniające NAD(P)H cytosolowe i dehydrogenazy wewnętrzne, utleniające NADH wytworzone w matriks. Mitochondrialnym dehydrogenazom NAD(P)H w ostatnich latach poświęcono szereg artykułów przeglądowych [7-10].

II-1. Zewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H

II-1.1. Charakterystyka zewnętrznych dehydrogenaz NAD(P)H

Izolowane mitochondria roślinne, w odróżnieniu od mitochondriów zwierzęcych, aktywnie utleniają dodane, egzogene NAD(P)H. Wynika to z obecności w roślinnym łańcuchu oddechowym dehydrogenazy utleniającej NAD(P)H cytosolowe i przekazującej elektrony na ubichinon [11, 12]. W związku z tym utlenianiu zewnątrz mitochondrialnego NADH towarzyszą dwie fosforylacje [9]. Kontrowersyjne jest zagadnienie czy jest to jedna dehydrogenaza specyficzna zarówno dla NADH jak i NADPH czy też są to dwie dehydrogenazy. Na obecność jednej dehydrogenazy wskazywały prace M ö l l e r a i w s p. [10]. Ostatnie badania przy zastosowaniu przeciwciał wykazały jednak obecność co najmniej dwóch dehydrogenaz, różniących się optimum pH i specyficznością substratową w stosunku do NADH i NADPH [13].

Utlenianie NAD(P)H przez dehydrogenazę zewnętrzną jest zależne od pH. Optimum utleniania NADH zachodzi przy pH między 6.8-7.2, natomiast utlenianie NADPH zachodzi przy pH nieco niższym [14-17], a więc jest to pH bardzo zbliżone do pH cytosolowego (7.1-7.6) [18]. Utlenianie egzogenego NAD(P)H przez mitochondria roślinne jest stymulowane przez kationy, szczególnie zaś przez jony wapnia [14]. Funkcja jaką pełnią jony Ca^{2+} w regulacji aktywności zewnętrznej dehydrogenazy NADH nie jest wyjaśniona. Obecnie sądzi się, że jony Ca^{2+} nie stymulują aktywności dehydrogenazy natomiast ułatwiają przekazywanie elektronów na ubichinon znajdujący się w lipidowej frakcji błony, co wskazuje, że miejscem działania Ca^{2+} jest raczej ubichinon [19]. Stymulacja utleniania NADH przez jony Ca^{2+} obserwowana jest przy pH obojętnym, spada natomiast przy pH poniżej 7 [20]. Usunięcie jonów Ca^{2+} (np. przez dodanie czynników

chelatujących) powoduje zahamowanie utleniania NADH przez izolowane mitochondria [20]. Gdy dehydrogenaza NADH uwolniona jest z błony mitochondrialnej przez sonifikację lub traktowanie detergentem, zależność aktywności od jonów Ca^{2+} spada, aczkolwiek enzym ten w dalszym ciągu redukuje analogi ubichinonu [21, 22]. Godnym odnotowania jest fakt, że maksimum stymulacji przypada na stężenia Ca^{2+} bliskie stężeniom występującym w cytosolu u większości roślin, które to stężenie podlega regulacji i zmienia się podczas wzrostu i rozwoju oraz pod wpływem zmiennych warunków środowiskowych. Stymulację przez jony Ca^{2+} obniżają też regulatory wzrostu, poliaminy [23].

II-1.2. Rola fizjologiczna zewnętrznych dehydrogenaz NAD(P)H

Zewnętrzne dehydrogenazy NAD(P)H mogą regulować stężenie NAD(P)H w cytosolu. Regulacja nadmiaru siły redukcyjnej, przy powiązaniu dehydrogenazy zewnętrznej NAD(P)H z drogą alternatywną, mogłaby zachodzić bez produkcji ATP. Jednakże podczas utleniania cytosolowego NADH lub NADPH elektrony przekazywane na ubichinon przepływają na drogę cytochromową z jednoczesną syntezą dwóch cząsteczek ATP [24-27]. Nie wyjaśniony jest brak dostępu zewnętrznej dehydrogenazy NADH do drogi alternatywnej u roślin nietermogennych [12, 23, 27]. Tylko u *Araceae*, u których poziom oddychania cyjanoodpornego podczas kwitnienia jest bardzo wysoki, utlenianie zewnątrz mitochondrialnego NADH może zachodzić prawie wyłącznie przy udziale drogi alternatywnej [12, 26].

NADH utleniane jest bardzo intensywnie przez mitochondria większości roślin, K_m dla NADH waha się pomiędzy 10-100 μM [8], natomiast stężenie NADH w cytosolu w liściach szpinaku na świetle wynosi zaledwie 0.6 μM [28]. Ponadto szereg substratów (glicyna, jabłczan) utlenianych jest preferencyjnie na świetle przez mitochondria roślinne w porównaniu z NADH [29, 30]. Tak więc wydaje się, że *in vivo* utlenianie NADH cytosolowego jest na dość niskim poziomie i zachodzi głównie przy udziale drogi cytochromowej. Aczkolwiek nie jest wykluczone, że przy dużym wroście stężenia NAD(P)H w cytosolu udział w jego utlenianiu zewnętrznej dehydrogenazy NAD(P)H może się zwiększać.

II-2. Wewnętrzne dehydrogenazy NADH

Źródłem NADH wewnątrz mitochondriów jest głównie cykl Krebsa, dehydrogenaza jabłczanowa dekarboksylująca, oksydaza glicyny oraz system przenoszący NADH/NAD z cytosolu. NADH wytwarzane wewnątrz mitochondriów może być utleniane przez jedną z dwóch dehydrogenaz NADH łańcucha oddechowego (Ryc. 1) lub transportowane na zewnątrz mitochon-

driów przez przenośnik jabłczan/szczawiooctan obecny w błonie mitochondrialnej [31, 32].

Jeśli różne enzymy wytwarzające NADH w matriks miałyby taki sam dostęp do dehydrogenaz łańcucha oddechowego, trudno byłoby zrozumieć w pewnych warunkach tzw. preferencyjne utlenianie poszczególnych substratów np. glicyny, jabłczanu [33, 34]. Przypuszcza się, że poszczególne enzymy redukujące NAD mogą znajdować się w sąsiedztwie odpowiednich dehydrogenaz łańcucha oddechowego i tworzyć kompleksy zwane metabolonami [35].

Stosunek NADH/NAD w cytosolu w czasie fotosyntezy, jest około 70-krotnie niższy niż wewnątrz mitochondriów podczas utleniania substratowego w stanie 3 [36]. Wskazuje to na ścisłą regulację transportu NADH z matriks mitochondriów do cytosolu zabezpieczającą w matriks właściwe stężenie NADH niezbędne do wytwarzania ATP w łańcuchu oddechowym.

NADH w matriks może być utleniane przez dwie dehydrogenazy — dehydrogenazę NADH kompleksu I, hamowaną przez rotenon i związaną z syntezą ATP, lub dehydrogenazę nie hamowaną przez rotenon i nie uczestniczącą w przemieszczaniu protonów w poprzek błony (brak syntezy ATP). Obie wewnętrzne dehydrogenazy NADH badano w tzw. pęcherzykach błon mitochondrialnych, w których błona wewnętrzna była odwrócona na zewnątrz. Otrzymuje się je poprzez sonifikację mitochondriów przy wysokim stężeniu soli, a następnie poprzez wirowanie różnicowe [15, 37-39].

II-2.1. Dehydrogenaza NADH (hamowana przez rotenon), kompleks I

Dehydrogenaza NADH związana z kompleksem I jest bardzo podobna do dehydrogenazy kompleksu I w mitochondriach zwierzęcych [10]. Kompleks I niedawno wyizolowano i oczyszczono z mitochondriów buraka czerwonego [40]. Jest to duży kompleks białkowy o ciężarze 680 kDa [10] lub 400 kDa [40], składający się z co najmniej 6 polipeptydów i zawierający flawinę [41-43]. K_m dla NADH wynosi 8 μM [5], wskazuje to na znacznie wyższe powinowactwo do NADH niż dehydrogenazy niewrażliwej na rotenon.

II-2.2. Dehydrogenaza NADH niewrażliwa na rotenon

Obecność wewnętrznej dehydrogenazy NADH niewrażliwej na rotenon i rola jaką pełni w przenoszeniu elektronów była dyskutowana przez wiele lat. Zasadniczą trudnością w badaniach jest brak specyficznego inhibitora tej dehydrogenazy albowiem zewnętrzna dehydrogenaza NADH również nie jest hamowana przez rotenon [5, 10]. Wewnętrzna dehydrogenaza NADH niewrażliwa na rotenon została wyizolowana z buraka czerwonego, jest ona prawdopodobnie dime-

rem składającym się z dwóch identycznych jednostek o masie 43 kDa [10].

W odróżnieniu od dehydrogenazy kompleksu I, dehydrogenaza niewrażliwa na rotenon wykazuje niskie powinowactwo do NADH [8, 9], a więc może działać tylko, gdy stężenie NADH w matriks jest wysokie ($K_m = 80 \mu\text{M}$), podczas gdy K_m dehydrogenazy NADH kompleksu I jest 10-krotnie niższe, a więc może działać przy bardzo niskim stężeniu NADH w matriks [44]. Wysokie stężenie NADH może występować w matriks, gdy zwiększa się aktywność enzymów cyklu Krebsa lub utlenianie jabłczanu przez obecną w mitochondriach roślinnych dehydrogenazę jabłczanową dekarboksylującą oraz przy dużej aktywności przenośnika jabłczan/szczawiooctan. L a n c e [45] sugerował powiązanie działania dehydrogenazy jabłczanowej dekarboksylującej (wytwarzającej wewnątrz mitochondriów pirogronian i NADH) z dehydrogenazą niewrażliwą na rotenon i oksydazą alternatywną. W ten sposób, w matriks, przy wysokim poziomie NADH jego utlenianie mogłoby się odbywać bez syntezy ATP. Obecnie wydaje się jednak, że przyczyną obserwowanej niewrażliwości oddychania na cyjanek przy wysokim stężeniu NADH w matriks jest stymulacja oksydazy alternatywnej przez pirogronian wytwarzany przez dehydrogenazę jabłczanową dekarboksylującą.

Rola fizjologiczna dehydrogenazy NADH niewrażliwej na rotenon nie jest do tej pory wyjaśniona, być może działa ona tylko *in situ* [10, 39].

III. Oksydaza alternatywna

Jedną z najdawniej poznanych, charakterystycznych cech roślinnego łańcucha oddechowego, jest obecność końcowej oksydazy alternatywnej, która katalizuje przeniesienie elektronów z ubichinonu na tlen, z pominięciem łańcucha cytochromowego (Ryc. 1). Oksydaza ta jest nazywana również oksydazą niewrażliwą na cyjanek, drogą niewrażliwą na cyjanek i odpowiedzialna jest za tzw. oddychanie cyjanoodporne. Tego typu oddychanie obserwowane było u roślin już od początku stulecia. Najlepiej scharakteryzowana jest rola fizjologiczna oddychania cyjanoodpornego u roślin z rodziny *Araceae*, u których oddychaniu podczas procesu kwitnienia towarzyszy wydzielanie dużych ilości ciepła [46-48]. Artykuł poświęcony charakterystyce biochemicznej i roli fizjologicznej oksydazy alternatywnej opublikowany był w „*Postęпах Biochemii*” [49].

III-1. Charakterystyka oksydazy alternatywnej

Pomimo wielu prób, do tej pory metodami biochemicznymi, nie udało się wyizolować oksydazy alternatywnej. Częściowo oczyszczony enzym uzyskano z kolb *Arum maculatum*, *Sauromatum guttatum* oraz *Symplocarpus foetidus* [50-56]. Przyczyną braku sukcesów jest po pierwsze trudność uwolnienia kom-

pleksu oksydazy alternatywnej z błony mitochondrialnej, a ponadto brak odpowiedniego donora elektronów dla oksydazy alternatywnej *in vitro* (zastępującego kompleks I lub II *in vivo*). Z niewiadomych przyczyn durochinol, który jest dobrym donorem elektronów dla oksydazy alternatywnej wyizolowanej z *Araceae*, ma bardzo słabą aktywność dla oksydazy alternatywnej izolowanej z roślin nietermogennych [5, 56]. Oczywiście ograniczenie badań powoduje więc konieczność wykorzystania roślin z rodziny *Araceae*, które kwitną tylko raz w roku. Ponadto uwolniona z błon oksydaza alternatywna jest bardzo niestabilna, w ciągu 12-24 godz. wykazuje w temp. 0°C znaczny spadek aktywności [4, 53]. Jedną z przyczyn tej niestabilności jest prawdopodobnie wysoka aktywność proteazy sulfhydrylowej w tkance *Araceae* [56]. Wszystkie te trudności sprawiły, że do tej pory nie udało się uzyskać, metodami biochemicznymi, homogennego preparatu oksydazy alternatywnej.

Oksydaza alternatywna wyizolowana z *Arum maculatum* lub *Sauromatum guttatum* czy też z *Symplocarpus foetidus* jest kompleksem małych białek [53-56]. Wyizolowanie z *Sauromatum guttatum* i nieznaczne oczyszczenie oksydazy alternatywnej pozwoliło Elthonowi i McIntoshowi otrzymać przeciwciała mono i poliklonalne dla oksydazy alternatywnej, które okazały się specyficzne dla trzech polipeptydów 37, 36 i 35 kDa [54, 55, 57]. Zapoczątkowało to badania oksydazy alternatywnej z zastosowaniem technik biologii molekularnej [6, 58]. Przeciwciała te wykazywały krzyżową aktywność ze wszystkimi roślinami posiadającymi aktywność oksydazy alternatywnej, mogły więc służyć jako sondy molekularne do jej wykrywania [59-63]. Przeciwciała te użyto do wyizolowania i zsekwencjonowania pojedynczego klonu cDNA dla oksydazy alternatywnej z *Sauromatum guttatum*, *Arabidopsis thaliana* oraz tytoniu [64-66]. Wykazano, że aktywność oksydazy alternatywnej i związane z nią oddychanie niewrażliwe na cyjanek jest wynikiem działania jednego genu jądrowego [64]. Zaproponowano strukturę białka oksydazy alternatywnej jako dimeru, w którego skład, w zależności od rośliny, mogą wchodzić białka o ciężarze od 32-39 kDa [5, 6, 58]. Częsteczką oksydazy alternatywnej umieszczona jest w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, końce C łańcucha polipeptydowego znajdują się po stronie matriksa, a S heliks po stronie przestrzeni międzybłonowej [6, 67]. Dimer połączony jest mostkiem disiarczkowym, w formie utlenionej jest on mniej aktywny niż w formie zredukowanej. Stan redukcji/utlenienia mostka disiarczkowego reguluje więc V_{maks} oksydazy alternatywnej [6, 68].

Już od dawna obserwowano, że w wyizolowanych mitochondriach aktywność oksydazy alternatywnej jest różna w zależności od substratu, najwyższe aktywności obserwowano z jabłczanem i bursztynianem, a najniższe z NADH [24]. Różnice te mogą zanikać po dodaniu α -keto kwasów organicznych [69]. W mito-

chondriach soi niewielka aktywność oksydazy alternatywnej obserwowana z bursztynianem może być znacznie stymulowana przez pirogronian [70]. Kwas pirogronowy jest efektem obniżającym K_m oksydazy alternatywnej w stosunku do ubichinolu [6, 71]. Aktywność oksydazy alternatywnej wzmacnia również wytwarzanie pirogronianu wewnątrz mitochondriów podczas utleniania bursztynianu lub jabłczanu [70]. Wydaje się więc, że w izolowanych mitochondriach różnice aktywności oksydazy alternatywnej przy różnych substratach można tłumaczyć odmienną ich zdolnością do wytwarzania endogenego pirogronianu. Dopływ pirogronianu z glikolizy aktywuje drogę alternatywną, podobnie jak wytwarzanie pirogronianu wewnątrz mitochondriów np. przez enzym jabłczanowy [69]. Tłumaczy to, jak się zdaje, zaobserwowane wcześniej powiązanie aktywności enzymu jabłczanowego w mitochondriach z działaniem oksydazy alternatywnej [72].

W transgenicznym tytoniu z zwiększoną ekspresją białka oksydazy alternatywnej, mitochondria wyizolowane z liści, wykazywały stosunkowo niską aktywność drogi alternatywnej, aktywność ta zwiększała się dopiero po dodaniu czynnika redukującego i pirogronianu [73]. W mitochondriach tych duża część białka oksydazy alternatywnej była w postaci związanego kowalencyjnie utlenionego (mniej aktywnego) dimeru, dodanie zaś czynnika redukującego (DTT), jak również izocytrynianu i jabłczanu powodowało redukcję białka oksydazy alternatywnej do związanego niekowalencyjnie (bardziej aktywnego) dimeru. Przypuszcza się, że czynnikiem regulującym stan utlenienia/redukcji dimeru oksydazy alternatywnej mogłaby być nie tioredoksyna [6, 68], ale przede wszystkim NADPH powstający wewnątrz mitochondriów [73]. W procesie izolowania mitochondriów dimer może ulegać utlenieniu, dlatego wydaje się, że oksydaza alternatywna może być dużo bardziej aktywna *in vivo* niż w wyizolowanych mitochondriach. W tkance ponadto stan utlenienia/redukcji białka oksydazy alternatywnej może podlegać regulacji poprzez zmienną ilość siły redukcyjnej wytwarzanej wewnątrz mitochondriów [68, 73].

Końcowym produktem redukcji tlenu przez oksydazę alternatywną jest woda [6, 49, 74]. Oksydaza alternatywna ma mniejsze powinowactwo do tlenu niż oksydaza cytochromowa (K_m dla O_2 oksydazy alternatywnej wynosi 10-20 μM , podczas gdy oksydazy cytochromowej 0.1-0.6 μM [75]). Jednakże w zakresie stężeń tlenu (100-200 μM) używanych do pomiaru oddychania, aktywność oksydazy alternatywnej jest praktycznie niezależna od stężenia tlenu [5].

Od dawna sugeruje się obecność w centrum aktywnym oksydazy alternatywnej żelaza związanego niechemowo [6, 49, 76]. Jednak żadna z dotychczasowych analiz wyizolowanego białka oksydazy alternatywnej nie potwierdziła w sposób jednoznaczny obecności żelaza [5]. Ostatnio zaproponowano hipotetyczną strukturę centrum aktywnego oksydazy alternatywnej,

analogiczną do metalo-białka mono oksygenazy metanu [6, 77].

III-2. Regulacja przepływu elektronów przez drogę cytochromową i alternatywną

Do oznaczania udziału w oddychaniu drogi alternatywnej i cytochromowej używano metody *B a h r a* i *B o n n e r a* polegającej na miareczkowaniu aktywności obu dróg odpowiednio inhibitorami drogi alternatywnej (kwas salicylohydroksamowy) lub cytochromowej (cyjanek potasu) [49, 78-80]. Metoda ta znalazła zastosowanie nie tylko w odniesieniu do izolowanych mitochondriów, ale również do tkanek i całych roślin [80, 81].

Przy użyciu inhibitorów drogi alternatywnej i cytochromowej wykazano, że droga alternatywna działa przy wysyczonej drodze cytochromowej [78, 79]. Obie drogi rozgałęziają się na poziomie ubichinonu, mają jednak w stosunku do niego odmienne własności kinetyczne. Aktywność drogi cytochromowej zależna jest od stopnia redukcji ubichinonu w sposób liniowy, natomiast aktywność drogi alternatywnej nie wykazuje tej zależności i ujawnia się dopiero, gdy pula ubichinonu jest zredukowana powyżej 35-40% [82, 83]. Tylko u roślin termogennych zależność aktywności drogi alternatywnej od stopnia redukcji ubichinonu jest zależnością liniową [83].

Wyniki pomiarów voltametrycznych poziomu redukcji ubichinonu wykazały, że jego redukcja może być dwustopniowa [84]. Zaproponowano model regulacji przepływu elektronów przez pulę ubichinonu na drogę alternatywną, tlen reagowałby z oksydazą alternatywną, gdy osiągnie ona stan cztero elektronowej redukcji [84]. Potwierdzałoby to brak translokacji protonów przez oksydazę alternatywną [11], w przeciwieństwie do oksydazy cytochromowej działającej jako pompa protonowa [85].

Na stan redukcji ubichinonu wpływa aktywność dehydrogenaz łańcucha oddechowego. W większości doświadczeń w izolowanych mitochondriach wysycenie obu dróg oznaczano dodając jako substrat bursztynian [86, 87]. W tych warunkach droga cytochromowa prawdopodobnie nigdy nie osiąga stanu wysycenia, bo np. dodanie NADH jednocześnie z bursztynianem sprawia, że oddychanie poprzez drogę cytochromową, w tych samych mitochondriach, jest znacznie wyższe [88]. Ponadto oznaczenia aktywności obu dróg przy użyciu inhibitorów (tzw. miareczkowania inhibitorami) wykazały, że zahamowanie drogi alternatywnej może prowadzić do wzrostu oddychania drogą cytochromową [87, 88]. Wskazuje to na brak wysycenia drogi cytochromowej przy działającej drodze alternatywnej oraz na możliwość jednoczesnego przepływu elektronów przez obie drogi i współzawodnictwo o elektrony [86, 89]. Biorąc pod uwagę czynniki wpływające na aktywność oksydazy alternatywnej, wydaje się, że regulacja przepływu elektronów na

drogę alternatywną jest o wiele bardziej skomplikowana niż to początkowo przypuszczano. Pytanie o mechanizm regulacji stale czeka na odpowiedź.

III-3 Oznaczanie aktywności drogi alternatywnej

Opisane powyżej badania wykazały, że oznaczana przy użyciu inhibitorów aktywność drogi alternatywnej, zarówno w całych roślinach jak izolowanych mitochondriach, może być niższa niż występująca *in vivo* [87-89]. W izolowanych mitochondriach zarówno poziom pirogronianu jak i czynnika redukującego mostki disiarczkowe dimeru oksydazy alternatywnej może być różny od poziomu tych czynników w mitochondriach w tkance. Ponadto, pobieranie tlenu hamowane przez inhibitor drogi alternatywnej nie może być miarą jej aktywności *in vivo*, albowiem zahamowanie drogi alternatywnej może powodować przepływ elektronów na niewysyczoną drogę cytochromową. Przy użyciu inhibitorów można więc jedynie określać typ oddychania; np. cyjanoodporne lub wrażliwe na kwasy hydroksamowe (SHAM), podkreślając jednocześnie, że wartość tego oddychania ważna jest wyłącznie dla danych warunków eksperymentalnych (oddychanie w obecności inhibitora), może natomiast być różna w warunkach *in vivo*, (przy braku inhibitora) [87]. Wyrazem krytyki oznaczania aktywności oksydazy alternatywnej przy użyciu inhibitorów jest artykuł w dziale „viewpoints” jednego z ostatnich numerów *Plant Physiology* pod znamienym tytułem „Oksydaza niewrażliwa na cyjanek: hamować czy nie hamować, oto jest pytanie”. Konkluzja i odpowiedź na postawione w tytule pytanie brzmi — nie hamować, nie oznaczać aktywności oksydazy alternatywnej przy pomocy inhibitorów [90]. Wobec tego jak oznaczać aktywność drogi alternatywnej *in vivo*?

Ostatnio rozwinęła się technika oznaczania aktywności drogi alternatywnej poprzez oznaczenie stopnia dyskryminacji (tzn. nierównomiernie niższego) pobierania z powietrza izotopu $^{18}\text{O}_2$ w stosunku do $^{16}\text{O}_2$ [91-93]. Dyskryminacja pobierania $^{18}\text{O}_2$ przez drogę alternatywną jest większa niż przez drogę cytochromową. Stopień dyskryminacji pobierania przez drogę cytochromową wynosi 17,1-20%, natomiast przez drogę alternatywną 23,5-25,5%, wartości te w przypadku różnych roślin są nieco odmienne [91-93]. Przy zastosowaniu tej techniki wykazano, że w izolowanych mitochondriach soi w warunkach stanu 3 (w obecności ADP), po dodaniu pirogronianu, przy niskim poziomie redukcji ubichinonu, obie drogi współzawodniczą o zredukowaną pulę ubichinonu [93]. Zastosowanie do tych samych warunków tradycyjnej metody pomiaru oddychania elektrodą Clarka i użycie inhibitorów nie wykazało udziału drogi alternatywnej [93].

Wydaje się, że technika dyskryminacji pobierania izotopu tlenu jest obecnie jedyną wiarygodną i nieważną (bez użycia inhibitorów) metodą oznaczania *in vivo* udziału drogi alternatywnej w oddychaniu. Nie

ulega jednak wątpliwości, że jest nieco bardziej czasochłonna i wymagająca specyficznej aparatury (chromatograf gazowy, spektrometr masowy).

III-4. Rola fizjologiczna drogi alternatywnej

Rola fizjologiczna drogi alternatywnej jako procesu generującego ciepło wydaje się być bezsporna jedynie u *Araceae* [47]. U innych roślin poziom wytwarzania ciepła przez drogę alternatywną jest zbyt mały, aby miał jakiegokolwiek znaczenie fizjologiczne. Hipoteza „przelewu” (*overflow*) wysunięta przez Lambersa opisywała stany fizjologiczne w jakich może funkcjonować droga alternatywna, przy wysyceniu drożdży cytochromowej [94-96]. W pewnych warunkach (np. wzrost zawartości cukrów w komórce i wynikający z tego intensywniejszy ich przepływ przez szlak glikolityczny) może wystąpić brak równowagi pomiędzy oksydacyjnym metabolizmem węgla a możliwością przepływu elektronów przez łańcuch cytochromowy. Droga cytochromowa może być wysyciona przy spadku ADP, ograniczeniu aktywności jednego ze składników łańcucha oddechowego [66, 73, 79], lub przy deficycie Pi [97, 98]. Wtedy, przy zwiększonym metabolizmie oksydacyjnym, następuje uruchomienie drogi alternatywnej. Wydaje się jednak, że hipoteza ta musi ulec pewnej modyfikacji i uwzględnić udział drogi alternatywnej przy nie całkowitej wysyceniu drożdży cytochromowej, a także uwzględnić regulację aktywności drogi alternatywnej *in vivo* przez pirogronian i potencjał redukcyjny wewnątrz mitochondriów. Jak wykazały ostatnie badania, w izolowanych mitochondriach tytoniu, warunkiem uruchomienia drogi alternatywnej jest spadek poziomu ADP, wzrost siły redukcyjnej wewnątrz mitochondriów, (niezbędnej do redukcji wiązania disiarczowego) oraz obecność pirogronianu (potrzebna do stymulacji zredukowanej formy oksydazy alternatywnej) [73].

Inną interesującą hipotezą opisującą rolę fizjologiczną oksydazy alternatywnej jest jej udział w regulacji poziomu ponadtlenków i nadtlenków wodoru w tkance [87, 101]. Nadtlenki wodoru mogą odgrywać rolę w indukcji ekspresji genu oksydazy alternatywnej [87]. W warunkach stresu spowodowanego chłodem [99-101], inwazją pasożytów, zranieniem [96], czy też ograniczoną dostępnością fosforanu [97, 98] następuje uruchomienie oddychania niewrażliwego na cyjanek. Wtedy, przy ograniczonej aktywności drogi cytochromowej i zwiększonej redukcji ubichinonu, na terenie mitochondriów może dochodzić do wytwarzania ponadtlenku lub nadtlenku wodoru [101]. Sugeruje się, że udział w oddychaniu drogi alternatywnej może ograniczać ich wytwarzanie [87, 101]. Zaproponowana ostatnio hipoteza regulacji aktywności i indukcji oksydazy alternatywnej uwzględnia zarówno stymulację aktywności oksydazy alternatywnej przez kwasy organiczne zapobiegającą zwiększonej redukcji ubichinonu jak i udział nadtlenków w indukcji ekspresji genu

odpowiedzialnego za syntezę białka oksydazy alternatywnej [87]. Ta niezmiernie interesująca hipoteza jest obecnie testowana.

IV. Uwagi końcowe

W ciągu ostatnich pięciu lat techniki biologii molekularnej niewątpliwie bardzo posunęły naprzód badania nad strukturą i rolą fizjologiczną oksydazy alternatywnej. Dostępność przeciwciał oksydazy alternatywnej oraz klonów cDNA pozwala śledzić ekspresję oddychania niewrażliwego na cyjanek na poziomie RNA i białka z jednoczesnymi pomiarami gazometrycznymi (pobieranie tlenu). Otrzymanie roślin transgenicznych ze zwiększoną lub zmniejszoną ekspresją oksydazy alternatywnej umożliwi określenie jej roli w procesach wzrostu i rozwoju roślin.

Oznaczenie udziału w oddychaniu niesfosforylującej drogi alternatywnej oraz mechanizmów związanych z regulacją tego udziału ma ogromne znaczenie dla określenia wydajności energetycznej oddychania [102]. U pewnych roślin (*Lolium perenne*) obserwuje się negatywną korelację między wysokością plonowania a intensywnością oddychania. Może to być m.in. wynikiem różnej intensywności oksydacyjnej fosforylacji [95]. Wydaje się więc, że określenie udziału w oddychaniu drogi alternatywnej jest o wiele bardziej istotne niż to się do tej pory wydawało, a dotychczasowe wyliczenia wydajności energetycznej oddychania roślin *in vivo* mogą być na znacznie zaniżonym poziomie. Do tych zadań niezbędny jest rozwój nowych metod pozwalających na precyzyjne określenie udziału obu dróg, drogi alternatywnej i cytochromowej w oddychaniu roślin.

Napisanie tego artykułu było możliwe dzięki sfinansowaniu przez Grant KBN 6P2043705 uczestnictwa autorki w Konferencji „Plant Mitochondria from Gene to Function”.

Artykuł otrzymano 6 lutego 1996 r.

Zaakceptowano do druku 20 marca 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Hryniewiecka L (1993) *Post Biol Komórki* 20: 181-199
2. Douce R, Brouquisse R, Journet E-P (1987) W: Davies D.D (red) *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, t 11 Academic Press, San Diego, Ca, str. 177-221
3. Douce R (1985) W: *Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function, and Biogenesis*. Academic Press, Orlando, Florida
4. Douce R, Neuburger M (1989) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 371-414
5. Moore AL, Siedow JN (1991) *Biochim Biophys Acta* 1059: 121-140
6. Siedow JN, Umbach AL (1995) *Plant Cell* 7: 821-831
7. Palmer JM, Möller IM (1982) *Trends Biochem Sci* 7: 258-261
8. Palmer JM, Ward JA (1985) *Encycl Plant Physiol* 18: 173-201
9. Möller IM, Lin W (1986) *Annu Rev Plant Physiol* 37: 309-334
10. Möller IM, Rasmusson AG, Fredlund KM (1993) *J Bioenerg Biomembranes* 25: 377-384

11. Moore AL, Bonner WD, Rich PR (1978) *J Exp Bot* **29**: 1-12
12. Cottingham IR, Moore AL (1983) *Biochim Biophys Acta* **724**: 191-200
13. Elthon TE (1995) Referat na Konferencji „Plant Mitochondria” From Gene to Function” Duke University, Durham, N.C. USA
14. Möller IM, Palmer JM (1981) *Biochim Biophys Acta* **638**: 22-233
15. Möller IM, Palmer JM (1981) *Physiol Plant* **53**: 413-420
16. Möller IM, Palmer JM, Johnston SP (1983) *Biochim Biophys Acta* **725**: 289-297
17. Edman K, Ericson I, Möller IM (1985) *Biochem J* **232**: 471-477
18. Kurkdjian A, Guern J (1989) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 271-303
19. Soole KL, Dry IB, Wiskich JT (1990) *Physiol Plant* **78**: 205-210
20. Möller IM, Johnston SP, Palmer JM (1981) *Biochem J* **194**: 487-495
21. Cook ND, Cammack R (1984) *Eur J Biochem* **141**: 573-577
22. Cottingham IR, Moore AL (1984) *Biochem J* **224**: 171-179
23. Rugolo M, Zannoni D (1992) *Plant Physiol* **99**: 1037-1043
24. Lance C, Chauveau M, Dizengremel P (1985) *Encycl Plant Physiol* **18**: 202-247
25. Gardeström P, Edwards GE (1983) *Plant Physiol* **71**: 24-29
26. Huq S, Palmer JM (1978) *Plant Sci Lett* **11**: 351-358
27. Hemrika-Wagner AM, Gude H, Marissen N, Van der Plas LHW, Verleur J.D. (1986) *Plant Cell Physiol* **27**: 499-503
28. Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U (1991) *Plant Physiol* **95**: 1131-1137
29. Dry IB, Day DA, Wiskich JT (1983) *FEBS Lett* **158**: 154-158
30. Bergman A, Ericson I (1983) *Physiol Plant* **59**: 421-427
31. Ebbighausen H, Chen J, Heldt HW (1985) *Biochim Biophys Acta* **810**: 184-189
32. Oliver DJ, Walker GH (1984) *Plant Physiol* **76**: 409-413
33. Day DA, Neuburger M, Douce R (1985) *Austr J Plant Physiol* **12**: 119-130
34. Dry IB, Wiskich JT (1985) *Austr J Plant Physiol* **12**: 329-339
35. Wiskich JT, Bryce JH, Day DA, Dry IB (1990) *Plant Physiol* **93**: 611-616
36. Krömer S, Heldt HW (1991) *Biochim Biophys Acta* **1057**: 42-50
37. Möller IM, Liden AC, Ericson I, Gardeström P (1987) *Methods in Enzymol* **148**: 442-453
38. Petit PX, Gardeström P, Rasmusson AG, Möller IM (1991) *Plant Sci* **78**: 177-183
39. Rasmusson AG, Möller IM (1991) *Physiol Plant* **83**: 357-365
40. Soole KL, Dry IB, Wiskich JT (1992) *Plant Physiol* **98**: 588-594
41. Cottingham IR, Cleeter MWJ, Ragan CI, Moore AL (1986) *Biochem J* **236**: 201-207
42. Cottingham IR, Moore AL (1988) *Biochem J* **254**: 303-305
43. Chen S, Guillory PJ (1981) *J Biol Chem* **256**: 8318-8323
44. Möller IM, Palmer JM, Johnston SP (1983) *Biochim Biophys Acta* **725**: 289-297
45. Lance C, Rustin P (1984) *Physiol Veg* **22**: 625-641
46. Meeuse BJD (1975) *Annu Rev Plant Physiol* **26**: 117-126
47. Ordentlich A, Linzer RA, Raskin I (1991) *Plant Physiol* **97**: 1545-1550
48. Rhoads DM, McIntosh L (1992) *Plant Cell* **4**: 1131-1139
49. Rychter AM (1982) *Post Biochem* **28**: 89-111
50. Huq S, Palmer JM (1978) *FEBS Lett* **95**: 217-220
51. Rich PR (1978) *FEBS Lett* **96**: 252-256
52. Bonner WD, Rich PR (1983) **72**: S-19
53. Bonner WD, Clarke SD, Rich PR (1986) *Plant Physiol* **80**: 838-842
54. Elthon TE, McIntosh L (1986) *Plant Physiol* **82**: 1-6
55. Elthon TE, McIntosh L (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8399-8403
56. Berthold DA, Siedow JN (1993) *Plant Physiol* **101**: 113-119
57. Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L (1989) *Plant Physiol* **89**: 1311-1317
58. McIntosh L (1994) *Plant Physiol* **105**: 781-786
59. Hiser C, McIntosh L (1990) *Plant Physiol* **93**: 312-318
60. Lambowitz AM, Sabourin JR, Bertrand H, Nickels R, McIntosh L (1988) *Mol Cell Biol* **9**: 1362-1364
61. Obenland D, Diethelm R, Dhibles R, Stewart C (1990) *Plant Cell Physiol* **31**: 897-901
62. Kearns A, Whelan J, Young S, Elthon TE, Day DA (1992) *Plant Physiol* **99**: 712-717
63. Sakajo S, Minagawa N, Komiyama T, Yoshimoto A (1991) *Biochim Biophys Acta* **1090**: 102-108
64. Rhoads DM, McIntosh L (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2122-2126
65. Kumar AM, Soll D (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10842-10846
66. Vanlerberghe GC, McIntosh L (1994) *Plant Physiol* **105**: 867-874
67. Siedow JN, Whelan J, Kearns A, Wiskich JT, Day DA (1992) W: Lambers H, van der Plas LHW (red) Molecular, Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration. Academic Press, The Hague, The Netherlands, str 19-27
68. Umbach AL, Siedow JN (1993) *Plant Physiol* **103**: 845-854
69. Wagner AM, Kraak MS, van Emmerik WAM, van der Plas LHW (1989) *Physiol Plant* **27**: 837-845
70. Millar AH, Wiskich JT, Whelan J, Day DA (1993) *FEBS Lett* **329**: 259-262
71. Day DA, Millar AH, Wiskich JT, Whelan J (1994) *Plant Physiol* **106**: 1421-142
72. Rustin P, Moreau F, Lance C (1980) *Plant Physiol* **66**: 457-462
73. Vanlerberghe GC, Day DA, Wiskich JT, Vanlerberghe AE, McIntosh L (1995) *Plant Physiol* **109**: 353-361
74. Kay CJ, Palmer JM (1985) *Biochem J* **228**: 309-318
75. Ribas-Carbo M, Berry JA, Azcon-Bieto J, Siedow JN (1994) *Biochim Biophys Acta* **1188**: 205-212
76. Schonbaum GR, Bonner WD, Storey BT, Bahr JT (1971) *Plant Physiol* **47**: 124-128
77. Siedow JN, Umbach AL, Moore AL (1995) *FEBS Lett* **362**: 10-14
78. Bahr JT, Bonner WD (1973) *J Biol Chem* **248**: 3441-3445
79. Bahr JT, Bonner WD (1973) *J Biol Chem* **248**: 3446-3450
80. Möller IM, Berczi A, van der Plas LHW, Lambers H (1988) *Physiol Plant* **72**: 642-649
81. Theologies A, Laties GG (1978) *Plant Physiol* **62**: 232-237
82. Dry IB, Moore AL, Day DA, Wiskich JT (1989) *Arch Biochem Biophys* **273**: 148-157
83. Day DA, Dry IB, Soole KL, Wiskich JT, Moore AL (1991) *Plant Physiol* **95**: 948-953
84. Siedow JN, Moore AL (1993) *Biochim Biophys Acta* **1142**: 165-174
85. Babcock GT, Wikström M (1992) *Nature (Lond)* **356**: 301-309
86. Wagner AM, Wagner MJ (1995) *Plant Physiol* **108**: 277-283
87. Wagner AM, Krab K (1995) *Physiol Plant* **95**: 318-325
88. Hoefnagel MHN, Millar AH, Wiskich JT, Day DA (1995) *Arch Biochem Biophys* **318**: 394-400
89. Atkin OK, Villar R, Lambers H (1995) *Plant Physiol* **108**: 1179-1183
90. Day DA, Krab K, Lambers H, Moore AL, Siedow JN, Wagner AM, Wiskich JT (1996) *Plant Physiol* **110**: 1-2
91. Weger HG, Guy RD, Turpin DH (1990) *Plant Physiol* **93**: 356-360
92. Robinson SA, Yakir D, Ribas-Carbo M, Giles L, Osmond CB, Siedow JN, Berry JA (1992) *Plant Physiol* **100**: 1087-1091
93. Ribas-Carbo M, Berry JA, Yakir D, Giles L, Robinson SA, Lennon AM, Siedow JN (1995) *Plant Physiol* **109**: 829-837
94. Lambers H (1982) *Physiol Plant* **55**: 478-485

95. Lambers H (1980) *Plant Cell and Environment* 3: 293-302
 96. Lambers H (1985) W: Douce R, Day DA (red.) *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, t. 18 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str 418-473
 97. Rychter AM, Mikulska M (1990) *Physiol Plant* 79: 663-667
 98. Rychter AM, Chauveau M, Bomsel J-L, Lance C (1992) *Physiol Plant* 84: 80-86
 99. Rychter AM, Cieřla E, Kacperska A (1988) *Physiol Plant* 73: 299-304
 100. Vanlerberghe G C, McIntosh L (1992) *Plant Physiol* 100: 115-119
 101. Purvis AC, Shewfelt RL (1993) *Physiol Plant* 88: 712-718
 102. Moore AL, Leach G, Whitehouse DG, van der Bergen C, Wagner A, Krab H (1994) *Biochim Biophys Acta* 1187: 145-151

Sterowana biosynteza antybiotyków poliketydowych

Engineered biosynthesis of polyketide antibiotics

KATARZYNA KUCZEK¹,
 MAGDALENA KOTOWSKA²,
 MARIAN MORDARSKI³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Syntazy poliketydowe
- III. Geny syntaz poliketydowych
- IV. Próby sterowania biosyntezą
 - IV-1. Badanie mutantów zablokowanych na poszczególnych etapach biosyntezy
 - IV-2. Heterologiczna ekspresja genów
 - IV-3. Badanie funkcji natywnego kompleksu syntazy podlegającego ekspresji w komórkach *Escherichia coli*
 - IV-4. Badanie funkcji wyselekcjonowanego zespołu enzymów PKS w układzie pozakomórkowym
 - IV-5. Analiza sekwencji genów
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Polyketide synthases
- III. Genes of polyketide synthases
- IV. Attempts of programming of biosynthesis
 - IV-1. Investigation of mutants blocked on different stages of biosynthesis
 - IV-2. Heterologous gene expression
 - IV-3. Investigation of synthase complex expressed in *Escherichia coli*
 - IV-4. Investigation of enzyme complex in cell free systems
 - IV-5. Gene sequence analysis
- V. Concluding remarks

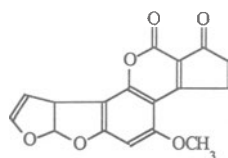
Wykaz stosowanych skrótów: PKS — syntaza poliketydowa; minPKS — minimalny zestaw genów syntazy; DEBS — syntaza 6-dezoksyerytronolidu B; SU — jednostka syntazy; AT — acylotransferaza; ACP — białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe; KS — syntaza β -ketoacylowa; KR — ketoreduktaza; DH — dehydrogenaza; ER — enoiloreduktaza; TE — tioesteraza; CLF — czynnik determinujący długość łańcucha; ARO — aromataza; CYC — cyklaza; MT — 0-metylotransferaza.

I. Wstęp

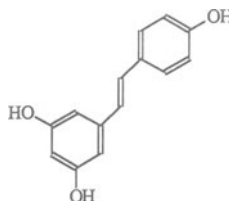
Nazwa „poliketydy” oznacza klasę związków wytwarzanych w wyniku szeregu reakcji kondensacji reszt acylowych krótkich kwasów karboksylowych oraz reakcji ich redukcji w sposób podobny do syntezy kwasów tłuszczowych. Jest to heterogenna grupa

związków, do której zalicza się roślinne flawonoidy, toksyny grzybowe oraz liczne związki pochodzenia bakteryjnego [1-3] (Ryc. 1). Wiele z nich wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe, a nawet toksyczne wobec pasożytów przewodu pokarmowego kręgowców [3-7]. Niektóre poliketydy pochodzenia grzybowego i bakteryjnego odgrywają rolę regulatorów wzrostu i różnicowania komórki [8]. Funkcja biologiczna większości z nich nie jest jednak znana. Bogatym źródłem poliketydów są promieniowce — Gram-dodatnie bakterie glebowe. Charakteryzują się złożonym cyklem rozwojowym, podczas którego wytwarzają wiele metabolitów wtórnych, m.in. związków poliketydowych. Najbardziej znanymi z tej grupy są antybiotyki makrolidowe oraz tetracykliny. Należą do nich ponadto: antracykliny, polieny, polietyry oraz pochodne chinonowe [9]. Badania dotyczące mechanizmu biosyntezy poliketydów zmierzają do utworzenia kontrolowane-

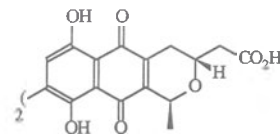
¹Dr, ²mgr inż., ³prof., Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław.



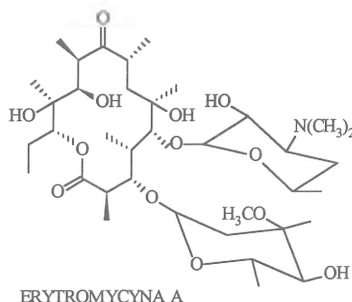
AFLATOKSYNA B1



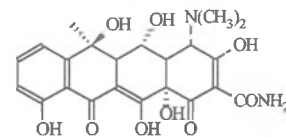
STILBEN



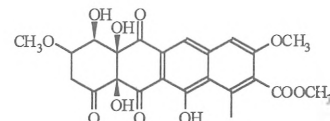
AKTYNORODYNA



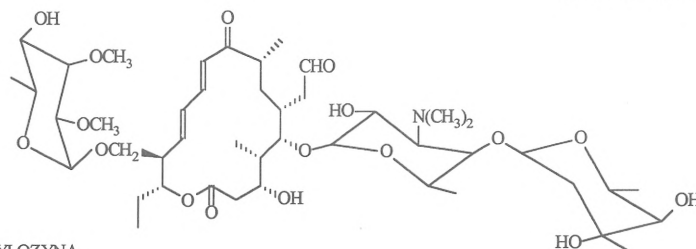
ERYTROMYCINA A



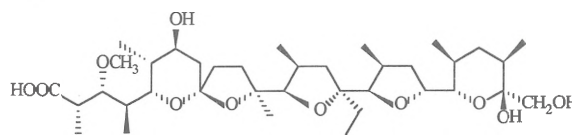
OKSYTETRACYKLINA



TETRACENOMYCINA C



TYLOZYNA



MONENZYNA A

Ryc. 1 Struktury związków poliketydowych: stilben — poliketydowy prekursor fitoaleksyn (związków pochodzenia roślinnego); aflatoksyna B1 — toksyna *Aspergillus flavus oryzae*; tetracenomycyna C — związek o aktywności przeciwnowotworowej wytwarzany przez *Streptomyces glaucescens*; aktynorodyna, erytromycyna A, monenzyna A, oksytetracyklina i tylozyna — antybiotyki wytwarzane przez różne szczepy *Streptomyces*.

go układu dostarczającego związków o zaprogramowanej strukturze.

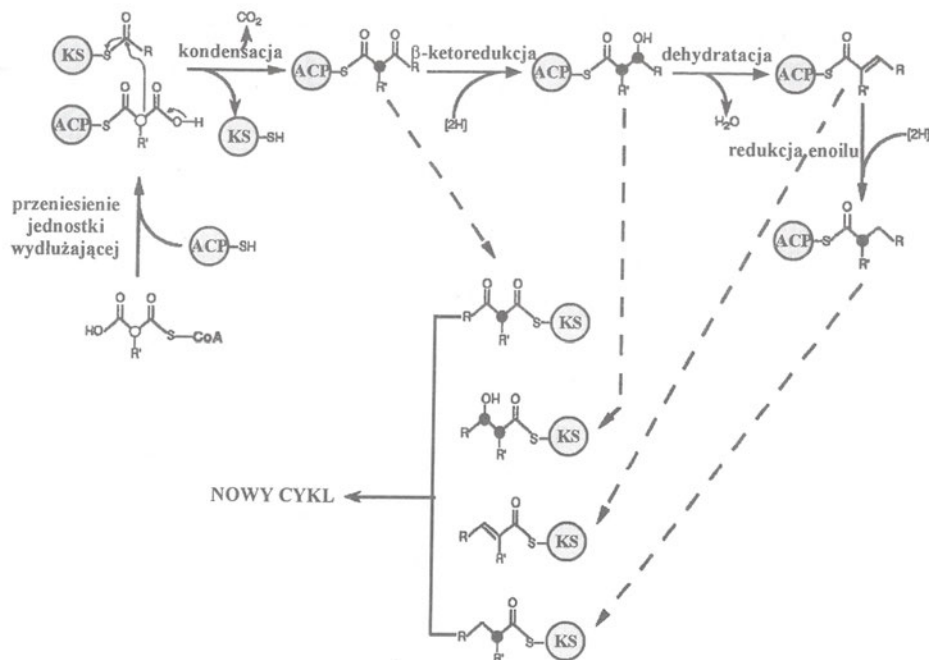
II. Syntazy poliketydowe

Wszystkie syntazy poliketydowe (PKS) są pod względem budowy i mechanizmu działania podobne do syntazy kwasów tłuszczowych. Są to wielofunkcyjne zespoły enzymatyczne. Katalizują powtarzające się dekarboksylacyjne kondensacje (Claisena) między acylo tioestrami koenzymu A: acetylowym, propionylowym, malonylowym lub metylomalonylowym. Rzadziej między estrami innych krótkich kwasów karboksylowych a acylo tioestrami połączonymi z cysteiną centrum aktywnego enzymu kondensującego [9] (Ryc 2). Produkty kondensacji uzyskują zróżnicowanie strukturalne w wyniku przejścia przez cały, lub tylko część cyklu redukcyjnego, który obejmuje reakcje: ketoredukcji, dehydratacji i redukcji enoilu przy grupie β -ketonowej rosnącego łańcucha poliketydowego. Łańcuch węglowy o długości charakterystycznej dla

specyficznego produktu zostaje uwolniony z syntazy wskutek hydrolizy reszty acylowej (tiolizy). Długość łańcucha węglowego i wybór reszt acylowych budujących łańcuch dodatkowo wpływają na olbrzymie zróżnicowanie strukturalne naturalnie występujących poliketydów. Szkielet poliketydowy najczęściej nie jest ostatecznym produktem i ulega dalszym przemianom, tzw. modyfikacjom post-poliketydowym, co również zwiększa różnorodność powstających związków. Do tych reakcji należą: cyklizacja, tworzenie pierścieni aromatycznych, laktonowych, glikozylacja, metylacja, utlenienie.

Związki poliketydowe można zaliczyć do dwóch typów strukturalnych — poliketydy aromatyczne oraz o strukturze złożonej. Odzwierciedleniem tego podziału są dwa różne typy organizacji kompleksów enzymatycznych syntazy.

Typ I stanowi jeden lub kilka dużych polipeptydów. Każdy z nich to multifunkcyjny enzym analogiczny do eukariotycznej syntazy kwasów tłuszczowych i syntazy kwasu 6-metylosalicylowego *Penicillium patulum*



Ryc. 2 Schemat syntezy poliketydów (wg [9], reprodukcja za zgodą *Annu Rev Inc*). Asymetryczne atomy węgla oznaczono kółkiem. Zmiana koloru z białego na czarny oznacza inwersję konfiguracji. ACP — białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe, KS — syntaza β-ketoacylowa.

[10]. Wielofunkcyjny polipeptyd składa się z powtórzonych regionów, zwanych jednostkami syntazy (*synthase units* – *SU*), katalizujących kolejne cykle redukcyjne. Każda jednostka skupia centra katalityczne poszczególnych reakcji doprowadzających do kondensacji i całkowitej lub częściowej redukcji powstającego łańcucha. Wszystkie *SU* zawierają syntazę β-ketoacylową (*KS*), acylotransferazę (*AT*) i białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe (*ACP*), różnią się liczbą domen ketoreduktazy (*KR*), dehydrogenazy (*DH*) i enoiloreduktazy (*ER*). Domeną kończąca syntezę szkieletu poliketydowego jest tioesteraza (*TE*). Każde centrum aktywne jest wykorzystywane tylko raz podczas syntezy jednej cząsteczki produktu.

Do typu I zaliczana jest m.in. syntaza aglikonowej części makrolidu — erytromycyny *Saccharopolyspora erythraea* oraz inne makrolidowe syntazy promieniowców i awermektyny *Streptomyces avermitilis*, tylozyny *Streptomyces fradiae*, spiramycyny *Streptomyces ambofaciens* oraz karbomycyny *Streptomyces thermotolerans* [11-13].

Syntaza typu II stanowi kompleks kilku zasocjowanych enzymów, z których każdy jest wielokrotnie aktywny w ciągu syntezy jednego związku [9]. Te enzymy to *KS*, *AT*, *ACP*, czynnik determinujący długość łańcucha (*chain length determining factor* – *CLF*), *KR*, cyklaza (*CYC*) i aromataza (*ARO*). Do typu II należy syntaza kwasów tłuszczowych *Escherichia coli* oraz wszystkie znane syntazy aromatycznych poliketydów u promieniowców rodzaju *Streptomyces*.

Ze względów funkcjonalnych został wyróżniony trzeci typ syntazy, występujący wyłącznie u roślin wyższych. Charakteryzuje się on brakiem *ACP*. Jego funkcje przejmuje koenzym A zestryfikowany kwasami karboksylowymi [14, 15].

Genetyczne podstawy programowania struktury poliketydów były do niedawna całkowicie nieznane. Prowadzone obecnie w kilku ośrodkach badania zmie-

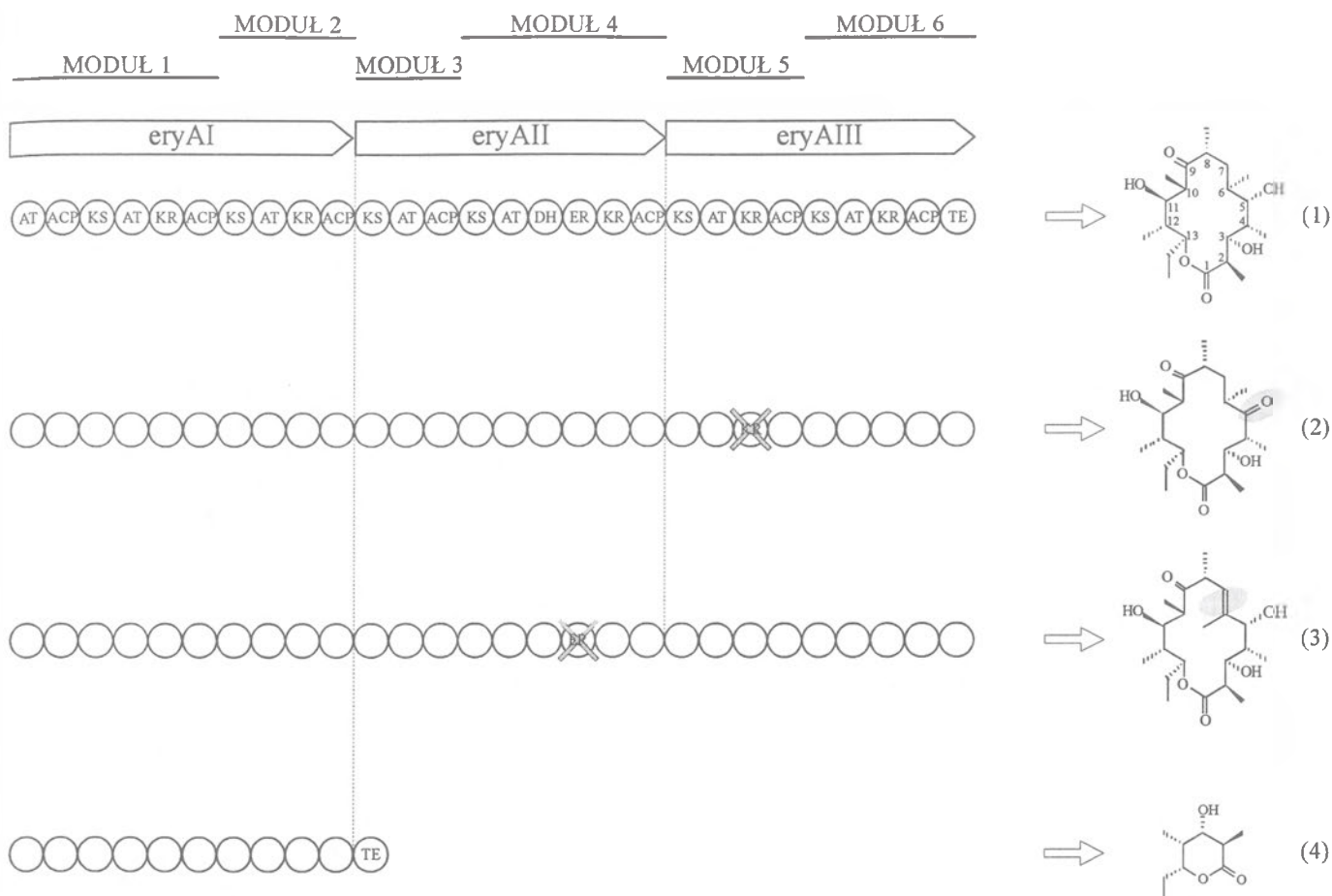
rzają do ich wyjaśnienia i wykorzystania w programowaniu syntezy nowych związków *in vivo*.

III. Geny syntaz poliketydowych

Wyodrębniono i sklonowano geny kilkunastu syntaz poliketydowych promieniowców. Geny każdego z dotychczas scharakteryzowanych zespołów syntaz są zgrupowane w jednym regionie genomu. Towarzyszą im geny oporności (jeśli poliketyd jest antybiotykiem) oraz geny enzymów wprowadzających postpoliketydowe modyfikacje w szkielecie związku.

W przypadku wszystkich zbadanych syntaz typu I geny są długimi jednostkami transkrypcyjnymi (ok. 10 tysięcy par zasad). Każda z nich koduje wszystkie enzymy uczestniczące kolejno w cyklach wydłużania i redukcji łańcucha węglowego. Pełną sekwencję nukleotydową poznano jedynie w przypadku genów syntazy dezoksyerytronolidu *B* (*6-deoxyerythronolide B synthase* – *DEBS*) czyli aglikonowej części erytromycyny *A*. Sekwencja ta obejmuje około 56 tys. par zasad tworzących trzy jednostki transkrypcyjne (otwarte ramki odczytu): *eryAI*, *eryAIII* i *eryAIII* (Ryc. 3). Każda ramka odczytu zawiera po dwa moduły, z których każdy koduje ciąg domen enzymatycznych składających się na jednostkę syntazy. Liczba modułów w zespole genów syntazy odpowiada liczbie cykli kondensacji i redukcji. Tak więc w zespole genów *DEBS* występują trzy jednostki transkrypcyjne skupiające po dwa moduły. Odpowiada to łącznie sześciu reakcjom kondensacji i towarzyszącym im redukcjom podczas syntezy erytromycyny. Ponadto, ciąg domen enzymatycznych kodowanych przez dany moduł odpowiada dokładnie kolejności reakcji, które zachodzą w określonym cyklu. Tak więc struktura i długość łańcucha poliketydów jest zaprogramowana przez liniową sekwencję genów [16].

Analiza DNA izolowanego z różnych szczepów



Ryc. 3 Organizacja genetyczna syntazy 6-dezokserytronolidu B (DEBS) i jej modyfikacje (wg [28], zmodyfikowano, reprodukcja za zgodą *Am Assoc Adv Sci*).

(1) — naturalny produkt DEBS, 6-dezokserytronolid B;

(2), (3), (4) produkty DEBS zmodyfikowanej przez, odpowiednio, delecję domeny KR z modułu 5, inaktywację domeny ER z modułu 4, przeniesienie domeny TE z modułu 6 na koniec modułu 2.

AT — acylotransferaza, ACP — białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe, KS — syntaza β -ketoacylowa, KR — ketoreduktaza, DH — dehydrogenaza, ER — enoiloreduktaza, TE — tioesteraza.

Streptomyces, kodującego enzymy biosyntezy innych makrolidów takich jak: tylozyna, spiramycyna, awermektyna, karbomycyna czy kandycydyna sugeruje podobną organizację molekularną. Zespoły genów biosyntezy tych makrolidów obejmują znacznie większy region genomu w porównaniu z zespołem erytromycyny: awermektyny — 95 tys. par zasad, tylozyny — 80 tys. pz i kandycydyny — 105 tys. pz.

W kompleksie syntazy typu II poszczególne enzymy są kodowane przez osobne geny. Ułożenie tych genów

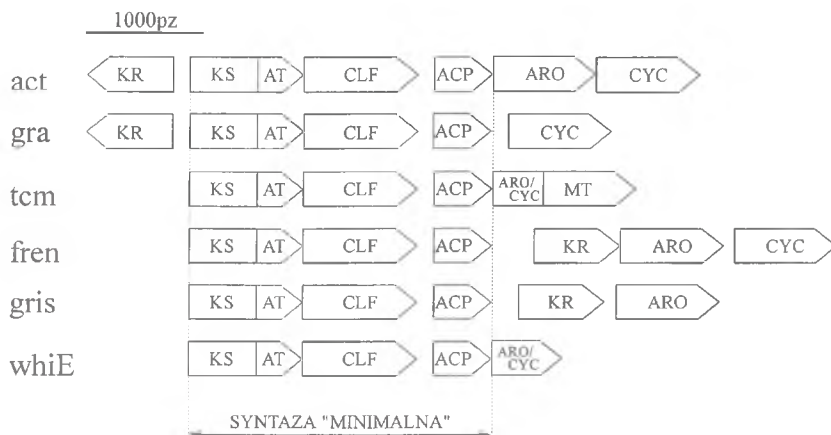
jest bardzo podobne we wszystkich syntazach (Ryc. 4). Geny różnych syntaz kodujące KS, AT, CLF i ACP mają niemal identyczną wielkość i wzajemne położenie [17-24]. W przypadku tego typu organizacji ułożenie genów nie pozwala wnioskować o kolejności reakcji, a co za tym idzie — o strukturze produktu.

IV. Próby sterowania biosyntezą

Doświadczenia prowadzące do otrzymania polike-

Ryc. 4 Geny syntaz poliketydowych typu II odpowiedzialnych za syntezę aktynorodyny (*act*) przez *Streptomyces coelicolor*, granatycyny (*gra*) — *S. violaceoruber*, tetracenomycyny (*tcm*) — *S. glaucescens*, frenolicyny (*fren*) — *S. roseofulvus*, gryzeuzyny (*gris*) — *S. griseus* oraz barwnika zarodników (*whiE*) — *S. coelicolor* (wg [48], zmodyfikowano, reprodukcja za zgodą *Macmillan Magaz Ltd*).

KR — ketoreduktaza, KS — syntaza β -ketoacylowa, AT — acylotransferaza, CLF — czynnik determinujący długość łańcucha, ACP — białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe, ARO — aromatyzacja, CYC — cyklaza, MT — o-metylotransferaza.



tydów nie występujących w naturze są bardzo ściśle powiązane z badaniami nad mechanizmem biosyntezy. W tych badaniach wykorzystano wiele metod eksperymentalnych, które umożliwiły poznanie struktury związków przejściowych, przypisanie funkcji produktom poszczególnych genów i określenie specyficzności enzymów. Metody te opisano poniżej.

IV-1. Badanie mutantów zablokowanych na poszczególnych etapach biosyntezy

„Kolinearność” genów syntaz typu I i ich produktów narzuca sposób potencjalnej zmiany struktury wytwarzanego związku przez modyfikacje genetyczne powodujące unieczynnienie fragmentów określonego modułu. Stosując takie podejście eksperymentalne *Donadio* i w s p. [25] dokonali zmian w obrębie zespołu syntazy dezoksyerytronolidu B, mających wpływ na redukcję łańcucha węglowego (Ryc. 3). Powodując delecję genomowego DNA w obrębie całej domeny ketoreduktazy w podjednostce piątej otrzymano, w efekcie końcowym, spodziewaną pochodną nie zredukowaną przy węglu piątym, co jednocześnie potwierdziło, że ta ketoreduktaza jest aktywna przy piątej kolejno reakcji kondensacji. W podobny sposób poprzez inaktywację domeny enoiloreduktazy z modułu czwartego uzyskano pochodną zawierającą wiązanie podwójne w pozycji C-6 — C-7 zamiast normalnie występującej grupy metylenowej [26]. Obydwa zmodyfikowane związki to prekursorzy antybiotyków o szerokim spektrum działania.

Zespół enzymów DEBS wydaje się tolerować, przynajmniej do pewnego stopnia, zmiany w programie syntezy i prowadzi „obróbkę” zmienionego poliketydu przez dwa lub trzy dalsze cykle. Szkielet poliketydowy jednak rzadko reprezentuje produkt końcowy, a zmieniony w wyniku manipulacji genetycznych poliketyd może nie stanowić substratu dla enzymów modyfikujących. Stwarza to potencjalne ograniczenia takich manipulacji. Badania dotyczące przemian postpoliketydowych dowiodły jednak, że enzymy modyfikujące wykazują dość dużą „elastyczność” w stosunku do zmienionych substratów. Na przykład, podczas syntezy erytromycyny z dezoksyerytronolidu B najpierw następuje hydroksylacja w pozycji C-6 prowadzona przez produkt genu *eryF*, a następnie glikozylacja szkieletu w pozycji C-3 i C-5, hydroksylacja przy C-12 i 0-metylacja jednej z reszt cukrowych. Szczep ze zinaktywowanym genem *eryF* prowadzi wszystkie pozostałe modyfikacje substratu nie mającego grupy hydroksylowej przy węglu szóstym i produkuje 6-dezoksyerytromycynę A — antybiotyk znacznie bardziej stabilny w warunkach kwaśnych niż erytromycyna A [27].

Ostatnio *Cortes* i w s p. [28] opisali inną modyfikację DEBS polegającą na przeniesieniu aktywnej domeny katalitycznej w inne miejsce w obrębie kompleksu syntazy (Ryc. 3). Gen kodujący tioesterazę

działającą jako cyklaza odpowiedzialna za zakończenie syntezy i laktonizację szkieletu został umieszczony na końcu drugiego modułu DEBS. Spowodowało to wcześniejsze zakończenie syntezy — po dwóch cyklach kondensacji i redukcji — i utworzenie oczekiwanego związku triketydowego (złożonego z trzech jednostek dwuwęglowych).

Nowe pochodne awermektyny otrzymano w wyniku mutacji szczepu *Streptomyces avermitilis* [29-31]. Wiele z nich ma zwiększone właściwości owadobójcze i toksyczne względem nicieni. Mogą też służyć jako substraty do modyfikacji chemicznych.

Badanie mutantów zablokowanych na poszczególnych etapach biosyntezy było w mniejszym stopniu wykorzystywane do badania syntaz poliketydów aromatycznych, ponieważ mutacje w obrębie genów odpowiedzialnych za syntezę szkieletu poliketydowego najczęściej przerywają syntezę na bardzo wczesnym etapie [32]. Metoda ta okazała się przydatna do określenia funkcji enzymów modyfikujących PKS typu II [33].

IV-2- Heterologiczna ekspresja genów

Heterologiczna ekspresja genów obejmuje kilka różnych typów doświadczeń:

- komplementacja mutacji gospodarza za pomocą plazmidu zawierającego odpowiedni fragment genów syntazy z innego organizmu [34],
- wymiana genów na chromosomie gospodarza w wyniku podwójnego *crossing-over* [35],
- wprowadzenie do komórek gospodarza — promieniowca nie mającego endogennych genów PKS plazmidu zawierającego całą „kasetę ekspresyjną” złożoną z genów jednej lub kilku syntaz [36-43],
- wprowadzenie heterologicznych genów syntaz do komórek gospodarza mającego własny zestaw genów PKS [44-47].

Doświadczenia nad programowaniem poliketydów typu I wykazały, że specyficzność substratowa poszczególnych modułów DEBS jest związana nie tylko z ich liniowym ułożeniem determinującym kolejność reakcji [42] (Ryc. 3). Syntazy rozpoznają bowiem podstawowe cechy strukturalne produktów pośrednich. Na przykład podawane z zewnątrz znakowane związki pośrednie — diketydy w postaci tioestrów były przyjmowane jako substraty przez drugi moduł syntazy wprowadzonej do *Streptomyces coelicolor* dając prawidłowy produkt końcowy. Włączanie diketydów do erytronolidu potwierdza funkcjonowanie bez zarzutu syntaz poddanych „obróbce” w heterologicznym gospodarzu. Badania te stwarzają system bezpośredniego testowania strukturalnych i stereochemicznych podstaw specyficzności przy zastosowaniu analogów substratów.

Wprowadzenie genu *carE* ze *Streptomyces thermotolerans* (odpowiedzialnego za przyłączenie reszty kwasu izowalerianowego do karbomycyny) do *Strep-*

tomyces ambofaciens spowodowało acylację spiramycyny — naturalnego produktu *S. ambofaciens* [44]. W wyniku wprowadzenia do komórek *Streptomyces galilaeus* (wytwarzającego aklacynomycynę) genu ze *Streptomyces peucetius* (producenta doksorubicyny), kodującego hydroksylazę aklawinonu (produktu pośredniego w syntezie obydwu związków) otrzymano hydroksylowany analog aklacynomycyny. Związek ten wykazywał wysoką, specyficzną cytotoksyczność *in vitro* względem linii komórek białaczkowych i czerniaka [45].

Łącząc kilka pełnych szlaków biosyntezy w komórkach jednego szczepu uzyskano oprócz naturalnych, zupełnie nowe produkty. Klasycznym już dzisiaj przykładem jest dihydrogranatynodina — hybrydowy produkt syntaz: aktynorodyny i granatycyny [46]. Ostatnio dokonano próby połączenia trzech zespołów genów syntaz: tetracenomycyny, elloramycyny i urdamycyny [47].

Analiza struktury poliketydów produkowanych przez szczepy zawierające różne kombinacje genów pochodzących z jednej lub wielu syntaz umożliwiła określenie funkcji i specyficzności poszczególnych podjednostek budujących syntazy poliketydowe. Na tej podstawie wyodrębniono w zespole genów PKS typu II tzw. „syntazę minimalną” (minPKS) obejmującą KS, AT, CLF i ACP (Ryc. 4). Jest to zestaw trzech genów niezbędnych do utworzenia najprostszego, niezredukowanego szkieletu poliketydowego (Ryc. 5), np. 16-węglowego (SEK4) w przypadku minPKS aktynorodyny (*act*) lub 20-węglowego (SEK15) w przypadku minPKS tetracenomycyny (*tcm*). Uzyskanie analogu SEK4 zredukowanego w pozycji C-9 (SEK34) wymagało wprowadzenia dodatkowo genów KR i ARO. Analogiczne podjednostki różnych syntaz różnią się specyficznością. Na przykład *act* KR prowadzi redukcję łańcucha zarówno 16- jak i 20-węglowego (SEK4 i SEK15), natomiast *act* ARO nie jest w stanie utworzyć pierścienia aromatycznego

w SEK15. Stwierdzono także zjawisko spontanicznej cyklizacji łańcuchów niezredukowanych.

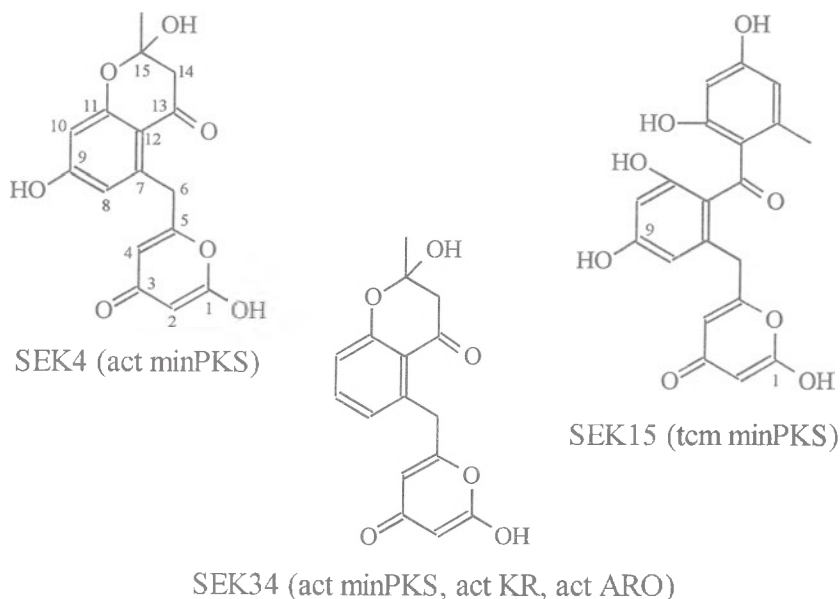
Wyzwaniem dla badaczy stało się znalezienie takich kombinacji syntaz minimalnych i pozostałych podjednostek, które pozwolą na uzyskanie produktów o oczekiwanej strukturze. Omówione wyżej badania doprowadziły do sformułowania wniosków, które można traktować jako zasady projektowania nowych poliketydów aromatycznych przez ingerencję we wczesne etapy ich biosyntezy [48]. Przedstawione wskazówki dotyczą długości łańcucha, ketoredukcji, cyklizacji i aromatyzacji poszczególnych pierścieni.

IV-3. Badanie funkcji natywnego kompleksu syntazy podlegającego ekspresji w komórkach *Escherichia coli*

Jako przykład może posłużyć eksperyment, w którym jeden z genów syntazy 6-dezoksyerytronolidu B (*eryAIII*) został wprowadzony, w odpowiednim systemie wektorów ekspresyjnych, do komórek *Escherichia coli*. Uzyskano w stosunkowo dużych ilościach oraz oczyszczono do stanu bliskiego homogenemu natywne białko DEBS3. Występuje ono w postaci dimeru, którego podjednostki mają masę 330 kDA i są wielofunkcyjnymi białkami o dziewięciu centrach katalitycznych. Białko to nie podlega posttranslacyjnej modyfikacji przez enzymy gospodarza. Uzyskanie oczyszczonego białka DEBS stwarza możliwość poznania specyficzności substratowej jego domen [48].

IV-4. Badanie funkcji wyselekcjonowanego zespołu enzymów PKS w układzie pozakomórkowym

Eksperymenty te przeprowadzono m.in. w odniesieniu do zespołu syntazy tetracenomycyny u *Streptomyces glaucescens* [5, 50, 51]. W komórkach tego



Ryc. 5 Struktury związków poliketydowych otrzymanych w wyniku kombinacji podjednostek syntaz poliketydowych typu II.

szczępu spowodowano zablokowanie ekspresji własnych genów syntazy tetracenomycyny. Ekspresji podlegał natomiast wprowadzony z zewnątrz niepełny zestaw genów tej samej syntazy, stanowiący odpowiednio dobraną kombinację. Z komórek tych uzyskano ekstrakty białkowe — funkcjonalne zestawy enzymów. Poszczególne enzymy można wybiórczo usuwać (metodą immunoprecypitacji), do układu można też dodawać różne substraty szlaku biosyntezy poliketynu. Stosując opisaną metodę potwierdzono aktywność „minimalnego” zestawu białek PKS oraz to, że można skonstruować zestaw optymalny pod względem aktywności przez włączenie białka cykazy.

Metoda systemu pozakomórkowego może być stosowana do badania innych enzymów PKS typu II. Umożliwia uzyskanie do dalszych badań oczyszczonych białek oraz rekonstrukcję aktywnej syntazy z wybranych składowych kompleksu.

IV-5. Analiza sekwencji genów

Sekwencje odpowiednich genów różnych syntaz są bardzo zbliżone (ok. 70% identycznych zasad). Również sekwencje białek wyprowadzone na podstawie sekwencji nukleotydowych są zachowawcze, szczególnie w rejonie przypuszczalnego centrum aktywnego [18, 21, 52, 53]. Umożliwia to przypisanie określonych funkcji biologicznych otwartym ramkom odczytu nowo oznaczanych sekwencji nukleotydowych [20, 43, 54-58]. Oznaczanie funkcji genów na zasadzie porównania sekwencji sprawdziło się w przypadku kilkunastu nowo poznanych syntaz. Zespoły kodujących je genów zostały odkryte na podstawie podobieństwa kodowanych przez nie białek z podstawowymi enzymami szlaku biosyntezy poliketynów [6, 11, 17-20, 23, 24, 33].

Porównanie genów różnych syntaz pozwala wyciągnąć wnioski dotyczące wspólnego schematu ich organizacji. Daje to teoretyczną podstawę wszelkich ingerencji w syntezę poliketynów, tj. zarówno tworzenia związków będących produktem mozaiki genów, jak i manipulacji w obrębie poszczególnych genów.

V. Podsumowanie

Medycyna nieustannie poszukuje nowych leków o silniejszym działaniu terapeutycznym, mniejszych skutkach ubocznych, większej trwałości. Związki pochodzenia naturalnego nie zawsze mają pożądane własności farmakologiczne, a ponadto ich pozyskiwanie i oczyszczanie jest bardzo kosztowne. Trudności te rozwiązuje częściowo synteza chemiczna lub modyfikacja produktów naturalnych.

Wraz z rozwojem metod inżynierii genetycznej wzrasta znaczenie modyfikowanych genetycznie mikroorganizmów jako producentów nowych leków. Drobnoustroje o odpowiednio dobranym zestawie genów mogą wyprodukować substancje, których otrzymanie

w inny sposób jest bardzo trudne lub niemożliwe [59].

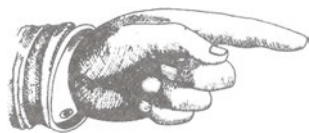
Pierwsze eksperymenty prowadzące do otrzymania „hybrydowych” związków poliketynowych zostały przeprowadzone przez Hopwooda i wsp. w 1985 r. [46]. Coraz dokładniejsze wyjaśnianie mechanizmów biosyntezy związków poliketynowych pozwala na przejście od eksperymentalnego łączenia genów różnych syntaz do racjonalnego programowania żądanych produktów poprzez ingerencję w strukturę i ułożenie genów odpowiedzialnych za konkretne etapy syntezy [48, 60, 61].

Artykuł otrzymano 24 listopada 1995 r.
Zaakceptowano do druku 25 kwietnia 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Tropsch S, Lanz SA, Rensing J, (1994) *J Mol Evol* 38: 610-618
2. Brown DW, Salvo JJ (1994) *Appl Environ Microbiol* 60: 979-983
3. Hopwood DA, Sherman D (1990) *Annu Rev Genet* 24: 37-66
4. McNeil DJ, Occi JL, Gewain KM, McNeil T (1994) *Ann NY Acad Sci* 721: 123-132
5. Shen B, Hutchinson CR (1993) *Science* 262: 1535-1540
6. Ye J, Dickns ML, Plater R, Li Y, Lawrence J, Strohl WR (1994) *J Bacteriol* 176: 6270-6280
7. Ikeda H, Omura S (1995) *J Antibiot* 48: 549-562
8. Soliveri J, Vijgenboom E, Granozzi C, Plaskitt KA, Chater KF (1993) *J Gen Microbiol* 139: 2569-2578
9. Katz L, Donadio S (1993) *Annu Rev Microbiol* 47: 875-912
10. Beck J, Ripka S, Siegner A, Schweizer E (1990) *Eur J Biochem* 192: 487-489
11. Merson-Davies LA, Cundliffe E (1994) *Mol Microbiol* 13: 349-355
12. Richardson MA, Kuhstoss S, Huber MLB, Ford L, Godfrey O, Turner JR, Rao RN (1990) *J Bacteriol* 172: 3790-3798
13. Arisawa A, Tsunekawa H, Okamura K, Okamoto R (1995) *Biosci Biotech Biochem* 59: 582-588
14. Lanz T, Tropsch S, Marnier FJ, Schröder J, Schröder G (1991) *J Biol Chem* 266: 9971-9976
15. Schröder J, Schröder G, (1990) *Z Naturforsch* 45: 1-8
16. Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ, Katz L (1992) *Gene* 115: 97-103
17. Sherman DH, Malpartida F, Bibb MJ, Kieser HM, Bibb MJ Hopwood DA (1989) *EMBO J* 8: 2717-2725
18. Bibb MJ, Biró S, Motamedi H, Collins JF, Hutchinson CR (1989) *EMBO Journal* 8: 2727-2736
19. Fernandez-Moreno MA, Martinez E, Boto L, Hopwood DA, Malpartida F (1992) *J Biol Chem* 267: 19278-19290
20. Bibb MJ, Sherman DH, Omura S, Hopwood DA (1994) *Gene* 142: 31-39
21. Kim ES, Bibb MJ, Butler MJ, Hopwood DA, Sherman DH (1994) *Gene* 141: 141-142
22. Tin-Wein Y, Bibb MJ, Revill WP, Hopwood DA (1994) *J Bacteriol* 176: 2627-2634
23. Piecq M, Dehottay P, Biot A, Dusart J (1994) *DNA Sequence - J DNA Sequencing and mapping* 4: 219-229
24. Han L, Yang K, Ramalingam E, Mosher RH, Vining LC (1994) *Microbiology* 140: 3379-3389
25. Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ, Katz L (1991) *Science* 252: 675-679
26. Donadio S, McAlpine JB, Sheldon PJ, Jackson M, Katz L (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7119-7123
27. Weber JM, Leung JO, Swanson SJ, Idler KB, McAlpine JB (1991) *Science* 252: 114-117

28. Cortes J, Wiesman KEH, Roberts GA, Brown MJB, Staunton J, Leadlay PF (1995) *Science* **268**: 1487-1489
29. Pang CH, Matsuzaki K, Ikeda H, Tanaka H, Omura S (1995) *J Antibiot* **48**: 59-66
30. Pang CH, Matsuzaki K, Ikeda H, Tanaka H, Omura S (1995) *J Antibiot* **48**: 92-94
31. Ikeda H, Takada Y, Pang CH, Matsuzaki K, Tanaka H, Omura S (1995) *J Antibiot* **48**: 95-97
32. Meurer G, Hutchinson CR (1995) *J Bacteriol* **177**: 477-481
33. Summers RG, Wendt-Pienkowski E, Motamedi H, Hutchinson CR (1992) *J Bacteriol* **174**: 1810-1820
34. Sherman DH, Kim ES, Bibb MJ, Hopwood DA (1992) *J Bacteriol* **174**: 6184-6190
35. Khosla C, Ebert-Khosla S, Hopwood DA (1992) *Mol Microbiol* **6**: 3237-3249
36. McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C (1993) *J Am Chem Soc* **115**: 11671-11675
37. McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C (1993) *Scienced* **262**: 1546-1550
38. Fu H, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C (1994) *J A Chem Soc* **116**: 4166-4170
39. Fu H, McDaniel R, Hopwood DA, Khosla C (1994) *Biochemistry* **33**: 9321-9326
40. Kim ES, Cramer KD, Shreve AL, Sherman DH (1995) *J Bacteriol* **177**: 1202-1207
41. Kao CM, Katz L, Khosla C (1994) *Science* **236**: 509-512
42. Cane DE, Gaunglin L, Khosla C, Kao CM, Katz L (1995) *J Antibiot* **48**: 647-651
43. Grimm A, Madduri K, Ali A, Hutchinson CR (1994) **151**: 1-10
44. Epp JK, Huber MLB, Turner JR, Goodson T, Schonher BE (1989) *Gene* **85**: 293-301
45. Hwang CK, Kim HS, Hong YS, Kim YH, Hong SK, Kim SJ, Lee JJ (1995) *Antimicro Agents Chemother* **39**: 1616-1620
46. Hopwood DA, Malpartida F, Kieser HM, Ikeda H, Duncan J (1985) *Nature (Lond)* **314**: 642-644
47. Decker H, Haag S, Udvarnoki G, Rohr J (1985) *Angew Chem Int Ed Engl* **34**: 1107-1110
48. McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C (1995) *Nature (lond)* **375**: 549-554
49. Roberts GA, Staunton J, Leadlay PF (1993) *Eur J Biochem* **214**: 305-311
50. Decker H, Motamedi H, Hutchinson CR (1993) *J Bacteriol* **175**: 3876-3886
51. Decker H, Hutchinson CR (1993) *J Bacteriol* **175**: 3887-3892
52. Donadio S, Katz L (1992) *Gene* **111**: 51-60
53. Bevitt DJ, Cortes J, Haydock SF, Leadlay PF (1992) *Eur J Biochem* **204**: 39-49
54. Arrowsmith TJ, Malpartida F, Sherman DH, Birch A, Hopwood DA, Robinson JA (1992) *Mol Gen Genet* **234**: 254-264
55. Arisawa A, Kawamura N, Tsunekawa H, Okamura K, Tone H, Okamoto R (1993) *Biosci Biotech Biochem* **57**: 2020-2025
56. Dickens ML, Ye J, Strohl WR (1995) *J Bacteriol* **177**: 536-543
57. Fernandez-Moreno MA, Martinez E, Caballero JL, Ichinose K, Hopwood DA, Malpartida F (1994) *J Biol Chem* **40**: 24854-24863
58. Kuczek K, Mordarski M, Goodfellow M (1994) *FEMS Microbiol Lett* **118**: 317-326
59. Hutchinson CR (1994) *Bio/Technology* **12**: 375-380
60. Mann J (1995) *Nature (Lond)* **375**: 533-534
61. Hopwood DA (1995) *FEMS Microbiol Rev* **16**: 233-234



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”.

Niedobór aktywności arylosulfatazy A jako podłoże leukodystrofii metachromatycznej

Deficiency of arylsulfatase A activity as a basis of metachromatic leucodystrophy

AGNIESZKA ŁUGOWSKA¹,
ANNA TYLKI-SZYMAŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Arylosulfataza A i substrat jej działania
- III. Defekt biochemiczny przyczyną leukodystrofii metachromatycznej
- IV. Aktywator SAP-B
- V. Pseudodeficyt arylosulfatazy A
- VI. Defekt posttranslacyjnej modyfikacji sulfataz
- VII. Molekularne podstawy defektów arylosulfatazy A

Contents:

- I. Introduction
- II. Arylsulfatase A and substrate of its action
- III. Biochemical defect in metachromatic leukodystrophy
- IV. SAP-B activator
- V. Arylsulfatase A pseudodeficiency
- VI. Defect of posttranslational modification of sulfatases
- VII. Molecular bases of arylsulfatase A defects

Wykaz stosowanych skrótów: LDM — leukodystrofia metachromatyczna; ASA — arylosulfataza A; Tf- α ASA — przeciwciała przeciw ASA, połączone z transferyną; SAP-B — ang. *sphingolipid activator protein-B*; GABA — kwas γ -aminomasłowy; ASA-PD — pseudodeficyt arylosulfatazy A; MSD — ang. *multiple sulfatase deficiency*, brak wielu sulfataz; pz — pary zasad; nt — nukleotydy.

U pacjentów z leukodystrofią metachromatyczną obserwuje się postępującą demielinizację, która jest przyczyną objawów neurologicznych, takich jak: zaburzenia chodu, ataksja, niedowład kończyn, zanik nerwów wzrokowych, napady drgawek, demencja.

Wyróżnia się trzy typy leukodystrofii metachromatycznej na podstawie wieku wystąpienia pierwszych objawów oraz przebiegu choroby [1]: późnoniemowlęcy (pierwsze objawy w wieku 1-2 lat), młodzieńczy (3-16 lat), dorosłych (powyżej 16 lat). Postęp choroby u dorosłych jest powolny i charakteryzuje się obecnością objawów psychotycznych.

I. Wstęp

Leukodystrofia metachromatyczna (LDM) jest genetycznie uwarunkowanym schorzeniem metabolicznym, spowodowanym deficytem aktywności arylosulfatazy A (ASA) (EC 3.1.6.1.) prowadzącym do spichrzenia galaktozylosulfatydu (siarczanu cerebrozydu) w lizosomach komórki. Mimo, że spichrzenie galaktozylosulfatydu dotyczy wszystkich komórek organizmu, to jednak zmiany patologiczne przebiegają głównie w mielinie ośrodkowego układu nerwowego oraz mielinie nerwów obwodowych. Galaktozylosulfatydy oraz laktozylosulfatydy (w mniejszym stopniu) spichrzają się również w nerkach, pęcherzyku żółciowym oraz innych narządach wewnętrznych. Sulfatydy są wydalane w dużych ilościach z moczem i żółcią. W preparatach histologicznych sulfatydy tworzą struktury kuliste, barwiące się metachromatycznie pod wpływem fioletu krezyłu (metachromazja) [1].

II. Arylosulfataza A i substrat jej działania

Arylosulfataza A (ASA) jest spotykana we wszystkich tkankach i płynach ustrojowych. Białko enzymu zostało wyizolowane z różnych źródeł, m.in. ludzkiej wątroby, łożyska i moczu, tkanek jeżowca, szczura, świni [2-4].

ASA jest kwaśną glikoproteiną o niskim pI, co wiąże się z dużą zawartością kwasu glutaminowego i asparaginowego. Zawiera również duże ilości proliny. Powyżej pH 6.5 enzym istnieje jako monomer o masie cząsteczkowej ok. 100 kDa. ASA może polimeryzować w zależności od pH środowiska tworząc dimer przy pH 4.5. Enzym pochodzący z ludzkiego moczu składa się z dwóch podjednostek o masach 54 i 63 kDa, natomiast pochodzący z ludzkiej wątroby, łożyska i fibroblastów składa się z dwóch podjednostek o masach 55 i 64 kDa [5, 6].

W komórce ASA jest umiejscowiona w lizosomach, gdzie prawdopodobnie tworzy dimery.

¹ Mgr, Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, Zakład diagnostyki Laboratoryjnej, Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa,

² doc. dr hab n. med., Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, Zespół Chorób Metabolicznych, Al. Dzieci Polskich 20; 04-736 Warszawa

Podobnie, jak w przypadku innych enzymów lizosomalnych, ASA jest syntetyzowana na szorstkim retikulum endoplazmatycznym jako N-glikozylowany prekursor. Następnie przenika ona przez retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego, gdzie do N-związanych łańcuchów oligosacharydowych dołączane są reszty fosforanowe i siarczanowe [7]. Przed transportem prekursora do kompartmentu prelizosomalnego (kwaśnego endosomu) w aparacie Golgiego zachodzi synteza markera mannozo-6-fosforanowego. Jest on rozpoznawany przez receptor enzymu w błonie kwaśnego endosomu, lizosomu, jak również w błonie komórkowej. Strukturą rozpoznawaną jest reszta kwasu fosforowego związanego z szóstym atomem węgla reszty mannozowej, która jest połączona z łańcuchem oligosacharydowym wiązaniem $\alpha 1 \rightarrow 2$. Synteza markera zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym — N-acetyloglukozoaminotransferaza przenosi N-acetyloglukozoamino-1-fosforan z UDP-N-acetyloglukozoaminy na C₆ mannozy. W drugim etapie następuje odszczepienie N-acetyloglukozoaminy i związanie reszty fosforanowej z C₆ mannozy [8]. Stwierdzono, że w hodowanych fibroblastach skóry powstaje prekursorowy polipeptyd o masie 62 kDa, który za pośrednictwem receptora wiążącego mannozo-6-fosforan przemieszcza się do kwaśnego, prelizosomalnego endosomu [9]. Przed osiągnięciem lizosomu, od C-końca prekursora odcinanych jest ok. 50 aminokwasów.

Die sner i w s p. stosując przeciwciała skierowane przeciw ASA, połączone z transferyną (Tf- α ASA) udowodnili, że nowosyntetyzowana ASA przechodzi przez kompartmenty komórkowe zawierające receptor transferyny do dojrzałego lizosomu [10]. W kompartmentach zawierających receptor transferyny, tzn. w kwaśnych endosomach i błonie komórkowej, nowosyntetyzowana ASA wiąże się z koniugatami Tf- α ASA, powraca na powierzchnię komórki, część enzymu jest uwalniana do środowiska zewnątrzkomórkowego.

Centrum aktywne ASA zawiera histydynę oraz dwie (lub więcej) argininy. Aniony: SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SO_3^{2-} , F^- oraz kationy: Ag^+ , Cu^{2+} i Hg^{2+} w stężeniach milimolarnych są inhibitorami aktywności enzymu. Reakcja katalizowana przez ASA podlega również inhibicji pod wpływem hydrokortyzonu, 2-hydroksy-

dopaminy oraz związków karbonylowych w obecności Cu^{2+} .

Arylosulfataza A (EC 3.1.6.1) jest enzymem umiejscowionym we wnętrzu lizosomów. Wraz z białkiem SAP-B (ang. *sphingolipid activator protein-B*) wchodzi w skład 3-sulfohydrolazy cerebrozydo-3-siarczanowej (EC 3.1.6.8.) [1]. ASA katalizuje I etap degradacji sulfolipidów — odszczepia grupę chemiczną zawierającą resztę siarczanową. Termin „sulfolipidy” odnosi się do wszystkich lipidów zawierających w swej części atome siarki. Spośród tej grupy związków organicznych substratami ASA są:

- galaktozylosulfatydy, czyli siarczan cerebrozydu;
- laktozylosulfatydy;
- seminolipid, czyli sulfogalakto-glicerolipid;
- siarczan psychozyny.

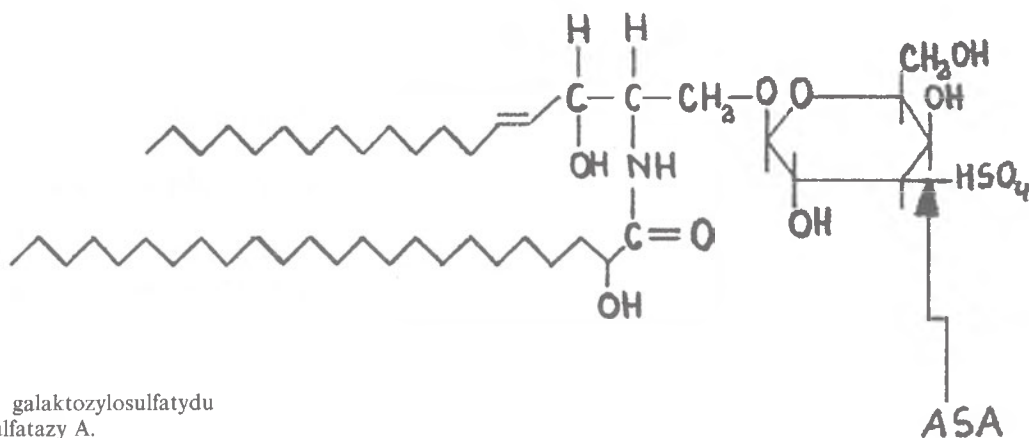
Sulfatydy są estrami siarczanowymi galaktocerebrozydu z grupą siarczanową przyłączoną w położeniu C3-hydroksyl cząsteczki galaktozy. Schematyczną budowę galaktozylosulfatydy przedstawia rycina 1.

Galaktozylosulfatydy jest ważnym składnikiem mieliny. Związek ten znajduje się na powierzchni mieliny i prawdopodobnie jest związany z białkami podstawowymi i białkami proteolipidów poprzez działanie sił jonowych. Ponadto galaktozylosulfatydy uczestniczy w aktywnym transporcie Na^+ jako kofaktor dla Na-K zależnej ATP-azy. Galaktozylosulfatydy aktywuje kalmodulinozależną fosfodiesterazę cyklicznych nukleotydów, znajduje się w miejscach wiążących opiaty oraz jest jednym ze składników miejsca rozpoznawania GABA.

III. Defekt biochemiczny przyczyną leukodystrofii metachromatycznej

Brak aktywności ASA, który uznano za pierwotną przyczynę leukodystrofii metachromatycznej, obserwowano u chorych w: moczu, leukocytach krwi obwodowej, hodowanych fibroblastach skóry, surowicy, łzach, ślinie, hodowanych limfocytach, hodowanych komórkach szpiku kostnego, hodowanych komórkach płynu owodniowego.

Przeciwciała przeciw ludzkiej ASA reagują krzyżowo z polipeptydami syntetyzowanymi przez hodowane



Ryc. 1 Schematyczna budowa galaktozylosulfatydy i miejsce działania arylosulfatazy A.

fibroblasty skóry pacjentów trzech typów LDM [11]. W materiale od pacjentów z leukodystrofią metachromatyczną typu późnoniemowłęczego stwierdzono obecność glikoprotein reagujących krzyżowo z przeciwciałami anty-ASA zarówno w sposób pozytywny (co oznacza, że polipeptyd enzymu podlega syntezie), jak i nie reagujących pozytywnie (co świadczy o tym, że synteza polipeptydu enzymu nie zachodzi). Komórki fibroblastów od pacjentów z LDM typów: młodzieńczego i dorosłych syntetyzują i wydzielają polipeptydy ASA w tempie wynoszącym 20-70% tempa komórek kontrolnych. Jednak nowosyntetyzowane, zmutowane cząsteczki enzymu są gwałtownie degradowane po przedostaniu się do wnętrza lizosomu [12]. Po zastosowaniu inhibitorów proteinaz cysteinowych obserwuje się materiał reagujący krzyżowo z przeciwciałami anty-ASA oraz częściową aktywność ASA w fibroblastach niektórych pacjentów z LDM typu młodzieńczego lub dorosłych.

Podczas badania aktywności procesów katabolizmu siarczanu cerebrozydu (tzn. galaktozylosulfatydu) *in situ* w kulturach tkankowych spostrzeżono, że w komórkach pochodzących od pacjentów z LDM typów późnych wykrywa się pewną resztkową aktywność ASA i zależność czasową między zdolnością hodowanych komórek do degradowania dostarczanego do pożywki sulfatydu, a wiekiem wystąpienia pierwszych objawów klinicznych u pacjenta [1]. Taka obserwacja tłumaczy zjawisko pseudodeficytu, w którym niska aktywność enzymu, wynosząca 10-30% średnich wartości normalnych, byłaby wystarczająca do zachowania normalnego metabolizmu komórki [12-14]. *Conzelmann* i *Sandhoff* [15-17] wysunęli hipotezę zakładającą, że powyżej pewnego krytycznego progu aktywności enzymu komórka może pozbywać się nadmiaru substratów, takich np. jak sulfatydy. Sężenie danego substratu w lizosomie określa równowaga dynamiczna zachowana między tempem napływu katabolitu do lizosomu a kinetycznymi parametrami enzymu degradującego ów substrat (K_m , V_{max}). Według hipotezy *Conzelmann* i *Sandhoff* przejście od stanu fizjologicznej normy do patologicznego spięchrzenia substratu (np. sulfatydu) mogłoby następować w sytuacji, gdy aktywność resztkowa enzymu byłaby niższa od założonego krytycznego progu aktywności. Hipoteza ta stanowi próbę wyjaśnienia biochemicznych podstaw występowania pierwszych objawów klinicznych w różnym wieku u pacjentów z leukodystrofią metachromatyczną różnych typów.

IV. Aktywator SAP-B

Hydroliza niektórych sfingolipidów wymaga działania małych glikoprotein zwanych SAP (ang. *sphingolipid activator proteins*) lub saposzynami. Białka te działają jak detergenty rozpuszczając hydrofobowe substraty lipidowe lub bezpośrednio aktywują niektóre enzymy lizosomalne. ASA może hydrolizować

swoje substraty tylko przy współdziałaniu z SAP-B [18]. Białkowy aktywator SAP-B wpływa na rozpuszczalność siarczanu cerebrozydu i czyni go dostępnym dla enzymu [19]. Rzadko spotykana forma leukodystrofii metachromatycznej jest spowodowana brakiem aktywatora SAP-B. Do 1992 r. opisano zaledwie sześciu pacjentów [20]. Obraz kliniczny przypomina typ młodzieńczy lub późnoniemowłeczy leukodystrofii metachromatycznej [21, 22]. U pacjentów z brakiem białka SAP-B stwierdza się wydalanie sulfatydów w moczu i równocześnie aktywność ASA mierzoną w leukocytach lub fibroblastach w normie lub tylko nieznacznie obniżoną.

Cztery białka aktywatorowe zwane saposzynami A, B, C i D powstają ze wspólnego prekursora — prosapozyny. Prosapozyna jest glikoproteiną złożoną z 524 aminokwasów. Zbudowana jest ona z czterech homologicznych domen białkowych i obszarów rozdzielających [23, 24]. Prosapozyna jest syntetyzowana jako glikoproteinowy prekursor o masie 65 kDa. W tej postaci przedostaje się ona do aparatu Golgiego, gdzie podlega glikozylacji dając złożony polipeptyd o masie 73 kDa. Niewielka część puli polipeptydu 73 kDa jest wydzielana do cytozolu. Jednak znaczna część puli polipeptydu 73 kDa przechodzi etap enzymatycznej obróbki w lizosomach [25]. W wyniku proteolizy z prosapozyny powstają cztery aktywne białka saposzynowe; SAP-B powstaje z drugiej domeny [26].

Vielhaber i *Sandhoff* stwierdzili, że endocytoza cząsteczek prosapozyny do wnętrza lizosomów odbywa się w sposób całkowicie niezależny od receptorów mannozo-6-fosforanu [27].

Gen kodujący prosapozynę znajduje się w chromosomie 10 [28]. Kodujący DNA (cDNA) prosapozyny sklonowano niezależnie w zespołach *O'Brien* i *Fürsta* w 1988 r. [23, 24]. Region kodujący ma długość ok. 1,6 tys. pz. Region nie podlegający translacji od końca 3' ma długość ok. 1,2 tys. pz. Saposzyny A, B, C, D wykazują porównywalną homologię, którą szczególnie odzwierciedla zachowanie reszt cysteinowych i potencjalnych miejsc N-glikozylacji. Gen kodujący prosapozynę został sklonowany, chociaż informacje o budowie eksonu 1 są nadal niekompletne [29, 30]. Gen kodujący prosapozynę ma długość ok. 20 tys. pz i prawdopodobnie składa się z 13-tu eksonów. Domena SAP-B jest kodowana przez eksony 5-7. Dotychczas opisano trzy mutacje w genie prosapozyny uszkadzające białko SAP-B: T217I [31, 32], C241S [33, 19], oraz 777 + 1895C > A [34, 35].

V. Pseudodeficyt arylosulfatazy A

Niską aktywność ASA obserwuje się również w około 5-15% ogólnej populacji. W grupie tej znajdują się osoby klinicznie zdrowe [36], jak również „nietypowi” pacjenci z innymi niż LDM schorzeniami neurologicznymi lub psychiatrycznymi [37]. Zjawisko obniżenia aktywności ASA do 10-30% średnich wartości nor-

malnych uznano za polimorfizm w obrębie genu ASA i nazwano pseudodeficytem. Używając zwykle stosowanych substratów nie można rozróżnić pseudodeficytu ASA (ASA-PD) od LDM tylko na podstawie aktywności enzymu. U osób z pseudodeficytem nie obserwuje się wydalania sulfatydów w moczu. Częste występowanie ASA-PD wymaga szczególnej procedury w pre- i postnatalnym diagnozowaniu leukodystrofii metachromatycznej.

VI. Defekt posttranslacyjnej modyfikacji sulfataz

Stwierdzono również inny defekt związany z brakiem aktywności nie tylko ASA, lecz również arylosulfataz B i C oraz innych sulfataz biorących udział w degradacji mukopolisacharydów. Schorzenie to określono jako brak wielu sulfataz (ang. *multiple sulfatase deficiency, MSD*). Brak wielu sulfataz opisano dotychczas u ok. 50 pacjentów z cechami klinicznymi LDM typu późnoniemowlęcego oraz mukopolisacharydoz.

Według najnowszych doniesień sulfatazy wymagają dla swojej aktywności pewnej posttranslacyjnej modyfikacji, która w przypadku MSD przebiega nieprawidłowo. W przypadkach arylosulfataz A i B opisano nieznaną dotąd rodzaj posttranslacyjnej obróbki białek tych enzymów, która polega na zamianie cysteiny na kwas 2-amino-3-oksopropionowy. Porównano sekwencję aminokwasową wszystkich znanych sulfataz u *Eukaryota*. Stwierdzono, że cysteina znajduje się w tym fragmencie sulfataz, który jest zachowany we wszystkich przebadanych enzymach (fragment konserwatywny). Natomiast w nieaktywnych polipeptydach ASA i ASB, pochodzących z fibroblastów od pacjenta z MSD, nie zauważono obecności reszty cysteinowej. Fakt ten potwierdza przypuszczenie, że brak cysteiny we fragmencie konserwatywnym jest przyczyną deficytu aktywności sulfataz u chorych z przejawami MSD [38, 39].

VII. Molekularne podstawy defektów arylosulfatazy A

Gen kodujący ASA przypisano metodą hybrydyzacji komórek somatycznych do chromosomu 22 [40]. Obecnie wiadomo, że gen ASA znajduje się na długim ramieniu chromosomu 22 w regionie prążka q13. Gen kodujący białko aktywatora SAP-B i jego prekursora — prosapozyny przypisano do chromosomu 10.

W 1989 r. *Stein i w s p.* sklonowali cDNA kodującą ludzką ASA. Jednak pełną i obecnie przyjętą strukturę genu ASA opublikował *Kreysing i w s p.* [41, 42]. Gen kodujący ASA jest dość mały — długości 3,2 tys. pz i składa się z 8 eksonów. Region 5' nie podlegający translacji zawiera miejsce cap mRNA przy ok. -370nt, a ponadto cztery sekwencje GC-box w położeniu -10, -40, -50, -60, które są typowymi pozycjami

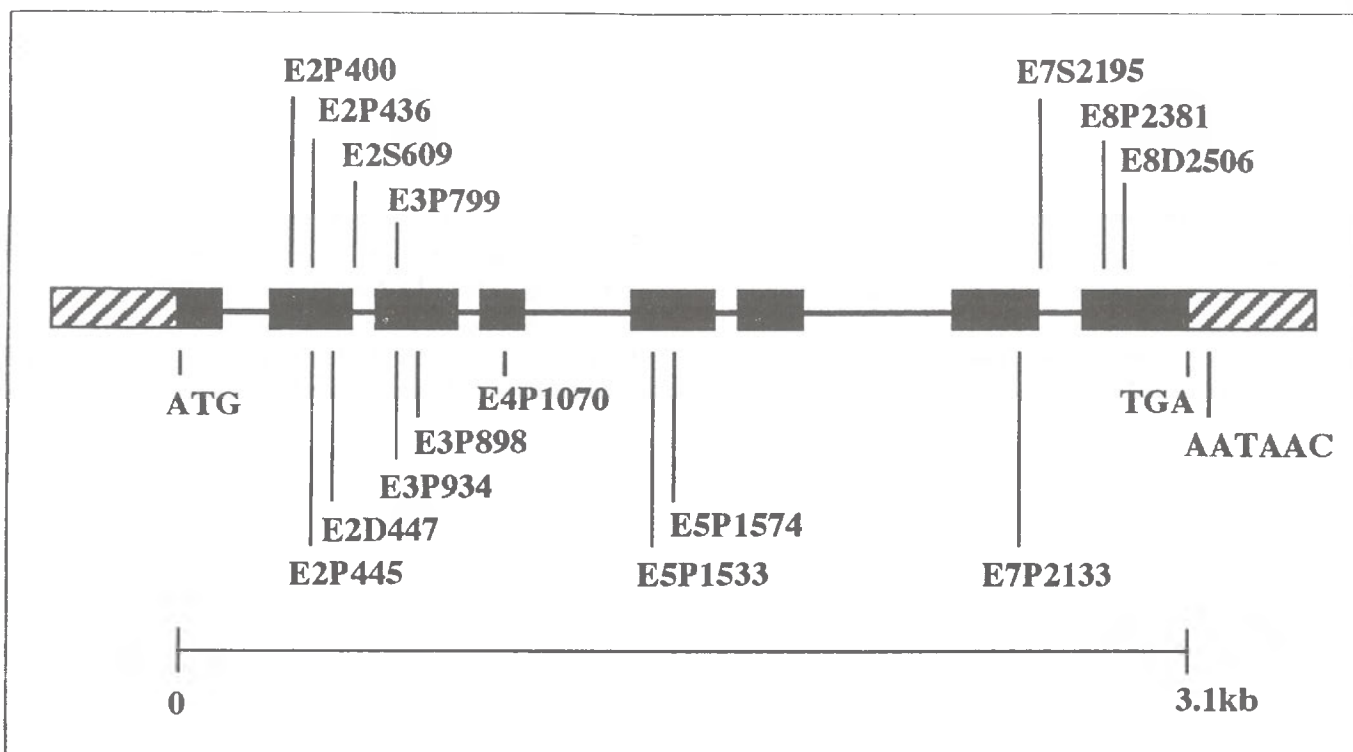
wiązania się z transkrypcyjnym czynnikiem promotorem Sp1. Tylko GC-box w położeniu -10 jest zorientowany w dobrym kierunku. Region 5' nie podlegający translacji nie zawiera sekwencji typu TATA lub CAAT-box, co jest dość rzadkim zjawiskiem wśród genów *Eukaryota*. Region kodujący podlegający translacji rozpoczyna się kodonem inicjującym ATG, za którym następuje sekwencja 18-aminokwasowego peptydu sygnałowego i 489-ciu aminokwasów białka enzymu. Ramka odczytu kończy się kodonem terminacyjnym TGA. W odległości ok. 100nt od kodonu TGA znajduje się sygnał poliadenylacji AATAAC (1621nt) i ok. 20nt za nim ogon poliA. Region 3' nie podlegający translacji ma długość 140 pz. W normalnych ludzkich fibroblastach powstają 3 różne rodzaje mRNA dla ASA: 2.1, 3.7, 4.8 tys. pz [41]. 2.1 tys. pz mRNA stanowi ok. 30-40%, mRNA długości 3.7 oraz 4.8 tys. pz stanowią ok. 60-70% całości mRNA dla ASA.

Wyliczona masa cząsteczkowa białka kodowanego przez ASA-cDNA wynosi 62 kDa, co pozostaje w zgodzie z wynikami otrzymanymi na drodze biosyntezy [6]. Oprócz polipeptydu o masie cząsteczkowej 62 kDa wykrywa się również formy ASA o masie cząsteczkowej 54-59 kDa [6, 43]. Przypuszcza się, że polipeptyd o masie cząsteczkowej 62 kDa jest prekursorem ASA, który podlega obróbce proteolitycznej dając formy o mniejszej masie cząsteczkowej [44]. W genie kodującym ASA występują sekwencje dla 3 miejsc możliwej N-glikozylacji cząsteczki białka enzymu, z których faktycznie dwa są wykorzystywane. Strukturę genu ASA przedstawia rycina 2.

W 1989 r. *Gieselmann i w s p.* [45] sklonowali i zsekwencionowali gen kodujący ASA w materiale pochodzącym od osoby będącej homozygotą pseudodeficytu ASA. Wykazano obecność dwóch tranzycji A→G. Jedna z nich zamienia asparaginę w położeniu 1049nt cDNA na serynę, co powoduje utratę miejsca N-glikozylacji cząsteczki białka ASA oraz zmniejszenie masy cząsteczkowej enzymu o 2.5 kDa, co jednak nie jest zasadniczą przyczyną pseudodeficytu ASA.

Druga tranzycja A→G zmienia sekwencję pierwszego sygnału poliadenylacji za kodonem „stop” z AATAAC na AGTAAC. Mutacja ta powoduje brak obecności małego 2.1 tys. pz mRNA, który odpowiada za ok. 90% poli(A⁺) mRNA arylosulfatazy A i obniżenie aktywności enzymu do 10-30% normy. Niska aktywność ASA u osób z pseudodeficytem wynika zatem z częściowo zahamowanej syntezy białka enzymu, a nie z zaburzenia jego stabilności [46].

Dotychczas w genie kodującym ASA wykryto blisko 60 mutacji związanych z leukodystrofią metachromatyczną; wśród nich jest: 6 delecji, 5 mutacji typu „splice site” i 47 tranzycji nukleotydowych [46]. Wyróżnia się dwa typy mutacji w genie ASA [47-50]. Mutacja typu 0 (lub I) powoduje całkowite zahamowanie syntezy produktu genu ASA. Mutacje typu 0 w stanie homo-



Ryc. 2 Schemat genu kodującego arylosulfatazę A. Przykładowo pokazano 15 mutacji. Pola czarne wskazują eksony; linie — introny, pola zakreskowane — 5' i 3' regiony nie podlegające translacji. ATG oznacza kodon inicjujący, TGA — kodon terminacyjny translacji. AATAAC wskazuje sygnał poliadenylacji.

zygotycznym prowadzą do późnoniemowłęczącej formy LDM. Mutacje typu R (lub A) cechują się niską aktywnością resztkową enzymu. W stanie homozygotycznym mutacje typu R prowadzą do postaci dorosłych LDM. Heterozygotyczność mutacji typu 0 i R występuje najczęściej u pacjentów z typem młodzieńczym LDM.

Dwa spośród zmutowanych alleli — 459 + 1G > A oraz P426L — stanowią razem ok. 50% wykrywanych mutacji u pacjentów z LDM [48, 49, 51]. Mutacja 459 + 1G > A (typ 0) polega na zamianie G → A w pozycji nt 609 genu, czego skutkiem jest utrata donorowego miejsca cięcia dla posttranskrypcyjnej obróbki mRNA — składania (*splicing*). U pacjentów będących homozygotami tego allelu prawie nie wykrywa się ASA mRNA. Mutacja P426L (typ R) polega na tranzycji C → T w pozycji nt 2381 genu, co powoduje zamianę Pro426 na Leu. Produkt zmutowanego genu wykazuje pewną aktywność enzymatyczną, ale jest bardzo niestabilny.

Honke zauważył, że mutacje LDM grupują się w regionie 5' genu, szczególnie w eksonach 2 i 3 [52]. Około połowy wszystkich mutacji umiejscowiono właśnie w tych dwóch eksonach [46]. Gdy porównano sekwencje aminokwasowe sulfataz izolowanych od różnych ssaków stwierdzono, że stopień homologii maleje od regionu N-końcowego w kierunku regionu C-końcowego. Największy stopień homologii wykazano porównując sekwencje kodowane przez ekson 2. Jeśli stopień homologii sekwencji aminokwasów odzwierciedla funkcjonalne znaczenie danego regionu cząsteczki enzymu, to grupowanie się mutacji w pew-

nych określonych rejonach genu nie jest niczym niezwykłym.

Leukodystrofia metachromatyczna jest chorobą dziedziczną autosomalnie, recesywnie. Ogólną częstość występowania LDM można oszacować tylko w przybliżeniu, gdyż jest ona różna w zależności od badanej populacji i wykrywalności klinicznej choroby (rozpoznawalności). W północnej Szwecji częstość występowania późnoniemowłęczącego typu LDM ustalono na 1:40000 [53], we Francji — 1:130000 [54], wśród Żydów habaniczkich w Izraelu — 1:75 [55], w USA — 1:100000 urodzeń [1], w stanie Washington — 1:40000 [46]. Częstość występowania allelu pseudodeficytu arylosulfatazy A (ASA-PD) w ogólnej populacji ustalono na 7.3-15% [1, 57-59], natomiast homozygot PD/PD na 0.5-2% [1].

Artykuł otrzymano 6 listopada 1995 r.
Zaakceptowano do druku 30 kwietnia 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Kolodny EH, Fluharty AL (1995) W: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (red) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, wyd. 7, Mc Graw-Hill, New York, str 2693-2739
2. Sasaki H, Yamada K, Akasaka K, Kawasaki H, Suzuki K, Saito A, Sato M, Shimada H (1988) *Eur J Biochem* 177: 9
3. Van der Pal RH, Klein W, Van Golde LM, Lopes-Cardozo M (1990) *Biochim Biophys Acta* 1043: 91
4. Selmi S, Maire J, Rousett B (1989) *Arch Biochem Biophys* 273: 170
5. Draper RK, Fiskum GM, Edmond J (1976) *Arch Biochem Biophys* 177: 525

6. Waheed A, Hasilik A, von Figura K (1982) *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **363**: 425-430
7. Waheed A, van Etten RL (1985) *Biochim Biophys Acta* **847**: 53
8. Verbert A, Cacan B, Cecchellini R (1987) *Biochimie* **69**: 91-99
9. Kelly BM, Yu CZ, Chang PL (1989) *Eur J Cell Biol* **48**: 71
10. Diesner F, Sommerlade HJ, Braulke T (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **197**: 1-7
11. Kappler J, Leinekugel P, Conzelmann E, Kleijer WJ, Kohlschütter A, Tönnesen T, Rochel M, Freycon F, Propping P (1991) *Hum Genet* **86**: 463-470
12. Bach G, Dagan A, Herz B, Gatt S (1987) *Clin Genet* **31**: 211-217
13. Bach G, Neufeld EF (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **112**: 198-205
14. Fluharty AL, Mee KW, Kihara H (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **112**: 191-197
15. Conzelmann E, Sandhoff K (1983/84) *Dev Neurosci* **6**: 58-71
16. Conzelmann E, Sandhoff K (1991) *Dev Neurosci* **13**: 197-204
17. Leinekugel P, Michel S, Conzelmann E, Sandhoff K (1992) *Hum Genet* **88**: 513-523
18. Fischer G, Jatzkewitz H (1977) *Biochim Biophys Acta* **481**: 561-572
19. Schlote W, Harzer K, Christomanou H, Paton BC, Kustermann-Kuhn B, Schmidt B, Seeger J, Bendt U, Schuster J, Langenbeck U (1991) *Eur J Pediatr* **150**: 584-591
20. Wenger DA, Williams C, Considine E, Rafi MA (1992) *Int Pediatr* **7**: 34-39
21. Shapiro LJ, Aleck KA, Kaback MM, Itabashi H, Desnick RJ, Brand N, Stevensen RL, Fluharty AL, Kihara H (1979) *Pediatr Res* **13**: 1179
22. Wenger DA, De Gala G, Williams C, Taylor HA, Stevenson RE, Pruitt JR, Miller J, Garen PD, Balentine JD (1989) *Am J Med Genet* **33**: 255-265
23. O'Brien JS, Kretz KA, Dewji NN, Wenger DA, Esch F, Fluharty AL (1988) *Science* **234**: 1098-1101
24. Fürst W, Machleidt W, Sandhoff K (1988) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **369**: 317-328
25. Fürst W, Sandhoff K (1992) *Biochim Biophys Acta* **1126**: 1-16
26. Fujibayashi S, Wenger DA (1986) *Biochim Biophys Acta* **875**: 554-562
27. Vielhaber G, Sandhoff K (1993) *9th ESGLD Workshop, Delphi*
28. Dewji NN, Wenger DA, O'Brien JS (1987) *PNAS USA* **84**: 8652-8656
29. Holtschmidt H, Sandhoff K, Fürst W, Kwon HY, Schnabel D, Suzuki K (1991) *FEBS Lett* **280**: 267-270
30. Rorman EG, Scheinker V, Grabowski GA (1992) *Genomics* **13**: 312-318
31. Kretz K, Ginns E, Carson G, Morimoto S, Kishimoto Y, Fluharty AL, O'Brien JS (1989) *Am Soc Hum Genet*, abstrakt
32. Rafi MA, Zhang XL, De Gale G, Wenger DA (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **166**: 1017-1023
33. Holtschmidt H, Sandhoff K, Kwon HY, Nakano T, Suzuki K (1990) *J Biol Chem* **266**: 7556-7560
34. Zhang XL, Rafi MA, De Gala G, Wenger DA (1990) *PNAS USA* **87**: 1426-1430
35. Zhang XL, Rafi MA, De Gala G, Wenger DA (1991) *Hum Genet* **87**: 211-215
36. Dubois G, Harzer K, Bauman N (1977) *Am J Hum Genet* **29**: 191-194
37. Herska M, Moscovich DG, Kalian M, Gottlieb D, Bach G (1987) *Am J Med Genet* **26**: 629-635
38. Rommerskirch (1992) *PNAS USA* **89**: 2561-2565
39. Schmidt B, Selmer T, Ingendoch A, von Figura K (1995) *Cell*, in press
40. De Luca C, Brown JA, Shows TB (1979) *PNAS USA* **76**: 1957
41. Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer EH, O'Brien JS, von Figura K (1989) *J Biol Chem* **264**: 1252-1259
42. Kreysing J, von Figura K, Gieselmann V (1990) *Eur J Biochem* **191**: 627-631
43. Hohenschutz C, Friedl W, Schlör KH, Waheed A, Conzelmann E, Sandhoff K, Propping P (1988) *Am J Med Genet* **31**: 169-175
44. Gieselmann V, von Figura K (1990) *J Inher Metab Dis* **13**: 560-571
45. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, von Figura K (1989) *PNAS USA* **86**: 9436-9440
46. Gieselmann V, Zlotogora J, Harris A, Wenger DA, Morris CP (1994) *Hum Mutation* **4**: 233-242
47. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, Kappler J, Fluharty A, Bohne W, von Figura K (1991) *Brain Dysfunction* **4**: 235-243
48. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, Kappler J, Fluharty A, von Figura K (1991) *Dev Neurosci* **13**: 222-227
49. Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K, Gieselmann V (1991) *N Engl J Med* **324**: 18-22
50. Kappler J, von Figura K, Gieselmann V (1992) *Ann Neurol* **31**: 256-261
51. Barth ML, Fensom A, Harris A (1993) *Hum Genet* **91**: 73-77
52. Honke K, Kobayashi T, Fuji T, Gasa S, Xu M, Takamaru Y, Kondo R, Tsuji S, Makita A (1993) *Hum Genet* **92**: 451-456
53. Gustavson K, Hagberg B (1971) *Acta Paediatr Scand* **60**: 585-590
54. Guibaud P, Garcia I, Guyonnet CL (1973) *Lyon Med* **229**: 1215
55. Zlotogora J, Bach G, Bösenberg C, Barak Y, von Figura K, Gieselmann V (1995) *Hum Mutat* **5**: 137-43
56. Farrell DF (1981) *Hum Genet* **59**: 129-134
57. Hohenschutz C, Eich P, Friedl W, Waheed A, Conzelmann E, Propping P (1989) *Hum Genet* **82**: 45-48
58. Nelson PV, Carey WF, Morris CP (1991) *Hum Genet* **87**: 87-88
59. Chabas A, Castellvi S, Bayes M, Balcells S, Grinberg D, Vilagelin L, Marfany G, Lissens W, Gonzales-Duarte R (1993) *Clin Genet* **44**: 320-323

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

Izoenzymy fosfolipazy C specyficznie hydrolizującej fosfatydyloinozytyle i regulacja ich aktywności

Phosphatidylinositol-specific phospholipase C isozymes and regulation of their activity

TADEUSZ PAWEŁCZYK*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Izoenzymy fosfolipazy C
- III. Właściwości katalityczne fosfolipazy C
- IV. Regulacja aktywności izoenzymów fosfolipazy C
 - IV-1. Regulacja aktywności izoenzymów fosfolipazy C typu β
 - IV-2. Regulacja aktywności izoenzymów fosfolipazy C typu γ
 - IV-3. Regulacja aktywności izoenzymów fosfolipazy C typu δ
 - IV-4. Regulacja aktywności fosfolipazy C przez kinazę białkową C i kinazę białkową A
- V. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie izoenzymów fosfolipazy C
- VI. Rola fosfolipazy C w patofizjologii

Wykaz stosowanych skrótów: PLC—fosfolipaza C; DAG—diacyloglicerol; Ins—inozytol; IP_3 —inozytolotrifosforan; PI—fosfatydyloinozytol; PIP—fosfatydyloinozytolo 4-fosforan; PIP_2 —fosfatydyloinozytolo 4,5-bisfosforan; PDGF—płytkowopochodny czynnik wzrostu; EGF—czynnik wzrostu naskórka; CSF—czynnik stymulujący komórki macierzyste (*colony-stimulating factor*); NGF—czynnik wzrostu nerwu; PMA—octan mirystoilo forbolu; PKC—kinaza białkowa C; SM—sfinгомielina.

I. Wstęp

Białka receptorowe zlokalizowane w błonie komórkowej umożliwiają komórce odbieranie sygnałów z otaczającego ją środowiska. Związanie cząstki sygnałowej z receptorem prowadzi do powstania i uwolnienia do wnętrza komórki odpowiedniej substancji przekąźnikowej, która poprzez stymulację lub zahamowanie określonych przemian wewnątrz komórki zmienia jej metabolizm lub funkcje. Klasycznym przykładem takiego przekąźnika jest cykliczny AMP powstający w reakcji katalizowanej przez cyklazę adenylnową. Związanie hormonu z receptorem prowadzi do aktywacji białka G i związania GTP z podjednostką α białka G_s lub G_i . Powstały kompleks G_α -GTP wpływa na aktywność cyklazy adenylnowej.

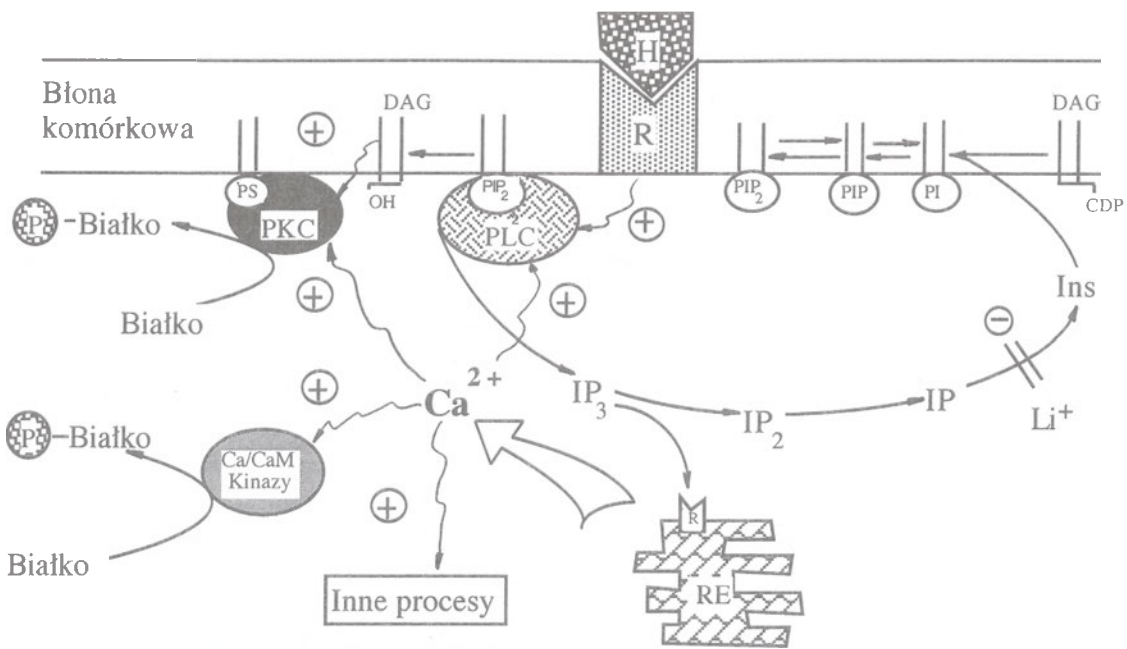
Odmiernym mechanizmem przekazywania informacji w komórce jest kaskada przemian zapoczą-

Contents:

- I. Introduction
- II. Isoenzymes of phospholipase C
- III. Catalytic properties of phospholipase C
- IV. Regulation of phospholipase C isoforms
 - IV-1. Regulation of phospholipase C β isoforms
 - IV-2. Regulation of phospholipase C γ isoforms
 - IV-3. Regulation of phospholipase C δ isoforms
 - IV-4. Regulation of phospholipase C activity by protein kinase C and protein kinase A
- V. Subcellular distribution of phospholipase C isozymes
- VI. Role of phospholipase C in pathophysiology

kowana hydrolizą fosfatydyloinozytoli w wewnętrznej warstwie błony komórkowej (Ryc. 1). Związanie substancji sygnałowej z receptorem powoduje aktywację fosfolipazy C specyficznie hydrolizującej fosfolipidy inozytolowe [1, 2]. W rezultacie dochodzi do hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP_2) i powstania diacyloglicerolu (DAG) oraz inozytolotrifosforanu (IP_3). IP_3 jako związek rozpuszczalny w środowisku wodnym dyfunduje z błony komórkowej do cytoplazmy, a następnie po związaniu ze swoistymi receptorami w błonach retikulum endoplazmatycznego indukuje uwolnienie wapnia z wewnątrzkomórkowych zapasów [2-4]. Wzrost stężenia Ca^{2+} stymuluje szereg przemian komórkowych zależnych od tego jonu. Między innymi dochodzi do aktywacji kinaz białkowych zależnych od Ca^{2+} i kalmoduliny. Fosfolipaza C oraz kinaza białkowa C również aktywowana jest przez Ca^{2+} . Diacyloglicerol jako związek nierozpuszczalny w środowisku wodnym pozostaje w błonie komórkowej i przemieszczając się w niej może oddziaływać z kinazą białkową C, której jest fizjologicznym aktywatorem [5]. Dotychczas poznano 11 izoenzymów kinazy białkowej C [6]. Substratami kinazy białkowej C *in vivo* są białka związane z przekazywaniem informacji w komórce, białka szlaków metabolicznych oraz regulatorowe białka związane z ekspresją genów [7, 8]. Powstały w wyniku działania fosfolipazy C IP_3 ulega przemianom w wyniku których następuje odtworzenie PIP_2 [9, 10].

* Dr hab., Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk



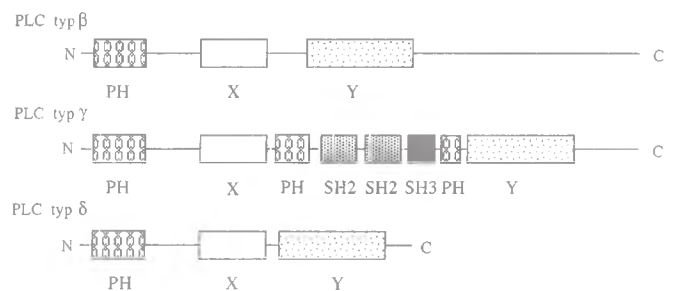
Ryc. 1 Schemat głównych przemian fosfatydylinozytoli zachodzących w komórce z udziałem fosfolipazy C (PLC). Dla przejrzystości rysunku zaznaczono tylko główne przemiany istotne dla sygnalizacji komórkowej opartej o przemiany PIP₂, pomijając szereg istotnych czynników biorących udział w przemianach fosfatydylinozytoli. Stosowane oznaczenia: R, receptor; H, hormon; DAG, diacyloglicerol; PIP₂, fosfatydylinozytolo 4,5-bisfosforan; PIP, fosfatydylinozytolo 4-fosforan; PI, fosfatydylinozytolo; Ins, inozytolo; PKC, kinaza białkowa C; PS, fosfatydylloseryna; RE, retikulum endoplazmatyczne.

Opublikowane dotychczas dane wskazują, że hydroliza PIP₂ przez fosfolipazę C inicjuje kaskadę przemian mających istotne znaczenie dla szeregu podstawowych funkcji komórki. Wymienić tutaj można aktywność metaboliczną, wydzielniczą, nerwową i skurczową oraz podział komórkowy.

II. Izoenzymy fosfolipazy C

Wiele fosfolipaz C wyizolowano i oczyszczono z rozmaitych tkanek zwierzęcych [11-14]. Na podstawie cDNA ustalono sekwencje aminokwasowe 14 enzymów z tkanek ssaczych i 2 sekwencje enzymów z muszki owocowej *Drosophila* [15, 16]. Pośród fosfolipaz C można wyróżnić trzy główne typy, nazwane: PLC β (155 kDa), PLC γ (145 kDa) i PLC δ (85 kDa). Cząsteczka każdej fosfolipazy C zbudowana jest z pojedynczego łańcucha białkowego. W obrębie każdego typu fosfolipazy C można wyróżnić kilka izoenzymów. I tak zidentyfikowano wśród fosfolipaz C typu β izoenzymy: β1, β2, β3, β4 i norpA (enzym z *Drosophila*). W przypadku fosfolipazy C typu γ znaleziono izoenzymy γ1 i γ2. Natomiast fosfolipaza C typ δ występuje w postaci izoenzymów δ1, δ2, δ3, δ4 [13]. Fosfolipazy C poszczególnych typów są w małym stopniu homologiczne. W obrębie struktury każdego z izoenzymów fosfolipazy C, znaleziono tylko dwa homologiczne konserwatywne regiony, które oznaczono X i Y (Ryc. 2). Domena X składa się z około 170 aminokwasów, a domena Y z 260 aminokwasów [11, 16]. Wszystkie izoenzymy fosfolipazy C zawierają około 300 aminokwasów, które poprzedzają domenę X od N końca. Izoenzymy typu β i δ zawierają krótką sekwencję 50-70 aminokwasów rozdzielającą domeny X i Y [15-17].

W izoenzymach typu γ, pomiędzy domenami X i Y występuje region około 400 aminokwasów, w którym zawarta jest struktura homologiczna do struktury *src*. Można w niej wyodrębnić domeny SH2 i SH3, występujące również w kinazach tyrozynowych rodziny *src* [18]. W izoenzymach PLC β znajduje się około 450 aminokwasów między domeną Y a C końcem. Region ten jest znacznie krótszy w izoenzymach fosfolipazy C γ oraz fosfolipazy C δ [19]. Wszystkie ssacze izoenzymy fosfolipazy C zawierają również jedną lub dwie domeny PH (domena po raz pierwszy opisana w białku plekstrynie) składające się z około 100 aminokwasów. Domeny te obecne są u wielu białek sygnałowych [20, 21]. W izoenzymach PLC domena PH położona jest na N końcu łańcucha białkowego. Izoenzymy γ posiadają dodatkową domenę PH położoną między domenami X i Y, która jest rozdzielona domenami SH (Rys. 2) [22]. Większość białek posiadających domenę PH jest białkami które do aktywacji



Ryc. 2 Organizacja łańcuchów peptydowych trzech podstawowych typów fosfolipazy C. Jediną cechą strukturalnie wspólną w obrębie wszystkich dotąd poznanych izoenzymów jest obecność domen X i Y oraz domeny PH. Identyfikacja pomiędzy poszczególnymi izoenzymami w obrębie domeny X i Y wynosi odpowiednio około 60% i 40%. Domena PH uczestniczy w wiązaniu z PIP₂.

wymagają asocjacji z błoną komórkową. Wykazano, że w obrębie domeny PH znajdują się miejsca o dużym powinowactwie do PIP_2 [24, 25]. Wskazywać to może na PIP_2 jako miejsce wiązania pewnej klasy białek sygnałowych.

W piśmiennictwie można również znaleźć informacje na temat fosfolipazy C o ciężarze cząsteczkowym 57-70 kDa [23, 26-29]. Enzym ten oznaczono symbolem PLC α . Na podstawie struktury cDNA opublikowano sekwencję aminokwasową tego enzymu [27], brakuje jednak dotąd informacji o ekspresji aktywnego enzymu. Struktura sklonowanej fosfolipazy C α nie jest podobna do struktur innych znanych fosfolipaz C [27], jest natomiast niemal identyczna ze strukturą uprzednio wyizolowanego z mikrokosmków wątroby bliżej nie scharakteryzowanego białka o masie 58 kDa, które nie wykazuje aktywności fosfolipazy C [30]. Można przypuszczać, że izolowane małe białka o aktywności fosfolipazy C są w rzeczywistości fragmentami proteolizy znanych fosfolipaz C. Wykazano, że we frakcji błonowej przeciwciała przeciw fosfolipazie C δ reagują z białkami o masach 45 i 43 kDa [31]. Stwierdzono również, że fosfolipaza C δ ulega łatwo proteolizie w miejscu między domenami X i Y. Powstałe fragmenty o masach 30 i 40 kDa posiadają zdolność oddziaływania ze sobą z wytworzeniem struktury o masie 70 kDa posiadającej aktywność fosfolipazy C [32].

III. Właściwości katalityczne fosfolipazy C

Aktywność fosfolipazy C zależy od Ca^{2+} zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [33-37]. W zależności od substratu i typu fosfolipazy C, wpływ Ca^{2+} na aktywność enzymu obserwuje się zarówno w zakresie stężeń mikromolowych jak i milimolowych. Dotychczas nie ma danych na temat bezpośredniego wiązania Ca^{2+} przez fosfolipazę C. Mutacje lub delecje wprowadzone w obrębie domeny PLC δ (144-236) zawierającej motyw EF (struktura uczestnicząca w wiązaniu wapnia) prowadzą do znacznego obniżenia aktywności enzymu, lecz nie znoszą zależności aktywności od Ca^{2+} , co zdaje się wskazywać na istnienie większej liczby miejsc wiążących wapń [38]. Inni autorzy postulują, że miejscem wiązania wapnia w fosfolipazie C jest domena Y, która w części jest homologiczna z domenami wiążącymi Ca^{2+} w fosfolipazie A_2 i kinazie białkowej C [39].

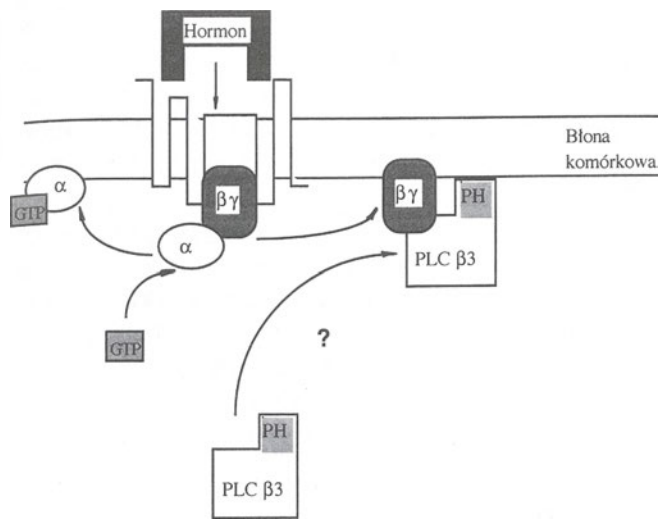
Substratem fosfolipaz C wszystkich typów są trzy fosfolipidy zawierające inozytol, tj.: fosfatydyloinozytol (PI), fosfatydyloinozytolo 4-fosforan (PIP) i fosfatydyloinozytolo 4,5-bisfosforan (PIP_2), przy czym PIP_2 i PIP są substratami preferowanymi. Powinowactwo poszczególnych fosfolipaz C do PIP_2 przedstawia się następująco: PLC $\beta >$ PLC $\delta >$ PLC γ [41]. Inne fosfatydyloinozytolo fosforany występujące w komórce w niewielkich ilościach, jak fosfatydyloinozytolo 3-fosforan, fosfatydyloinozytolo 3,4-bisfosforan i fosfatydy-

loinozytolo 3,4,5-trisfosforan, nie są hydrolizowane przez żaden z izoenzymów fosfolipazy C [40, 41]. Jak wspomniano powyżej, produktami reakcji katalizowanej przez fosfolipazę C jest diacyloglicerol oraz IP_3 . Wykazano, że IP_3 powstaje w postaci cyklicznej oraz jako produkt niecykliczny [43]. Najwięcej cyklicznego inozytolotrisfosforanu powstaje w reakcji katalizowanej przez PLC β , a najmniej w reakcji katalizowanej przez PLC γ [43]. Analiza stereochemiczna powstawania IP_3 wykazała, że w reakcji katalizowanej przez fosfolipazę C najpierw powstaje cykliczny produkt, który jest uwalniany bądź przemieniany do związku niecyklicznego [44]. Wykazano, że komórki z mniejszą zawartością cyklicznego IP_3 rosną w hodowli komórkowej do gęstości niższej niż komórki z wyższą zawartością tego związku, co sugeruje, że stężenie cyklicznego IP_3 może regulować proliferację komórek [1].

IV. Regulacja aktywności izoenzymów fosfolipazy C

IV-1. Regulacja aktywności izoenzymów fosfolipazy C typu β

Toksyna krztuśca podobnie jak toksyna cholery może katalizować ADP-rybozylację białek G co powoduje zmianę ich właściwości. Wpływ toksyny krztuśca na przebieg niektórych przemian komórkowych wskazuje pośrednio na udział białek G w tych przemianach. Dlatego, obserwowane w niektórych komórkach zahamowanie przez toksynę krztuśca hormonalnej stymulacji fosfolipazy C, wskazuje na udział białek G w przekazywaniu informacji od receptora do fosfolipazy C [45, 46]. Wykazano również, że w komórkach niewrażliwych na tę toksynę, nie podlegające metabolizmowi analogi GTP, oraz fluorek glinowy zwiększają efektywność hydrolizy endogenego PIP_2 [46-50]. Fakt ten wskazuje na udział innego rodzaju białek G w regulacji aktywności fosfolipazy C. Naturę białek G niewrażliwych na toksynę krztuśca zbadano niedawno, i zakwalifikowano je jako podrodzinę G_q . Otrzymano i określono sekwencję szeregu cDNA odpowiadających nieznanym uprzednio podjednostkom α podrodziny G_q [51-53]. Obecnie znanych jest 15 różnych podjednostek $G\alpha$, które na podstawie sekwencji aminokwasowej zostały pogrupowane w cztery podrodziny; G_s , G_i/G_o , G_q i G_{12} . W białkach podrodziny G_q występują podjednostki $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ i $G\alpha_{16}$ [15]. Wykazano, że $G\alpha_q$ i $G\alpha_{11}$ aktywują fosfolipazę C $\beta 1$, natomiast nie mają wpływu na aktywność fosfolipazy C $\gamma 1$ i fosfolipazy C $\delta 1$ [54, 55]. Białko $G\alpha_{11}$ połączone z receptorem purynergicznym P_{2y} aktywuje fosfolipazę C $\beta 1$ w erytrocytach indyka [56, 57]. Ekspresja $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ i $G\alpha_{16}$ w komórkach linii Cos-7 i następnie użycie błon tych komórek w badaniach nad aktywacją fosfolipazy C $\beta 1$ i $\beta 2$ wykazało, że wszystkie cztery białka G stymulują aktywność obu izoenzymów. Najbardziej efektywnymi



Ryc. 3 Przypuszczalny mechanizm aktywacji fosfolipazy C β przez białko α_q . Znak zapytania wskazuje, że nie jest znany mechanizm przemieszczenia fosfolipazy C β z cytoplazmy do miejsca związania z białkiem α_q . Na rysunku przedstawiona jest PLC $\beta 1$ jako izoenzym najbardziej podatny na stymulację przez α_q . Jak to zaznaczono w tekście, inne izoenzymy PLC β również ulegają aktywacji przez α_q lecz w znacznie mniejszym stopniu.

w aktywacji fosfolipazy C $\beta 1$ okazały się białka $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, natomiast fosfolipaza C $\beta 2$ jest najbardziej stymulowana przez $G\alpha_{16}$ [58]. Wyniki te wskazują na specyficznosc oddziaływania białek G z poszczególnymi izoenzymami fosfolipazy C β . Doświadczenia z trzema subtypami receptora α adrenergicznego tj. α_{1A} , α_{1B} i α_{1C} wykazały, że każdy z tych receptorów oddziałuje ze swoistym izoenzymem fosfolipazy C β poprzez odpowiednie białko G [59]. Spośród receptorów, które po aktywacji stymulują fosfolipazę C poprzez białka $G\alpha_q$ i $G\alpha_{11}$ wymienić można receptory tromboksanu A_2 , bradykininy, angiotensyny, histaminy, wazopresyny i acetylocholino (Ryc. 3) [61-64].

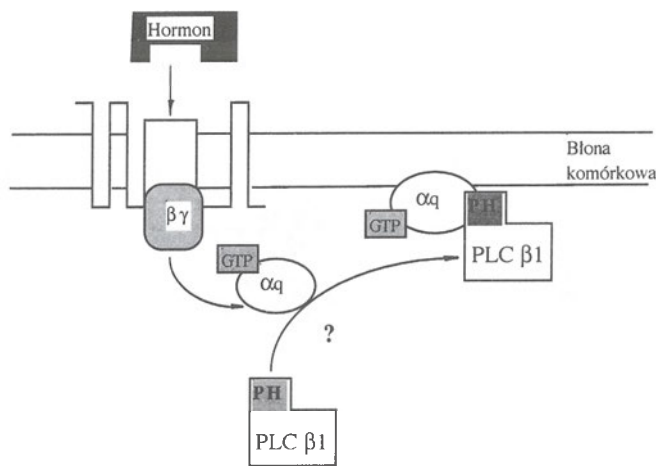
Hormonalna aktywacja fosfolipazy C w komórkach jajnika chomika, mięśniówki gładkiej naczyń, komórkach hodowlanych HL-60 granulocytów i komórkach mezangialnych nerki hamowana jest przez toksynę krztusca [45, 65-67]. Doświadczenia przeprowadzone z użyciem ludzkich granulocytów linii HL-60 wykazały, że za aktywację fosfolipazy C typu β w komórkach tych odpowiedzialna jest dimeryczna podjednostka $\beta\gamma$ białka G (Ryc. 4) [68]. Dalsze badania wykazały, że podjednostka $\beta\gamma$ aktywuje fosfolipazę C $\beta 2$ [69, 70]. Receptorami których aktywacja prowadzi do stymulacji PLC β za pomocą dimerycznego białka $\beta\gamma$ są receptory muskarynowe podtyp m2 i m4 oraz receptor dla interleukiny 8 [71]. W oddziaływaniu PLC β z białkami G biorą udział różne domeny białkowe tego enzymu. Podjednostka α białka G_q oddziałuje z regionem C końcowym PLC β leżącym za domeną Y, natomiast dimer $\beta\gamma$ posiada powinowactwo do N końcowego fragmentu PLC β zawierającego domenę PH [72, 73]. Obecność osobnych miejsc w obrębie których dochodzi do oddziaływania PLC β z białkami G wskazuje, że izoenzymy PLC β mogą być aktywowane

addytywnie przez podjednostki białek G. Podatność poszczególnych izoenzymów PLC β na aktywację przez białka G jest różna. Wrażliwość izoenzymów PLC β na stymulujące działanie $G_q\alpha$ maleje w kolejności $\beta 1 > \beta 3 > \beta 4 > \beta 2$ [74, 75]. Z kolei dimeryczne białko $\beta\gamma$ najbardziej aktywuje PLC $\beta 3$, słabiej PLC $\beta 2$ i najsłabiej PLC $\beta 1$ [76, 77]. Izoenzym PLC $\beta 4$ nie jest aktywowany przez białko $\beta\gamma$ [75]. Przytoczone powyżej dane wskazują na różnorodność mechanizmów biorących udział w kontroli aktywności PLC typu β , co przy zróżnicowanym poziomie ekspresji poszczególnych izoenzymów w różnych typach komórek zabezpiecza precyzyjną regulację aktywności tego enzymu.

IV-2. Regulacja aktywności izoenzymów fosfolipazy C typu γ

Polipeptydowe czynniki wzrostu, takie jak płytkowopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu naskórka (EGF), czynnik stymulujący komórki macierzyste (CSF-1), czynnik wzrostu nerwów (NGF) oraz insulina wywierają swój wpływ na komórkę docelową poprzez przyłączenie do receptorów obecnych w błonie komórkowej. Wszystkie te receptory oprócz podobnej budowy posiadają w swojej cytoplazmatycznej domenie aktywność kinazy tyrozynowej.

Aktywacja receptora np. PDGF lub EGF powoduje autofosforylację jego domeny cytoplazmatycznej, czemu towarzyszy przemieszczenie fosfolipazy C z cytoplazmy do przestrzeni błonowej [78, 79]. Dalsze badania wykazały, że dochodzi do związania fosfolipazy C typu γ z ufosforylowaną domeną receptora. Wśród pięciu autofosforylowanych miejsc receptora EGF miejscem wiążącym fosfolipazę C $\gamma 1$ jest Tyr-992 [80, 81]. Po aktywacji receptora NGF, PDGF lub EGF obserwuje się również fosforylację fosfolipazy

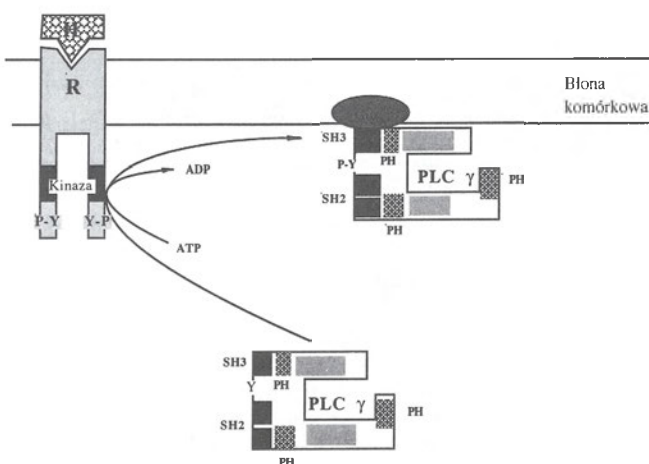


Ryc. 4 Mechanizmu aktywacji fosfolipazy C β przez dimeryczną podjednostkę $\beta\gamma$ białka G. Znak zapytania wskazuje, że nie jest znany mechanizm przemieszczenia PLC β z cytoplazmy do miejsca związania z podjednostką $\beta\gamma$ białka G. Na rysunku przedstawiona jest PLC $\beta 3$ jako izoenzym najbardziej podatny na stymulację przez $\beta\gamma$. Izoenzymy $\beta 1$ i $\beta 2$ znacznie słabiej są aktywowane przez $\beta\gamma$. Izoenzym $\beta 4$ nie jest aktywowany przez $\beta\gamma$.

C γ [82-84]. W komórkach posiadających wszystkie trzy typy fosfolipazy C stymulacja receptora NGF powoduje fosforylację tylko typu γ a nie β lub δ [85, 86]. Stymulacja receptora insulinowego lub CSF-1 nie wpływa na aktywność fosfolipazy C i nie obserwuje się fosforylacji żadnego izoenzymu fosfolipazy C [87, 88], pomimo dużego podobieństwa strukturalnego tych dwóch receptorów do receptorów dla takich czynników wzrostu jak: EGF, NGF, PDGF lub EGF.

W obrębie cząsteczki fosfolipazy C γ zidentyfikowano cztery miejsca fosforylacji. W wyniku stymulacji receptora EGF w fosfolipazie C γ 1 ulegają fosforylacji reszty tyrozynowe w pozycji 771, 783, 1254 oraz 472 [82, 89]. Natomiast w cząsteczce fosfolipazy C γ 2 znaleziono tylko dwa miejsca fosforylacji Tyr-753 i Tyr-759 [19]. Fosforylacja fosfolipazy C γ nie wpływa na aktywność enzymu w oznaczeniach *in vitro* z egzogennym PIP₂ jako substratem. Przy użyciu techniki mutacji punktowej wykazano, że fosforylacja Tyr-783 i Tyr-1254 niezbędna jest do aktywacji fosfolipazy C γ 1 *in vivo* [55, 70]. Wykazano, że tylko enzym ufosforylowany posiada zdolność do hydrolizowania substratu związanego z białkiem typu profaliny [90, 91]. Przypuszcza się, że w warunkach *in vivo* znaczna część substratu dla fosfolipazy C czyli PIP₂ występuje w formie związanej z profaliną i innymi białkami cytoszkieletu [109].

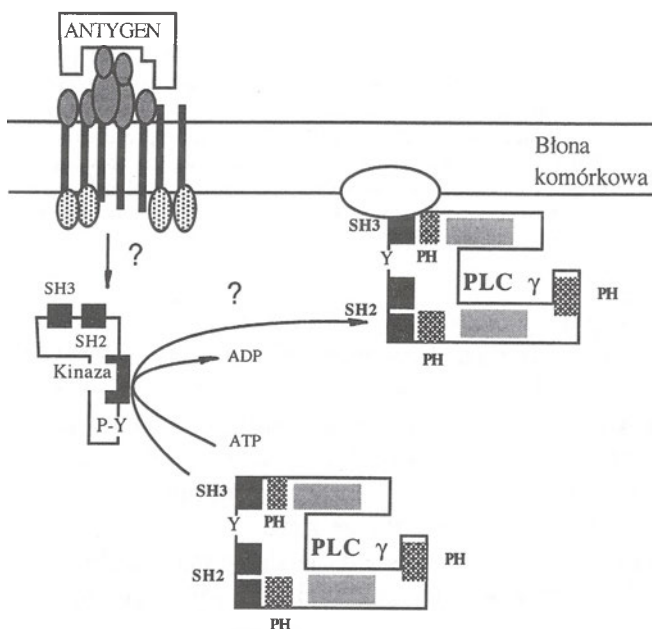
Przedstawione powyżej dane wskazują, że fosforylacja izoenzymów fosfolipazy C typu γ jest koniecznym warunkiem ich aktywacji. W komórkach niektórych typów w przenoszeniu sygnału od receptora EGF bierze udział białko G. W hepatocytach indukowane przez EGF wytwarzanie IP₃ oraz diacyloglicerolu hamowane jest przez toksynę krztuśca, nie jest zahamowana natomiast fosforylacja fosfolipazy C γ [92-94]. Ponadto obserwuje się indukowane przez EGF wiązanie białka Gi_α z fosfolipazą C γ . Mikrowstrzyknięcie do pojedynczej komórki hepatocytu przeciwciał przeciwko Gi_α hamuje indukowany przez EGF wzrost Ca²⁺ [94]. Dane te wskazują, że fosforylacja fos-



Ryc. 5 Mechanizm stymulacji fosfolipazy C γ przez receptor zawierający w swojej strukturze kinazę tyrozynową. W niektórych typach komórek w procesie tym uczestniczy również białko Gi_α. Y, tyrozyna; Y-P, fosfotyrozyna.

folipazy C γ w odpowiedzi na stymulację receptora EGF jest warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym do aktywacji enzymu. Na rycinie 5 przedstawiono przypuszczalny mechanizm aktywacji fosfolipazy C γ z udziałem receptorowej kinazy tyrozynowej.

Fosforylację reszt tyrozynowych prowadzącą do aktywacji izoenzymów fosfolipazy C typu γ obserwuje się również w wyniku działania kinaz tyrozynowych nie związanych z receptorem, które są aktywowane w wyniku pobudzenia receptorów w limfocytach, w zasadochłonnnych komórkach białaczkowych, monocytach i komórkach NK (Ryc. 6) [95-99]. Fosfolipaza C γ 1 jest fosforylowana w limfocytach T w od-



Ryc. 6 Aktywacja fosfolipazy C γ przez receptor antygenowy z udziałem cytosolowej kinazy tyrozynowej. Znak zapytania wskazuje, że nie jest znany mechanizm oddziaływania receptora z cytoplazmatyczną kinazą tyrozynową oraz późniejsze przemieszczenie ufosforylowanej PLC γ do błony komórkowej. Y, tyrozyna; Y-P, fosfotyrozyna.

powiedzi na aktywację kompleksu receptorów (TCR) [100, 101]. Za fosforylację reszt tyrozynowych w PLC γ odpowiadają kinazy należące do rodziny src, p56^{lck} i p59^{lyn} w limfocytach T oraz p56^{lck} i p53^{lyn} w limfocytach B [102]. W limfocytach B głównym substratem kinaz tyrozynowych jest PLC γ 2 [103]. Związanie antygeny z receptorem IgE w białaczkowych komórkach zasadochłonnnych RBL indukuje fosforylację reszt tyrozynowych w PLC γ 1 [91]. Natura i mechanizm oddziaływania niereceptorowych kinaz tyrozynowych, fosfolipazy C i receptorów leukocytów, jak na razie, nie są znane.

IV-3. Regulacja aktywności izoenzymów fosfolipazy C typu δ

Aktywność fosfolipazy C typu δ stymulowana jest przez Ca²⁺, poliaminy oraz białka zasadowe [34, 105]. Przypuszcza się, że rolę fizjologicznego regulatora

fosfolipazy C δ może odgrywać spermina, której poziom w komórce zmienia się wraz z rozwojem komórki [106, 107]. Jak dotąd, nie znany jest żaden receptorowy mechanizm aktywacji tej fosfolipazy C. Żaden izoenzym fosfolipazy C δ nie jest substratem kinaz tyrozynowych. Białka G regulujące fosfolipazę C β nie mają wpływu na aktywność fosfolipazy C δ . Być może regulacja aktywności PLC δ jest związana z innymi białkami należącymi do rodziny białek Ras. Ostatnio wykazano, że PLC δ 1 jest aktywowana przez białko p122-RhoGAP będące aktywatorem GTPazowym dla białka Rho A [108]. Wskazywać to może na udział PLC δ 1 w regulacji organizacji białek cytoszkieletu. Wykazano, że w erytrocytach około 70% PIP₂ uczestniczy w wiązaniu białek cytoszkieletu tzw. frakcji 4.1 z błoną komórkową [108]. Aktywacja PLC δ 1 i hydroliza PIP₂ może zatem pociągać zmianę architektury i oddziaływania białek cytoszkieletu. Wykazano, że izoenzym δ 1 wiąże się z błonami fosfolipidowymi zawierającymi PIP₂ lub sfingomielinę (SM) [110, 111]. Na podstawie stężeń fosfolipidów potrzebnych do związania fosfolipazy C δ 1 w 50% oraz zawartości PIP₂ i SM w komórce można wnioskować, że znacząca część tego enzymu może występować *in vivo* w formie związanej z błoną komórkową [111]. Potwierdzeniem tej hipotezy może być doniesienie o wybiórczym wiązaniu się fosfolipazy C δ 1 z miejscami syntezy PIP₂ w obrębie błon miocytów psa [112]. Badania z użyciem fosfolipazy C δ 1 oczyszczonej z wątroby szczura oraz fosfolipazy C δ 1 z ludzkich fibroblastów indukowanej w *E. coli* pokazały, że aktywność tego izoenzymu silnie zależy od sfingomieliny oraz jej metabolitów [113, 114]. Wykazano, że sfingomielina jest silnym inhibitorem PLC δ 1, podczas gdy sfingozyna (metabolit sfingomieliny oraz silny inhibitor kinazy białkowej C) stymuluje ten enzym [113].

Dane powyższe wskazywać mogą na powiązanie regulacji aktywności PLC δ 1 z metabolizmem sfingomieliny. Do zmian zawartości sfingomieliny w komórce dochodzi zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w niektórych stanach patologicznych [115-120]. Zainteresowanie sfingolipidami utrzymuje się od momentu odkrycia, że produkty rozpadu tej klasy lipidów są aktywne biologicznie. Sfingolipidy i lizosfingolipidy wpływają na ważne funkcje komórki oraz przejawiają właściwości przeciwnowotworowe w wielu komórkach zwierzęcych [21]. Dane na temat metabolizmu sfingomieliny w komórce, zdają się wskazywać na udział tych przemian w przekazywaniu informacji wewnątrz komórki [122, 123]. Zależność regulacji fosfolipazy C δ 1 od metabolizmu sfingomieliny może być ogniwem wiążącym szlak przenoszenia informacji, w którym kluczową rolę odgrywa fosfolipaza C typu δ ze szlakiem przekazywania informacji opartym o przemianę sfingomieliny.

IV-4. Regulacja aktywności fosfolipazy C przez kinazę białkową C i kinazę białkową A

W komórkach niektórych typów aktywacja kinazy białkowej C oraz kinazy A osłabia stymulowaną receptorowo aktywność fosfolipazy C. Wskazywać to może na kontrolę aktywności fosfolipazy C na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Wykazano, że w komórkach glejaka C6Bul, komórkach 3T3 oraz ludzkich białaczkowych limfocytach T fosfolipaza C typu γ może być fosforylowana na reszcie serynowej (Ser-1248) w sposób zależny od cAMP przez kinazę białkową A [124, 127]. Fosfolipaza C typu β i δ nie ulega takiej fosforylacji. Fosfolipaza C γ może być również negatywnie regulowana przez kinazę białkową C. W komórkach mięśni gładkich linii Jurkat potraktowanych estrem forbolu (octan mirystoilo forbolu — PMA) obserwuje się fosforylację reszty serynowej 1248 fosfolipazy C γ 1 [124]. Fosforylacja taka zmienia oddziaływanie fosfolipazy C γ z niereceptorowymi kinazami tyrozynowymi lub fosfatazą tyrozynową [128]. Inną drogą, na której kinaza białkowa białkowa C reguluje aktywność fosfolipazy C γ jest fosforylacja receptora, odpowiedzialnego za stymulację PLC γ . Fosforylacja Thr-654 receptora EGF przez PKC obniża zdolność receptorowej kinazy tyrozynowej do fosforylacji fosfolipazy C γ 1, co zapobiega jej aktywacji [129].

Również fosfolipaza C typu β fosforylowana jest przez kinazę białkową C. Potraktowanie komórek PC12, C6Bul lub NIH 3T3 estrem forbolu powoduje fosforylację Ser-887 fosfolipazy C β 1, natomiast nie dochodzi do fosforylacji fosfolipazy C typu γ i δ [130]. Również w warunkach *in vitro* oczyszczona fosfolipaza C β 1 fosforylowana jest przez PKC w pozycji Ser-887 [130]. Dotychczas nie jest znana rola i znaczenie tej fosforylacji.

V. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie izoenzymów fosfolipazy C

Funkcjonowanie cyklu przemian fosfoinozytoli w błonie komórkowej od szeregu lat jest tematem intensywnych badań [131-133]. Obecność aktywności fosfolipazy C stwierdzono również w jądrach komórek fibroblastów linii NIH 3T3, linii Swiss 3T3 oraz komórek wątroby [134-136]. Badania immunocytochemiczne wykazały, że poszczególne izoenzymy fosfolipazy C występują w różnych przestrzeniach komórki oraz, że stymulacja odpowiednich receptorów powoduje przemieszczenie poszczególnych typów fosfolipazy C w obrębie komórki. W komórkach fibroblastów linii Swiss 3T3 fosfolipaza C typu γ obecna jest w cytoplazmie, a fosfolipaza C typu β w jądrze komórkowym [136]. Stymulacja komórek 3T3 insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF) indukuje wytwarzanie IP₃ prawie wyłącznie w jądrze komórkowym. W komórkach tych nie stwierdzono obecności fosfolipazy C δ w cytoplazmie i frakcji jądrowej [136]. Immunocytochemiczna analiza komórek nowotworowych rdzenia nadnerczy linii PC12 wykazała, że fos-

folipaza C γ występuje w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym, natomiast fosfolipaza C δ obecna jest tylko w cytoplazmie. Z kolei fosfolipaza C β znajduje się wyłącznie w jądrze tych komórek [138]. Badania z użyciem izolowanych jąder komórek wątroby wskazują, że jedynym typem fosfolipazy C występującym w jądrze tych komórek jest fosfolipaza C typu β 1, jakkolwiek frakcja jądrowa stanowi tylko 5% komórkowej zawartości tego izoenzymu [31]. W szczurzych fibroblastach płodowych fosfolipaza C γ obecna jest w formie wolnej w cytoplazmie oraz w formie związanej z filamentami aktyny. Stymulacja tych komórek przez PDGF powoduje zwiększone nagromadzenie PLC γ w miejscach kontaktu błony komórkowej z filamentami aktyny [139].

Dane te wskazują, że rozmieszczenie poszczególnych izoenzymów fosfolipazy C zależy od typu komórki. Ponadto można przypuszczać, że w różnych organellach komórki cykl inozytolowy jest kontrolowany przez różne izoenzymy fosfolipazy C.

VI. Rola fosfolipazy C w patofizjologii

Z uwagi na to, że fosfolipaza C odgrywa znaczącą rolę w aktywacji szeregu funkcji w komórce można przypuszczać, że w wielu stanach patologicznych dochodzi do zaburzeń w funkcjonowaniu tego enzymu. Stwierdzono, że w nadciśnieniu samoistnym aktywność fosfolipazy C w komórkach kanalika proksymalnego nerki szczura jest podwyższona [140]. Doświadczenia z użyciem skrawków kory nerki szczura wykazały, że odpowiedź nerki na dopaminę, mierzona wzrostem aktywności fosfolipazy C jest niższa u szczurów z nadciśnieniem samoistnym [140]. U szczurów z nadciśnieniem wywołanym przez podawanie octanu deoksykortikosteronu jednocześnie z hipertonicznym roztworem soli aktywność fosfolipazy C jest podwyższona w komórkach rdzenia nerki, natomiast obniżona w korze nerki oraz w komórkach ścian tętnicznych [141]. Pomiary ilości PI_3 i diacyloglicerolu w komórkach aorty u szczurów z nadciśnieniem samoistnym wykazały, że ilość IP_3 i DAG u tych zwierząt jest znamienne wyższa niż u szczurów normalnych. Aktywność fosfolipazy C δ 1 w komórkach aorty zwierząt z nadciśnieniem samoistnym jest wyższa, a poziom PIP_2 obniżony [142]. Ponadto enzym ten jest bardziej wrażliwy na stymulujące działanie niskich stężeń Ca^{2+} [142]. Za podwyższoną wrażliwość fosfolipazy C δ 1 na stymulujące działanie wapnia odpowiedzialna jest jak wydaje się, mutacja punktowa w cząsteczce enzymu [142, 143]. Aktywność fosfolipazy C γ stymulowana jest przez szereg czynników wzrostu co wskazywać może na jej udział w przekazywaniu komórce sygnału do podziału. Mikrowstrzyknięcie fosfolipazy C γ lub β do fibroblastów indukuje syntezę DNA [144], która jest zahamowana po mikrowstrzyknięciu przeciwciał przeciw tym enzymom [145]. Wykazano, że szereg komórek nowo-

tworowych posiada podwyższoną aktywność fosfolipazy C. Komórki nowotworu piersi [146] oraz ludzkiego czerniaka [147] zawierają podwyższony poziom fosfolipazy C γ . Dane te sugerują, że podział komórek rakowych może być stymulowany przez podwyższony poziom fosfolipazy C. Szereg chorób neurodegeneracyjnych u ludzi związanych jest z akumulacją PLC δ w regionach mózgu zmienionych chorobowo [148]. U pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera stwierdzono, że enzym ten jest nadmiernie nagromadzony w zwojach neurofibryli i neuronach otaczających płamki starcze. Analiza techniką „Western blot” wykazała, że fosfolipaza C δ skoncentrowana jest we frakcji sparowanych filamentów helikalnych mózgu [149, 150]. Stwierdzono, że aktywność specyficzna tego enzymu jest znacznie obniżona w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera [151].

Artykuł otrzymano 28 marca 1996 r.
Zaakceptowano do druku 16 maja 1996 r.

Notatka uzupełniająca

Już po wysłaniu tego artykułu do druku, w *Nature** ukazał się artykuł poświęcony strukturze fosfolipazy C δ 1. Dane otrzymane w wyniku badań krystalograficznych wykazały, że enzym ten posiada w swojej N końcowej części cztery domeny EF, które są umieszczone parami w dwóch pętłach. Domena EF1 i EF2 uczestniczy w wiązaniu wapnia, podczas gdy domena EF3 i EF4 tworząca pętlę drugą nie posiadała związanego wapnia. Autorzy pracy na podstawie analizy struktury kryształu PLC δ 1 proponują mechanizm oddziaływania enzymu z błoną plazmatyczną, w którym to procesie brałyby udział domeny PH oraz domena C2. W zaproponowanym modelu domena PH zlokalizowana na N końcu cząsteczki miałaby odpowiadać za wiązanie enzymu do błony lipidowej, natomiast domena C2 (626-756 aa) odpowiadałaby za właściwą orientację enzymu w stosunku do substratu. W podsumowaniu autorzy stwierdzają, że architektura domen białkowych PLC δ 1 wskazuje na typ cząsteczki zdolnej do odwracalnej asocjacji z błoną plazmatyczną, co jest cechą charakterystyczną szeregu białek sygnałowych takich jak kinaza białkowa C, cytoplazmatyczna fosfolipaza A2 czy fosfatydylinoizytilo 3-kinaza.

Piśmiennictwo

1. Majerus PW (1992) *Annu Rev Biochem* 61: 225-250
2. Rana RS, Hokin LE (1990) *Physiol Rev* 70: 115-164
3. Irvine RF (1990) *FEBS Lett* 263: 5-9
4. Irvine RF (1991) *Bioassays* 13: 419-427
5. Nishizuka Y (1988) *Nature (London)* 334: 661-665
6. Nishizuka Y (1995) *FASEB J* 9: 489-496
7. Kikkakawa U, Nishizuka Y (1986) *Ann Rev Cell Biol* 2: 149-178
8. Meek DW, Street AJ (1992) *Biochem J* 287: 1-15
9. Downes CP, Macphee CH (1990) *Eur J Biochem* 193: 1-18
10. Mato JM (1990) W: *Phospholipid metabolism in cellular signaling*. C. R. S. Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, str 9-17

*Essen L-O, Perisic O, Cheung R, Katan M, Williams RL (1996) *Nature (London)* 380, 595-602

11. Rhee SG, Kim H, Suh P-G, Choi WC (1991) *Biochem Soc Trans* **19**: 337-341
12. Rhee SG, Suh PG, Ry S, Lee SY (1989) *Science* **244**: 546-550
13. Cockcroft S, Thomas GMH (1992) *Biochem J* **288**: 1-14
14. Dennis EA, Rhee S, Billa MM, Hannun YA (1991) *FASEB J* **5**: 2068-2077
15. Kriz R, Lin L-L, Sultzman L, Ellis C, Heldin C-H, Dawson T, Knopf J (1990) *W: Proto-Oncogenes in Cell Development* (Ciba Foundation Symposium 150) str 112-127, Wiley, Chichester, England
16. Rhee SG, Cho KD (1992) *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **26**: 35-60
17. Rhee SG (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 297-301
18. Koch AC, Anderson DA, Moran MF, Ellis C, Pawson T (1991) *Science* **252**: 668-674
19. Rhee SG, Choi KD (1992) *J Biol Chem* **267**: 12393-12396
20. Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Saraste M (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 343-348
21. Parker PJ, Hemmings BA, Gierschik P (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 54-55
22. Lee SB, Rhee SG (1995) *Current Opinon in Cell Biol* **7**: 183-189
23. Takenawa T, Nagai Y (1981) *J Biol Chem* **256**: 6769-6775
24. Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW (1994) *Nature (Lond)* **371**: 168-170
25. Cifuentes MC, Honkanen L, Rebecchi MJ (1993) *J Biol Chem* **268**: 11586-11593
26. Nakanishi O, Homma Y, Kawasaki H, Emori Y, Suzuki K, Takenawa T (1988) *Biochem J* **256**: 453-459
27. Bennett CF, Crooke ST (1987) *J Biol Chem* **262**: 13789-13797
28. Tomkins TA, Moscarello MA (1991) *J Biol Chem* **266**: 4228-4236
29. Griendling KK, Taubman MB, Akers M, Mendlowitz M, Alexander RW (1991) *J Biol Chem* **266**: 15498-15504
30. Martin JL, Pumford NR, LaRosa AC, Martin BM, Gonzaga HMS, Beaven MA, Pohl LR (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 679-685
31. Divecha N, Rhee SG, Letcher AJ, Irvine RF (1993) *Biochem J* **289**: 617-620
32. Ellis MV, Carne A, Katan M (1993) *Eur J Biochem* **213**: 339-347
33. Biden TJ, Peter-Riesch B, Schlegel W, Wollheim CB (1987) *J Biol Chem* **262**: 3567-3571
34. Fukui T, Lutz RJ, Lowenstein JM (1988) *J Biol Chem* **263**: 17730-17737
35. Sasakawa N, Nakaki R, Yamamoto S, Kato R (1987) *FEBS Lett* **223**: 413-416
36. Watson SP, Kai J, Sasaguri T (1990) *Br J Pharmacol* **99**: 212-216
37. Whitaker M, Aitchison M (1985) *FEBS Lett* **182**: 119-124
38. Nakushima S, Banno Y, Watanabe T, Nakamura Y, Mizutani T, Sakai H, Sugimoto Y, Nozawa Y (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **211**: 365-369
39. Clark JD, Lin L-L, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JW (1991) *Cell* **65**: 1043-1051
40. Lips DL, Majerus PW, Gorga FR, Young AT, Benjamin DL (1989) *J Biol Chem* **264**: 8759-8763
41. Serunian LA, Haber MT, Fukui T, Kim JW, Rhee SG, Lowenstein JM, Cantley LC (1989) *J Biol Chem* **264**: 17809-17815
42. Ryu SH, Suh PG, Cho KS, Lee KY, Rhee SG (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6649-6653
43. Kim JW, Ryu SH, Rhee SG (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 177-182
44. Bruzik KS, Morocho AM, Jhon D-Y, Rhee SG, Tsai M-D (1992) *Biochemistry* **31**: 5183-5193
45. Ashkenazi A, Peralta EG, Winslow JW, Ramachandran J, Capon DJ (1989) *Cell* **56**: 478-493
46. Chiba T, Raffoul K, Yamada T (1987) *J Biol Chem* **252**: 8467-8469
47. Baldassare JJ, Knipp MA, Henderson PA, Fisher GJ (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **154**: 351-357
48. Cockcroft S, Gompertes BD (1985) *Nature (London)* **314**: 534-536
49. Deckmyn H, Tu S-M, Majerus PW (1986) *J Biol Chem* **261**: 16553-16558
50. Litosch I, Wallis C, Fain JN (1985) *J Biol Chem* **260**: 5464-5471
51. Simon MI, Strathman MP, Gautam N (1991) *Science* **252**: 802-808
52. Smrcka AV, Helper JR, Brown KO, Sternweis PC (1991) *Science* **250**: 804-807
53. Taylor SJ, Smith JA, Exton JH (1990) *J Biol Chem* **265**: 17150-17156
54. Park D, Ihon D-Y, Kriz R, Knopf J, Rhee SG (1992) *J Biol Chem* **267**: 16048-16055
55. Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH (1991) *Nature (London)* **350**: 516-518
56. Morris AJ, Waldo GL, Downes CP, Harden TK (1990) *J Biol Chem* **265**: 13508-13514
57. Waldo GL, Boyer JL, Morris AJ, Harden TK (1991) *J Biol Chem* **266**: 14217-14225
58. Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MI (1992) *J Biol Chem* **267**: 16044-16047
59. Wu D, Katz A, Lee C-H, Simon MI (1992) *J Biol Chem* **267**: 25798-25802
60. Wong SK, Parker EM, Ross EM (1990) *J Biol Chem* **265**: 6219-6224
61. Bernstein G, Blank JL, Smrcka AV, Higashijima T, Sternweis PC, Exton JH, Ross EM (1992) *J Biol Chem* **267**: 8081-8088
62. Gutowski S, Smrcka AV, Nowak L, Wu D, Simon M, Sternweis PC (1991) *J Biol Chem* **266**: 20519-20524
63. Shenker A, Goldsmith P, Unson CG, Spiegel AM (1991) *J Biol Chem* **266**: 9303-9313
64. Wange RL, Smrcka AV, Sternweis PC, Exton JH (1991) *J Biol Chem* **266**: 11409-11412
65. Ashkenazi A, Winslow JW, Peralta EG, Petersen GL, Schimerlik MI, Capon DJ, Ramachandran J (1987) *Science* **238**: 672-675
66. Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM (1990) *Biochim Biophys Acta* **1031**: 163-224
67. LaBelle EF, Murray BM (1990) *FEBS Lett* **268**: 91-94
68. Camps M, Hou C, Sidiropoulos D, Stock JB, Jakobs KH, Gierschik P (1992) *Eur J Biochem* **206**: 821-831
69. Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P (1992) *Nature (London)* **360**: 684-686
70. Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, Margolis BL, Kim CK, Schlessinger J, Rhee SG (1991) *Cell* **65**: 435-441
71. Rhee SG (1994) *Signal-activated phospholipases* (Liscovith M, Austin RG wyd) Landes Company
72. Lee SB, Shin SH, Helper JR, Gilman AG, Rhee SG (1993) *J Biol Chem* **268**: 25952-25957
73. Touhara K, Ingelse J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 10217-10220
74. Jhon D-Y, Lee H-H, Park D, Lee C-W, Lee K-H, Yoo OJ, Rhee SG (1993) *J Biol Chem* **268**: 6654-6661
75. Lee C-W, Lee K-H, Lee SB, Park D, Rhee SG (1994) *J Biol Chem* **269**: 25335-25338
76. Park D, Jhon D-Y, Lee C-W, Lee K-H, Rhee SG (1993) *J Biol Chem* **268**: 4573-4576
77. Smrcka AV, Sternweis PC (1993) *J Biol Chem* **268**: 9667-9674
78. Kim U-H, Kim H-S, Rhee SG (1990) *FEBS Lett* **270**: 33-36
79. Todderud G, Wahl M, Rhee SG, Carpenter G (1990) *Science* **249**: 296-298
80. Rotin D, Margolis BL, Mohammadi M, Daly G, Daum G, Li N, Burgess W, Fischer EH, Ullrich A, Schlessinger J (1992) *EMBO J* **11**: 559-567
81. Vega QC, Cochet C, Filhol O, Chang CP, Rhee SG, Gill GN (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 128-135
82. Kim JW, Sim SS, Kim U-H, Nishibe S, Wahl MI, Carpenter G, Rhee SG (1990) *J Biol Chem* **265**: 3940-3943

83. Meisenhelder J, Suh P-G, Rhee SG, Hunter T (1989) *Cell* **57**: 1103-1122
84. Nishibe S, Wahl MI, Rhee SG, Carpenter G (1989) *J Biol Chem* **264**: 10335-10338
85. Homma Y, Sakamoto H, Tsunoda M, Aoki M, Takenawa T, Ooyama T (1993) *J Biochem* **290**: 649-653
86. Kim U-H, Fink DJR, Kim HS, Park DJ, Contreras ML, Guroff G, Rhee SG (1991) *J Biol Chem* **266**: 1356-1362
87. Downing JR, Margolis BL, Zilberstein A, Ashmun RA, Sheer UA, Schlessinger J (1989) *EMBO J* **8**: 3345-3350
88. Nishibe S, Wahl MI, Wedergaetner PB, Kim JJ, Rhee SG, Carpenter G (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 424-428
89. Wahl MI, Nishibe S, Kim JW, Rhee SG, Carpenter G (1990) *J Biol Chem* **265**: 3944-3948
90. Goldschmidt-Clermont PJ, Kim JW, Machesky LM, Rhee SG, Pollard TD (1991) *Science* **251**: 1231-1233
91. Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Baldassare JJ, Pollard TD (1990) *Science* **247**: 1575-1578
92. Yang-L, Baffy G, Rhee SG, Mannig DR, Hansen CA, Williamson JR (1991) *J Biol Chem* **266**: 22451-22458
93. Liang MN, Garrison JC (1991) *J Biol Chem* **266**: 13342-13349
94. Yang-L, Camoratto AB, Baffy G, Raj S, Manning DR, Williamson JR (1993) *J Biol Chem* **268**: 3739-3746
95. Azzoni L, Kamoun M, Salcedo TW, Kanakaraj P, Perussia B (1992) *J Exp Med* **176**: 1745-1750
96. Bianchini L, Todderud G, Grinstein S (1993) *J Biol Chem* **268**: 3357-3363
97. Kumada T, Fujimiya H, Miyata H, Banno Y, Nozawa Y (1992) *Aterugi* **41**: 1710-1716
98. Liao F, Shin HS, Rhee SG (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3659-3663
99. Ting AT, Karnitz LM, Schoon RA, Abraham RT, Leibson PJ (1992) *J Exp Med* **176**: 1751-1755
100. Secrist JP, Karnitz L, Abraham TT (1991) *J Biol Chem* **266**: 12135-12139
101. Wee S, Schieven GL, Kirihaara JM, Tsu TT, Ledbetter JA, Aruffo A (1993) *J Exp Med* **177**: 219-223
102. Cooke MP, Abraham KM, Forbush KA, Perlmutter RM (1991) *Cell* **65**: 281-291
103. Hempel WM, Schatzman RC, DeFranco AL (1992) *J Immunol* **148**: 3021-3027
104. Park DJ, Min HK, Rhee SG (1991) *J Biol Chem* **266**: 24237-24240
105. Haber TM, Fukui T, Lebowitz MS, Lowenstein JM (1991) *Arch Biochem Biophys* **288**: 243-249
106. Morgan DML (1990) *Biochem Soc Trans* **18**: 1080-1084
107. Pegg AE (1988) *Cancer Res* **48**: 759-774
108. Homma Y, Emori Y (1995) *EMBO J* **14**: 286-291
109. Gascard P, Pawełczyk T, Lowenstein JM, Cohen CM (1993) *Eur J Biochem* **211**: 671-681
110. Rebecchi M, Peterson A, McLaughlin S (1992) *Biochemistry* **31**: 12742-12747
111. Pawełczyk T, Lowenstein JM (1993) *Biochem J* **291**: 693-696
112. Wolf RA (1992) *Am J Physiol* **263**: C1021-C1028
113. Pawełczyk T, Lowenstein JM (1992) *Arch Biochem Biophys* **297**: 328-333
114. Pawełczyk T, Lowenstein JM (1993) *Biochem Pharmacol* **45**: 493-497
115. Barenholz Y, Thompson TE (1980) *Biochim Biophys Acta* **604**: 129-158
116. Barenholz Y, Gatt S (1982) *Phospholipids* (Hawthorne JN, Ansell GB wyd.) Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
117. Levin E, Johnson RM, Albert S (1958) *Arch Biochem Biophys* **73**: 247-254
118. Hostetler KY, Zenner BD, Morris HP (1979) *Cancer Res* **39**: 2978-2983
119. Engelman B, Streich S, Schonhauer UM, Richter WO, Duhm J (1992) *Biochim Biophys Acta* **1165**: 32-37
120. Fu YF, Dong YZ, Li H, Wang W (1992) *Chin Med J Engl* **105**: 803-808
121. Hannun YA, Bell RM (1989) *Science* **243**: 500-507
122. Dressler KA, Mathias S, Kolesnick RN (1992) *Science* **255**: 1715-1718
123. Matias S, Younes A, Kan C-C, Orlow I, Joseph C, Kolesnick RN (1993) *Science* **259**: 519-522
124. Bruns C, Marme D (1987) *FEBS Lett* **212**: 40-44
125. Burnatowska-Hledin MA, Spielman WS (1989) *J Clin Invest* **83**: 84-89
126. Kanaide H, Matsumoto T, Nakamura M (1986) *Biochem Biophys Res Commun* **140**: 195-203
127. Shaymn JA, Morrisey JJ, Morrison AR (1987) *J Biol Chem* **262**: 17083-17087
128. Park DJ, Min HK, Rhee SG (1992) *J Biol Chem* **267**: 1496-1501
129. Decker SJ, Ellis C, Pawson T, Velu T (1990) *J Biol Chem* **265**: 7009-7015
130. Go M, Yokoyama M, Akita H, Fukuzaki H (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **153**: 51-58
131. Kwiatkowska J (1989) *Post Biochem* **35**: 253-263
132. Barańska J, Czarny M (1991) *Post Biochem* **37**: 129-132
133. Poddana H, Barańska J (1991) *Post Biochem* **37**: 129-132
134. Divecha N, Banfic H, Irvine RF (1991) *EMBO J* **10**: 3202-3214
135. Smith CD, Wells WW (1983) *J Biol Chem* **258**: 9368-9373
136. Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L, Coco L (1992) *Nature (London)* **358**: 242-245
137. Payraastre B, Nievers M, Breton M, Verkleij A, Vanbergen en Henegouwen PMP (1992) *J Biol Chem* **267**: 5078-5084
138. Mazzomi M, Bertagnolo V, Neri LM, Carini C, Marchisio M, Milani D, Manzoli FA, Capitani S (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 114-120
139. McBride K, Rhee SG, Jaken S (1991) *Prot Natl Acad Sci USA* **88**: 7111-7115
140. Chen CJ, Vyas SJ, Eichberg J, Lokhandwala MF (1992) *Hypertension* **19**: 102-108
141. Uehara Y, Numabe A, Takada S, Hirakawa N, Matsuoka H, Ikeda Y, Yagi S, Sagimoto T (1991) *Jpn Circ J* **55**: 509-515
142. Kato H, Fukami K, Shibasaki F, Homma Y, Takenawa T (1992) *J Biol Chem* **267**: 6483-6487
143. Katsuya T, Higaki J, Miki T, Kohara K, Yagisawa H, Tanese H, Mikani H, Serikawa T, Nojima H, Ogihara T (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 1359-1366
144. Smith MR, Ryu S-H, Suh P-G, Rhee SG, Kung H-F (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3659-3663
145. Smith MR, Liu Y-I, Kim H, Rhee SG, Kung H-F (1990) *Science* **247**: 1074-1077
146. Arteaga CL, Johnson MD, Todderud G, Coffrey RJ, Carpenter G, Page DL (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10435-10439
147. Perella FW, Jankiewicz R, Dandrow EA (1991) *Biochim Biophys Acta* **1076**: 209-214
148. Shimohama S, Perry G, Richey P, Takenawa T, Whitehouse PJ, Miyoshi K, Suenaga T, Matsumoto S, Nishimura M, Kimura J (1993) *Neurosci Lett* **162**: 183-186
149. Shimohama S, Homma Y, Suenaga T, Fujimoto S, Taniguchi T, Araki W, Yamaoka Y, Takenawa T, Kimura J (1991) *Am J Pathol* **139**: 737-742
150. Shimohama S, Perry G, Richey P, Paprotnik D, Takenawa T, Fukami K, Whitehouse PJ, Kimura J (1995) *Brain Res* **669**: 217-224
151. Shimohama S, Fujimoto S, Matsushima H, Takenawa T, Taniguchi T, Perry G, Whitehouse PJ, Kimura J (1995) *J Neurochem* **64**: 2629-2634

Prenumerata „Postępów Biochemii” w 1996 r.

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

Sfingomielina i jej metabolity jako pośredniki w przenoszeniu sygnału w komórce

Sphingomyelin and its metabolites in cellular signal transduction

JOLANTA M. DZIK¹,
ELŻBIETA WAŁAJTYS-RODE²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wpływ metabolitów sfingomieliny na różnicowanie i proliferację komórek
II-1. Wpływ pochodnych sfingozyny na poziom kwasu fosfatydowego
- III. Rola metabolitów sfingomieliny w apoptozie
- IV. Wpływ sfingozyno-1-P na ruchliwość komórek nowotworowych
- V. Regulacja homeostazy wapniowej w komórce przez metabolity sfingomieliny
- VI. Rola metabolitów sfingomieliny w przenoszeniu sygnałów cytokin i czynników wzrostu w komórkach
VI-1. Receptory dla TNF
VI-2. Receptor Fas/APO-1
VI-3. Różne drogi przenoszenia sygnału pochodzącego od nSM-azy i aSM-azy
VI-4. Receptor PDGF
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Regulation of proliferation and differentiation by sphingomyelin metabolites
II-1. Influence of sphingosine derivatives on the level of phosphatidic acid
- III. Sphingomyelin metabolites in apoptosis
- IV. Sphingosine-1-P involvement in cancer cell motility
- V. Regulation of cellular calcium homeostasis by sphingomyelin metabolites
- VI. Sphingomyelin metabolites and cytokine and growth factor signal transduction
VI-1. TNF receptors
VI-2. Fas/APO-1
VI-3. Diversity of nSM-ase and aSM-ase induced signal pathways
VI-4. PDGF receptor
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: DAG — diacyloglicerol; PC — fosfatydylocholina; PC-PLC — fosfolipaza C swoista dla fosfatydylocholiny; PLA₂ — fosfolipaza A₂; PLD — fosfolipaza D; SM — sfingomielina; SP — sfingozyna; SPP — sfingozyno-1-fosforan; SPC — sfingozylfosfocholina; aSM-aza i nSM-aza — sfingomielinazy o optymalnym działaniu w pH odpowiednio kwaśnym i obojętnym; PA — kwas fosfatydowy; IP₃ — inozytolotrisfosforan; PMA = TPA, 12-o-tetradekanoilo-forbulo-13-octan — ester forbolu, EGF — nabłonkowy czynnik wzrostu; FGF — fibroblastowy czynnik wzrostu; PDGF — płytkowy czynnik wzrostu; PDGF-R — receptor dla PDGF; TNF — czynnik martwicy nowotworów; TNF-R — receptor dla TNF; NFκB, AP-1 — czynniki transkrypcyjne; I-κB — inhibitor NFκB; PKC — kinaza białkowa C; MAPK — kinazy białkowe aktywowane mitogenami; MEK — kinazy MAPK; SAPK, JMK — kinazy białkowe aktywowane stresem; Raf — kinaza białkowa Raf; CAPK — kinaza białkowa aktywowana ceramidem; PDK — „ukierunkowane proliną” serynowo/treoninowe kinazy białkowe; CAPP — fosfataza białkowa aktywowana ceramidem; PP-2A — fosfataza białkowa 2A; TRADD — białko homologiczne do domeny śmierci receptora TNF-R55; Fas/APO-1 — receptor z rodziny receptorów TNF.

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

² prof. dr hab., Zakład Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościańska 5, 02-516 Warszawa

I. Wstęp

W latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia *Thudichum* wyizolował i scharakteryzował składnik wyciągu eterowego mózgu, który nazwał sfingomieliną. Początkowo łączono obecność tego związku z funkcjonowaniem mózgu, ale po stwierdzeniu powszechnego występowania we frakcji lipidów błonowych i w mielinie zaczęto uważać, iż pełni on funkcje strukturalne. W następstwie odkrycia przez *Okazaki* i *Wsp.* [1], że witamina D₃ stymuluje aktywność sfingomielinazy działającej w zakresie obojętnego pH (nSM-aza), powodując nagromadzenie ceramidu w komórkach HL-60, rozpoczęto intensywne badania nad metabolizmem sfingomieliny jako potencjalną drogą przenoszenia sygnału w komórce. Wkrótce potem stwierdzono, że do czynników aktywujących nSM-azę należą również działające plejotropowo w organizmie cytokiny TNF-α, INF-γ i IL-1 [2]. Ważnym następnym etapem badań było wykazanie przez *Hannuna* i jego grupę [3], że krótkołańcuchowe, przechodzące przez błony komórkowe ceramidy, wywołują wiele biologicznych efektów identycznych do powodowanych aktywacją nSM-azy, co sprawiło, że

ceramidy zostały uznane za wtórne przekazniki sygnału. Najlepiej dotychczas scharakteryzowanym układem jest aktywacja nSM-azy przez TNF- α , dokonana przez zespół Kolesnicka [praca przeglądowa: 4]. Ostatnie badania wiążące działanie TNF- α z aktywacją błonowych kinaz białkowych i fosfatazy białkowej należącej do typu fosfatyzacji P-2A niewątpliwie stawiają sfingomielinę i jej metabolity w centrum zainteresowania badaczy nowych dróg przekazywania sygnałów w komórce [praca przeglądowa 5].

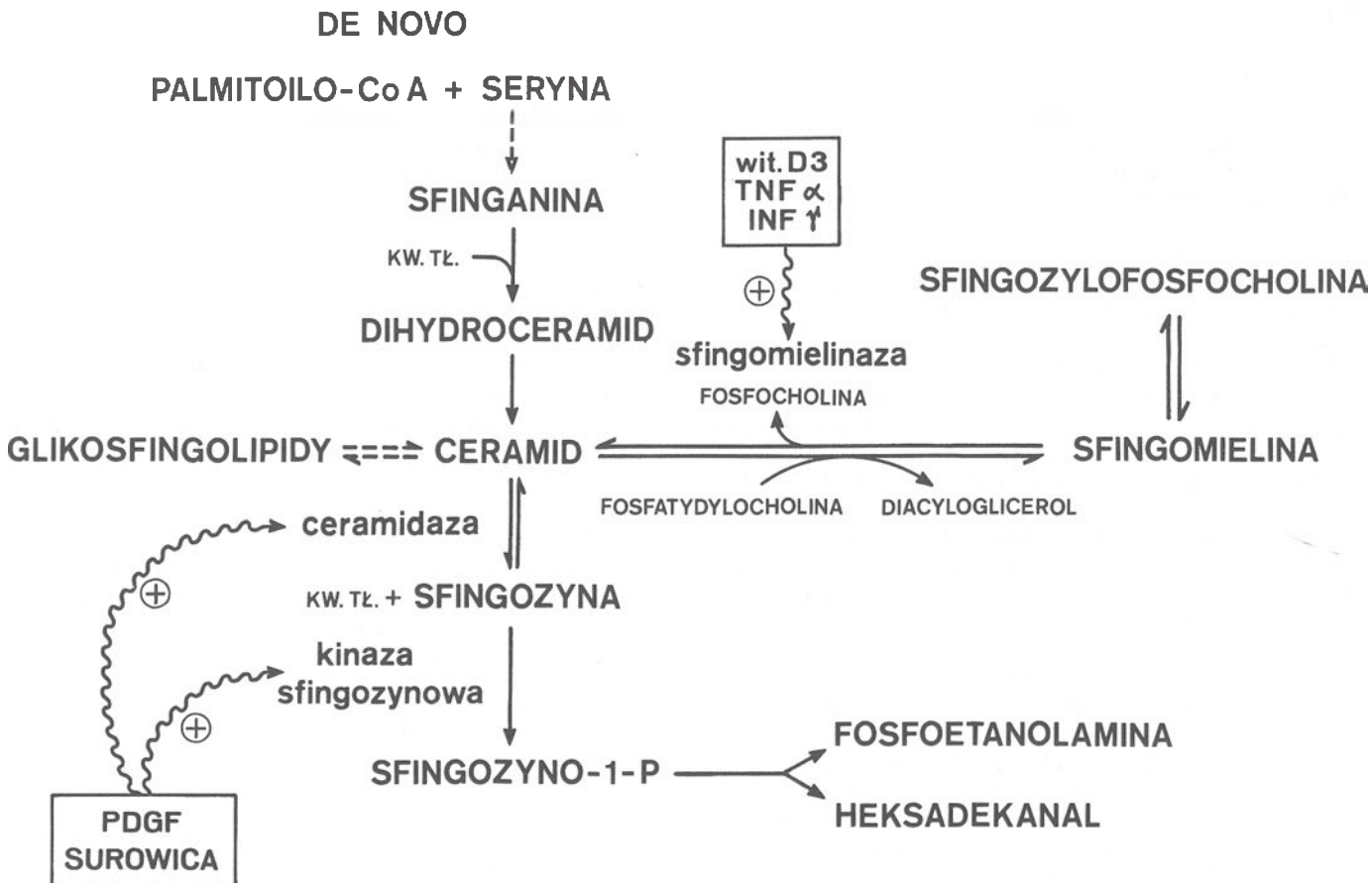
W „Postęпах Biochemii” ukazały się dotychczas dwa artykuły przeglądowe dotyczące roli sfingomielininy [6, 7] do których kierujemy czytelników, traktując naszą pracę jako uzupełnienie wiadomości o tej gwałtownie rozwijającej się dziedzinie badań.

II. Wpływ metabolitów sfingomielininy na różnicowanie i proliferację komórek

Analogicznie do różnych fosfolipaz, które wytwarzają wewnątrzkomórkowe wtórne przekazniki będące metabolitami glicerofosfolipidów zaproponowano, że sfingomielinaza działająca w obojętnym zakresie pH (nSM-aza) [fosfodiesteraza sfingomielinowa (EC 3.1.4.12)] może stanowić pierwszy etap w szlaku syg-

nałowym (Ryc. 1) [9, 10]. Enzym ten jest zlokalizowany wraz ze swym substratem na zewnętrznym listku błony plazmatycznej [11].

Stwierdzono, że hydroliza sfingomielininy ma znaczenie w różnicowaniu ludzkich promielocytów białczkowych HL-60 indukowanym przez witaminę D₃ [1, 12], czynnik martwicy nowotworów (TNF- α) i interferon- γ [2]. Ponadto Spiegel i wsp. [13] wykazali, że egzogenna sfingomielinaza stymulowała proliferację mysich fibroblastów 3T3, zaś dodana razem z takimi czynnikami wzrostowymi jak insulina, nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF) lub bombesyna, potęgowała ich działanie. Traktowanie komórek sfingomielinazą powodowało znaczący spadek poziomu sfingomielininy, czemu towarzyszył wzrost poziomu ceramidu. Egzogenne, krótkołańcuchowe ceramidy stymulowały włączanie radioaktywnej tymidyny i działały synergistycznie z wyżej wspomnianymi czynnikami wzrostu. Zatem ceramidy mogą być zaangażowane także w regulację proliferacji komórek, a nie tylko jako pośrednik w ich różnicowaniu. Z badań nad wpływem ceramidów i sfingozyny na proliferację i wzrost ludzkich keratynocytów DJM-1 wynika, że syntetyczne krótkołańcuchowe ceramidy promowały różnicowanie tych komórek, podczas gdy sfingozyna



Ryc. 1 Drogi metabolizmu sfingolipidów. Na podstawie prac przeglądowych [6-8], z uwzględnieniem następujących modyfikacji, odzwierciedlających obecne poglądy: (i) wprowadzenie podwójnego wiązania 4-trans odbywa się już po reakcji acylacji, zatem wolna sfingozyna nie jest pośrednikiem w syntezie sfingolipidów *de novo*; (ii) biosynteza sfingomielininy polega na przeniesieniu fosfocholiny z fosfatydylocholiny na ceramid i uwolnieniu diacyloglicerolu; (iii) sfingozyna, która powstaje w wyniku hydrolizy ceramidu, może być przemieniana z powrotem do ceramidu lub degradowana, co obejmuje fosforylację do sfingozyno-1-P oraz lityczny rozpad do fosforanu etanoloaminy i trans-2-heksadekanalu. Zaznaczono wpływ czynników regulatorowych. Dla uproszczenia pominięto niektóre substraty, produkty, a także nazwy enzymów.

stymulowała wzrost [14].

Sfingozyna, wraz z innymi długołańcuchowymi zasadami: stearyloaminą, 3-ketosfinganiną i sfinganiną hamuje specyficznie kinazę białkową C (PKC) [15], kluczowy enzym zaangażowany we wzrost i transformację nowotworową komórek. Działanie jej jest więc przeciwstawne działaniu diacyloglicerolu, który jest aktywatorem PKC [10, 16, 17]. Zhang i wsp. [18] pokazali, że niskie stężenia sfingozyny < 20 μM stymulują proliferację mysich fibroblastów spoczynkowych 3T3, a także, że sfingozyna potęguje odpowiedź komórek na czynniki wzrostowe działające niezależnie od PKC. Działanie sfingozyny może polegać na modulacji aktywności enzymów potencjalnie zaangażowanych w przenoszenie sygnałów: fosfolipazy D (PLD) [19, 20], fosfohydrolazy kwasu fosfatydowego [21], 80 kD izoenzymu kinazy diacyloglicerolowej [22] i kilku cytosolowych kinaz białkowych [23, 24].

Spółród metabolitów sfingomieliny obok sfingozyny także N,N-dimetylosfingozyna, SPP i sfingozylfosfocholina mają wpływ na proliferację komórek drogą niezależną od PKC. N,N-dimetylosfingozyna jest silniejszym niż sfingozyna inhibitorem kinazy białkowej C, a ponadto aktywuje kinazy tyrozynowe: kinazę src i kinazę receptora EGF [25, 26]. Sfingozyno-1-P jest silnym mitogenem dla mysich fibroblastów 3T3 [27]. W odpowiedzi na mitogenne stężenia sfingozyny poziom SPP wzrastał prawie dziesięciokrotnie. Mimo że SP i SPP działały synergistycznie z insuliną i EGF, nie obserwowano synergizmu ani addytywności, gdy zastosowano optymalne dawki SP (20 μM) i SPP (5 μM), co wskazuje, że oba związki modulują proliferację komórek tą samą drogą. Ponadto, kompetycyjny inhibitor kinazy sfingozynowej, DL-treo-dihydrosfingozyna [28], hamował zarówno powstawanie SPP jak i syntezę DNA [29].

Sfingozylfosfocholina jest silnym stymulatorem wzrostu wielu typów komórek [30]. Jej działanie jest silniejsze niż insuliny czy EGF, lecz równie efektywne jak surowicy płodowej [31]. Z badań wynika, że SPC nie współzawodniczy z estrami forbolu o miejsce wiązania do PKC w fibroblastach 3T3, a działa synergistycznie z TPA stymulując mitogenezę, co sugeruje, że SPC nie działa poprzez hamowanie kinazy białkowej C. Nie można wykluczyć jednak pewnej roli tego enzymu w mitogenezie indukowanej przez SPC, gdyż obserwowano wyraźny spadek syntezy DNA po zahamowaniu PKC. Zatem SPC może działać zarówno drogą zależną jak i niezależną od kinazy białkowej C.

II-1. Wpływ pochodnych sfingozyny na poziom kwasu fosfatydowego

Poszukując dróg, jakimi sfingozyna może indukować proliferację komórek zwrócono uwagę na fakt, że jej wpływowi towarzyszyło dwukrotne podniesienie poziomu kwasu fosfatydowego (PA) — silnego mitogenu dla mysich fibroblastów 3T3 [20]. Wzrost wew-

nątrzkomórkowego poziomu PA może być spowodowany stymulacją fosfolipazy D, hamowaniem fosfohydrolazy kwasu fosfatydowego, zwiększeniem acylacji glicerolo-3-P i podwyższeniem fosforylacji diacyloglicerolu katalizowanej przez kinazę diacyloglicerolową. Wykazano, że sfingozyna stymuluje aktywność fosfolipazy D w wielu typach komórek: NG 108-15, fibroblastach 3T3, fibroblastach NTH 3T3 i w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych płuc [19]. *In vitro* stwierdzono hamowanie fosfohydrolazy kwasu fosfatydowego przez sfingozynę [32]. W ludzkich komórkach białaczkowych Jurkat T bogatych w 80 kD izoenzym kinazy diacyloglicerolowej sfingozyna powodowała akumulację PA [33].

W wielu typach komórek kwas fosfatydowy wywołuje efekty podobne działaniu czynników wzrostowych: podnosi wartość pH cytoplazmy, indukuje ekspresję protoonkogenów c-fos i c-myc i powoduje hydrolizę fosforanów fosfatydyloinozytolu [34]. Ponadto działa synergistycznie z czynnikami wzrostowymi: EGF, FGF lub cielecą surowicą płodową oraz estrami forbolu [20]. Uważa się, że PA jest powiązany z działaniem białka Ras [35], które pośredniczy we wczesnych etapach przenoszenia sygnałów stymulujących wzrost komórek [36]. Wykazano również, że PDGF i TPA stymulują wytwarzanie PA w wyniku aktywacji fosfolipazy D [37]. Jest wysoce prawdopodobne, że kwas fosfatydowy funkcjonuje jako wewnątrzkomórkowy wtórny przekaźnik w kaskadzie sygnałów mitogennych [38].

Działanie PA ma ważne implikacje dla biologicznej funkcji sfingozyny. Wiadomo, że w fibroblastach 3T3 i innych typach komórek PA hamuje nagromadzenie się c-AMP i może zapoczątkowywać hydrolizę lipidów fosfatydyloinozytolowych, co powoduje zwiększenie stężenia trisfosfoinozytolu (IP_3) [39]. Podobne skutki wywołują mitogenne (10 μM) stężenia sfingozyny [20]. Sfingozyna także indukuje uwalnianie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych w nienaruszonych fibroblastach nawet pod nieobecność wapnia zewnątrzkomórkowego [40], co zostanie omówione w dalszej części artykułu. Zarówno indukowanie uwalniania wapnia jak i proliferacja komórek są specyficzne dla izomeru D-erytro-sfingozyny.

Sfingozylfosfocholina również stymuluje nagromadzenie się kwasu fosfatydowego prawdopodobnie przez aktywację fosfolipazy D [31]. Jednakże nie jest ono tak znaczące jak w przypadku SP i SPP i nie wydaje się żeby PA był zaangażowany w mechanizm działania SPC. W komórkach traktowanych SPC nie obserwuje się zmiany ilości c-AMP, który pod wpływem SP lub SPP obniża się drastycznie [20], co wskazuje, że ten klasyczny przekaźnik sygnałów nie ma wpływu na mitogenezę i mobilizację wapnia wywołowaną działaniem SPC. Zaobserwowano natomiast, że mitogenne stężenia SPC powodują uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błon mysich fibroblastów 3T3. Kwas arachidonowy w obecności

wapnia aktywuje występujący w tych komórkach izoenzym PKC- α [41, 42]. Dodanie sfinogozyny hamowało zarówno stymulowane przez SPC uwalnianie kwasu arachidonowego jak i mitogenne działanie SPC, co potwierdza rolę kwasu arachidonowego w tym procesie.

III. Rola metabolitów sfingomieliny w apoptozie

Rozwój organizmów wielokomórkowych jest regulowany przez procesy proliferacji i różnicowania oraz programowanej śmierci komórek, zwanej apoptozą [praca przeglądowa: 43]. Komórki ulegają apoptozie w odpowiedzi na różnorodne bodźce fizjologiczne i farmakologiczne. Nasza wiedza o sygnałach indukujących proces apoptozy w komórkach jest ciągle niekompletna.

Obserwacje, że w komórkach białaczkowych TNF powoduje fragmentację DNA prowadzącą do apoptozy, zwróciły uwagę na udział w tym procesie jednego z produktów hydrolizy sfingomieliny — ceramidu [44]. Syntetyczny ceramid C2 dodany do komórek U937 białaczki monoblastycznej (w jakich TNF powoduje apoptozę) wywoływał internukleosomalną fragmentację DNA, co jest uważane za wczesny objaw apoptozy. W komórkach HL-60, U937, L929/LM i WEHI164/13, działanie sfingomielinazy i ceramidu było znoszone przez fosfolipazę C i syntetyczne diacyloglicerole, co świadczy, że ceramid działa antagoniście do DAG. Stwierdzono, że fosfolipaza A2, kwas arachidonowy i fosfolipaza D nie powodowały uszkodzeń DNA [45]. Działanie cytotoksyczne ceramidu jest stereospecyficzne i ogranicza się do D-erythro-ceramidu i odpowiadających mu syntetycznych agonistów; dihydroceramid jest nieaktywny [46]. Przebieg reakcji cytotoksycznych indukowanych przez ceramid był analogiczny do wywołanych działaniem TNF w tych samych liniach komórkowych i w podobnych warunkach. *Quintans i w s p.* [47] opisali udział ceramidu w apoptozie komórek WEHI231 powodowanej przez przeciwciała, kortykosteroidy i promieniowanie UV. Są też dowody na rolę ceramidu w procesie apoptozy komórek T indukowanej zakażeniem wirusem HIV [48]. Również egzogeny ceramid indukował apoptozę w tych komórkach [49].

Pozbawienie komórek białaczkowych Molt4 surowicy, powodowało zatrzymanie przebiegu cyklu komórkowego i apoptozę, czemu towarzyszył dramatyczny i długotrwały wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego ceramidu. Te same efekty powodował egzogenie dodany ceramid. Prawdopodobnie w zatrzymaniu cyklu komórkowego na granicy faz Go/G1 przez ceramid pośredniczy defosforylacja produktu genu Rb (uważanego za ważny regulator cyklu komórkowego), gdyż linie komórkowe, którym brak Rb lub w których on nie funkcjonuje na skutek działania indukowanych adenowirusem białek wiążących Rb

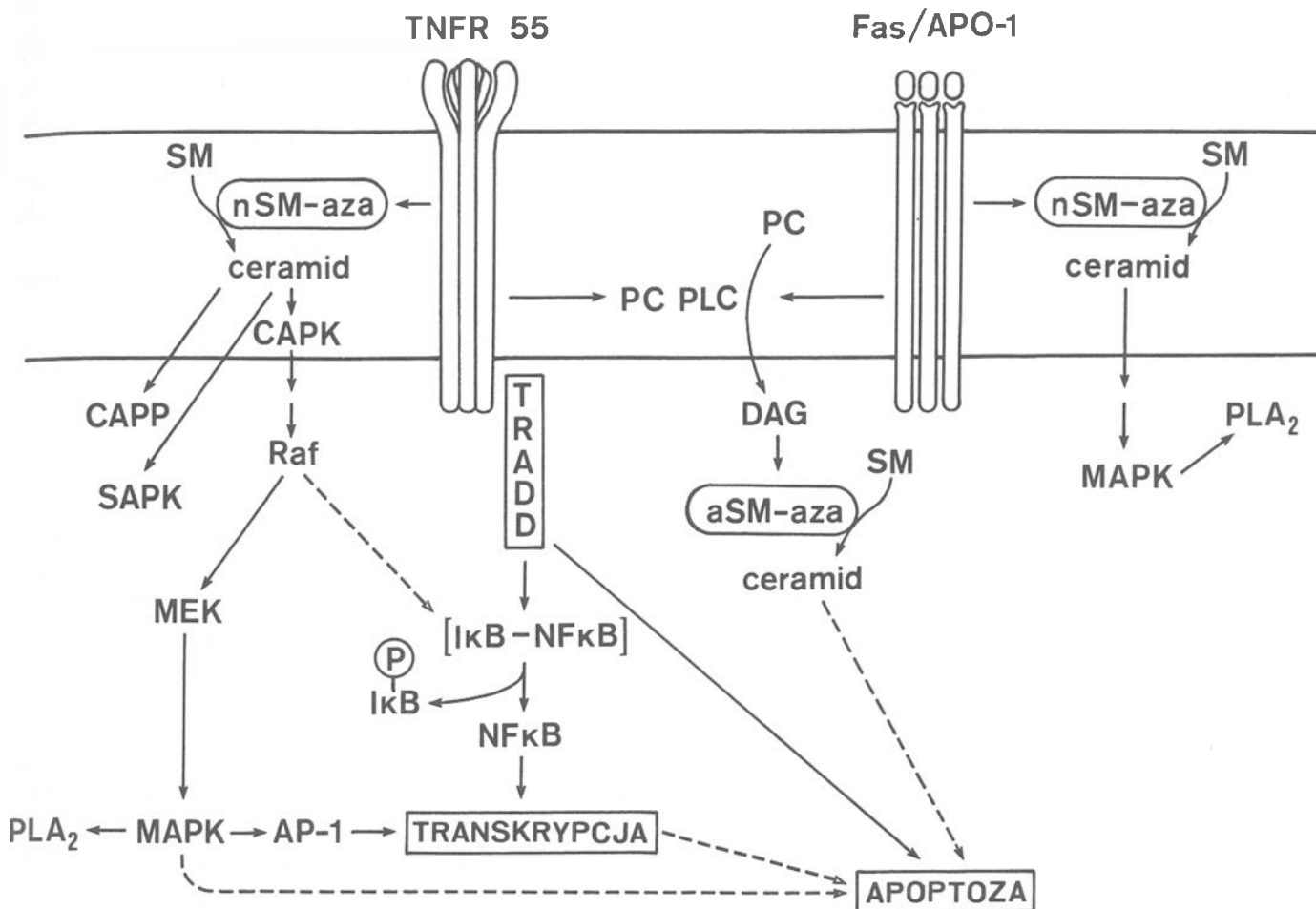
[50], nie podlegają hamowaniu przebiegu cyklu komórkowego wywoływanemu przez ceramid. Co więcej, estry forbolu lub DAG nie przeciwdziałają zależnemu od ceramidu hamowaniu cyklu komórkowego, natomiast zapobiegają apoptozie indukowanej ceramidem, co sugeruje występowanie różnych dróg przenoszenia sygnału przez ceramid w tych procesach. Możliwe, że to, czy proces apoptozy w komórce będzie przebiegał zależy nie tyle od bezwzględnych stężeń ceramidu i diacyloglicerolu, ale od ich stosunku [51].

Ostatnio *Sa w a i i w s p.* wykazali [52], że w ludzkich komórkach białaczkowych HL-60 ceramid indukuje aktywację c-jun/AP-1 we wczesnym etapie apoptozy. Autorzy udowodnili, że poziom m-RNA genu c-jun, poziom białka c-Jun i aktywność wiązania AP-1 do fragmentów DNA (wiążących czynnik AP-1 po stymulacji estrami forbolowymi) wzrastają pod wpływem ceramidu. Kurkumina (inhibitor aktywacji czynnika AP-1) znosiła zahamowanie wzrostu komórek i fragmentację DNA, które obserwowano pod wpływem ceramidu. Podobnie działały nukleotydy antysensowne dla c-jun. Wyniki te wskazują, że w komórkach HL-60 czynnik transkrypcyjny AP-1 ma kluczowe znaczenie w przebiegu procesu apoptozy i że wewnątrzkomórkowy przekaźnik sfingolipidowy — ceramid moduluje przenoszenie sygnału indukującego apoptozę poprzez aktywację tego czynnika. Z kolei *Brach i w s p.* [53] wykazali powiązanie aktywacji szlaku sfingomielinowego przez TNF i nagromadzenia ceramidu z pojawieniem się aktywności wiążącej czynnika AP-1 w komórkach.

Droga za pośrednictwem której ceramid powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1 nie jest do końca poznana. Spośród wielu kinaz serynowo/treoninowych, kinazy MAP są aktywowane przez ceramid [54]. Ostatnio postuluje się istnienie grupy kinaz aktywowanych stresem (SAPK, JNK kinazy lub kinazy N-końca białka c-Jun) [55]. Właśnie te kinazy mogą stymulować aktywność transkrypcyjną c-jun poprzez fosforylację N-końcowych aminokwasów [56]. Wydaje się, że ceramid może pośredniczyć w przenoszeniu sygnału do indukcji apoptozy aktywując czynnik transkrypcyjny AP-1 za pośrednictwem JNK, ponieważ TNF- α i promieniowanie UV zwiększają poziom ceramidu i aktywują kinazy JNK. Wyniki te pozwalają wnioskować, że ceramid pośredniczy w reakcjach stresowych w komórkach.

Najnowsze badania wykazują udział aktywowanych przez ceramid kinaz [57, 58] i fosfatazy białkowej [59, 60], które mogą pośredniczyć w apoptozie stymulowanej przez ceramid (Ryc. 2). Udział CAPP został potwierdzony w badaniach *Wolffa i w s p.* [61], którzy wykazali, że kwas okadajowy (inhibitor CAPP) hamuje apoptozę indukowaną ceramidem i znosi hamowanie ekspresji protoonkogenu c-myc.

Należy podkreślić, że pośredniki przenoszenia sygnału do apoptozy mogą być różne zależnie od typu komórek. W ludzkich neutrofilach traktowanych TNF



Ryc. 2 Udział metabolitów sfingomieliny w postulowanym mechanizmie przenoszenia sygnału receptorów TNF i Fas/APO-1. Receptor TNF (TNF-R55), aktywując w błonie komórkowej sfingomielinazę (nSM-azę), powoduje uwolnienie ceramidu, który z kolei aktywuje specyficzną kinazę białkową (CAPK) inicjującą kaskadę przenoszenia sygnałów od kinazy Raf, przez kinazę MAPK (MEK) lub kinazy aktywowane stresem (SAPK), do kinazy MAP (MAPK). MAPK stymuluje aktywność fosfolipazy A₂ (PLA₂) oraz czynników transkrypcji AP-1 i NFκB, stymulujących proliferację i apoptozę. Ceramid indukuje również aktywność specyficznego fosforazy białkowej (CAPP), uczestniczącej w procesie apoptozy. Białko TRADD, homologiczne do domeny śmierci TNF-R55, pośredniczy w apoptozie oraz aktywacji i translokacji NFκB. Jednocześnie TNF-R55 stymuluje aktywność lizosomalnej aSM-azy przez DAG uwolniony po aktywacji PC-PLC. Ceramid powstający w tym przedziale komórkowym jest odpowiedzialny za przenoszenie sygnału wyłącznie do apoptozy. Fas/APO-1 aktywuje również obie sfingomielinazy, ale potwierdzono tylko przenoszenie sygnału do apoptozy (generowanego analogicznie jak po aktywacji TNF-R55), natomiast nie stwierdzono indukcji ekspresji genów.

[62] sfingozyna indukowała apoptozę. Ceramid i SPP nie działały w tych komórkach. Dimetylosfingozyna i H-7 (inhibitor PKC) także indukowały apoptozę co sugeruje, że zjawisko to może być związane z hamowaniem PKC przez sfingozynę. W niestymulowanych ludzkich neutrofilach stężenie ceramidu jest bardzo wysokie (ok. 200 μM) co poddaje w wątpliwość znaczenie egzogennie dodawanego ceramidu. Wynika z tego, że w tych komórkach endogennym modulatorem pośredniczącym wywoływaniu apoptozy przez TNF może być sfingozyna.

IV. Wpływ sfingozyno-1-P na ruchliwość komórek nowotworowych

Ze względu na fakt, że SPP podobnie jak czynniki wzrostu, zwiększa poziom wapnia i kwasu fosfatydowego w komórkach, zbadano wpływ SPP na wzrost i różnicowanie dwóch linii komórkowych raka piersi: MCF-7 i MDA-MB-231 [63]. Komórki MCF-7 mają funkcjonujące receptory estrogenowe i *in*

vitro ich wzrost zależy od estrogenu, zaś komórki MDA-MB-231 nie mają takich receptorów i są odporne na działanie antyestrogenów [64]. SPP w stężeniu 1-10 μM hamował wzrost komórek obu linii. Pod wpływem SPP komórki MDA-MB-231 zmieniały fenotyp na bardziej prawidłowy i charakteryzowały się zmniejszoną znacznie inwazyjnością [63]. Sfingozyna nie miała wpływu na te cechy. Wyniki badań nad wpływem SPP na ruchliwość chemotaktyczną i inwazyjność kilku linii komórkowych, mysiego i ludzkiego czerniaka oraz ludzkiego kostniakomięsaka dowodzą hamującego wpływu SPP na inwazyjność komórek nowotworowych. Z drugiej strony, SPP nie wpływał na ruchliwość ludzkich komórek śródbłonna i włókniamięsaka [65]. Zreferowane wyżej wyniki badań nad pozytywnym oddziaływaniem SPP z komórkami niektórych linii nowotworowych sugerują, że ta nietoksyczna ufosforylowana pochodna sfingozyny może zmniejszać inwazyjność nowotworów. Takie działanie pośrednika sfingomielinowego szlaku przesyłania sygnału może otwierać nowe możliwości tera-

V. Regulacja homeostazy wapniowej w komórce przez metabolity sfingomieliny

Regulacja mobilizacji wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} należy niewątpliwie do istotnych oddziaływań metabolitów sfingomieliny, które mogą mieć znaczenie dla procesów fizjologicznych i patologicznych [8]. Liczne badania przeprowadzone na różnych modelach: izolowanych komórkach, uprzepuszczalnych komórkach i izolowanych pęcherzykach retikulum endoplazmatycznego wskazywały, że sfingozyna może działać na mobilizację jonów Ca^{2+} zarówno przez aktywację fosfolipazy C i hydrolizę fosforanów fosfatydyloinozytolu [66] jak i bez włączania tego mechanizmu [67, 68].

Najwcześniej ustalono rolę egzogennej sfingozyny w uwalnianiu jonów wapnia z wewnątrzkomórkowej puli zarówno zależnej jak i niezależnej od IP_3 [praca przeglądowa: 69] oraz w hamowaniu napływu Ca^{2+} przez błonę komórkową [70]. Działanie to może być realizowane poprzez stymulację metabolizmu fosforanów fosfatydyloinozytolu i nagromadzenie IP_3 [60] lub przez ufosforylowany produkt sfingozyny, SPP, jak to stwierdzono w hodowli komórek mięśni gładkich uprzepuszczalnych saponiną [40]. Ta ostatnia droga jest niezależna od hydrolizy fosforanów fosfatydyloinozytolu i uwalniania kwasu arachidonowego [66, 71], jakkolwiek kilku badaczy uzyskało dane, że egzogenne SPP może powodować produkcję IP_3 [72]. Być może SPP działa bezpośrednio na kanały wapniowe pozostające pod kontrolą receptorów rianidynowych lub IP_3 [71].

Badacze z grupy Sabbadiniego wykazali, że w stężeniu submikromolarnym sfingozyna hamuje uwalnianie Ca^{2+} z błon retikulum sarkoplazmatycznego (SR) mięśni szkieletowych w wyniku oddziaływania na receptor rianidynowy, zmniejszając jego powinowactwa do rianidyny, bez udziału fosforylacji tego receptora. Sfingozyna powodowała również wyraźne hamowanie uwalniania wapnia pod wpływem fizjologicznych czynników stymulujących. W wyższych stężeniach zarówno sfingozyna jak i SPC indukowały bezpośrednio uwalnianie wapnia z SR [73]. Jest możliwe, że sfingozyna stanowi fizjologiczny regulator poziomu wapnia w sercu.

Również SPC jest silnie działającym czynnikiem uwalniającym jony wapnia z wewnątrzkomórkowej puli zależnej od IP_3 [40]. W komórkach Swiss 3T3 Desai i wsp. [31] nie stwierdzili akumulacji inozytofosforanów po stymulacji przez SPC. Inni autorzy jednak wykazali [72], że w komórkach HL-60 SPC w dawce poniżej 30 μM aktywuje fosfolipazę C, powodując następnie mobilizację Ca^{2+} . Sfingozyno-1-P działa prawdopodobnie poprzez niezidentyfikowany jeszcze receptor sprzężony z białkiem lub białkami G hamowanymi toksyną ksztuśca.

Wydaje się, że drogi uwalniania wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} przez sfingozynę, SPP i SPC są różne, zależnie od rodzaju komórek i stopnia ich zróżnicowania. Okajima i Kondō [72] wysuwają hipotezę, że tylko w niezróżnicowanych komórkach SPC działa poprzez aktywację fosfolipazy C. Należy zaznaczyć, że jakkolwiek SPC może być produkowana w pewnych warunkach eksperymentalnych oraz w patologii np. w śledzionie chorych z syndromem Niemann-Picka oraz w komórkach nowotworowych [31], nie potwierdzono nagromadzenia tego związku w warunkach fizjologicznych.

Należy zaznaczyć, że nie znaleziono wpływu ceramidu ani na uwalnianie wapnia ani na akumulację IP_3 w komórkach [66]. Natomiast stwierdzono, że ceramid oraz SPP i SPC hamują wzrost wewnątrzkomórkowego $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wywoływanego aktywacją receptora EGF w ludzkich komórkach A431, co sugeruje, że odpowiedź na sygnał EGF może być modulowana przez sfingolipidowe wtórne przekazywniki sygnału [74].

Mechanizm uwalniania Ca^{2+} z puli wewnątrzkomórkowej przez sfingolipidy nie jest jeszcze wyjaśniony. Wyniki Okajima i Kondō [72] sugerują, że SPC powoduje wzrost cytosolowego Ca^{2+} na drodze mechanizmu włączającego aktywację PLC poprzez receptor sprzężony z wrażliwym na toksynę ksztuśca białkiem G. Ostatnio Kindman i wsp. [69] opisali nowy rodzaj kanału wapniowego zależnego od sfingolipidów i zlokalizowanego w endoplazmatycznym retikulum komórek bazocytowej białaczki szczura oraz w ludzkich komórkach śródbłonkowych [75, 76].

VI. Rola metabolitów sfingomieliny w przeniesieniu sygnałów cytokin i czynników wzrostu w komórkach

Istotne dla rozwoju badań nad sfingomieliną prace Okazaki i wsp. [1, 12] wykazały, że różnicowanie komórek ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60 pod wpływem $1-\alpha, 25$ -dihydroksywitaminy D_3 zachodzi ze wzrostem poziomu ceramidu i SPC w wyniku stymulacji nSM-azy. Kim i wsp. przebadali następnie wpływ innych czynników indukujących różnicowanie komórek HL-60, co doprowadziło do odkrycia, że metabolizm sfingomieliny może być ważnym mechanizmem pośredniczącym w przekazywaniu sygnału $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{INF-}\gamma$ w procesie różnicowania komórek. Procesowi temu towarzyszyło hamowanie ekspresji mRNA dla protoonkogeny c-myc.

Ostatnie badania dostarczają coraz więcej danych dotyczących wyjaśnienia mechanizmu przenoszenia sygnału cytokin w komórkach docelowych. Dwie cytokiny IL-1 i $\text{TNF-}\alpha$, wykazujące plejotropowe działanie o podobnym i nakładającym się zakresie oddziaływań biologicznych, powodują szybkie i przejściowe tworzenie dwu wtórnych lipidowych przekazywników sygnałów: diacyloglicerolu produkowanego

przez specyficzną dla fosfatydylocholino fosfolipazę C (PC-PLC) i ceramidu, tworzonych przez dwie różne sфингомielinazy: nSM-azę, zlokalizowaną w błonie komórkowej i aSM-azę, zlokalizowaną w lizosomach i endosomach [praca przeglądowa: 77].

Do najlepiej poznanych należy niewątpliwie udział sфингомielinaz i ich metabolitów w przenoszeniu sygnału przez receptory należące do grupy receptorów czynnika martwicy nowotworów (TNF). Schemat tych reakcji jest pokazany na rycinie 2.

Czynnik martwicy nowotworów indukuje wzrost i różnicowanie wielu rodzajów komórek oraz jest ważnym parakrynnym i endokrynnym modulatorem reakcji zapalnych i immunologicznych. Powoduje również nekrozę pewnych typów nowotworów i jest cytotoksyczny w sposób synergistyczny z INF- γ dla wielu komórek nowotworowych *in vitro*. Jest też jednym z czynników wywołujących apoptozę [prace przeglądowe: 78, 79]. Plejotropowe działanie TNF w procesach immunologicznych i zapalnych sprawia, że jest on ważnym czynnikiem w patogenezie wielu chorób. Poznanie mechanizmów przekazywania sygnałów przez tę cytokinę jest więc istotne nie tylko ze względów poznawczych, ale także jako istotny element terapii chorób autoimmunologicznych i raka.

VI-1. Receptory dla TNF

Receptory dla TNF występują w błonach komórkowych prawie wszystkich jądrazystych komórek. Scharakteryzowano i sklonowano dwa różne typy receptorów dla TNF [prace przeglądowe: 79, 80]. Receptory TNF-R55 i TNF-R75 różnią się masą cząsteczkową i stałą dysocjacji dla TNF, której wartości wynoszą odpowiednio 500 pM i 100 pM. Ekspresja genów kodujących te receptory jest w różny sposób regulowana i niska konstytucyjna ekspresja TNF-R55 i indukowana ekspresja TNF-R75 prowadzą do zróżnicowanych odpowiedzi fizjologicznych. Biologicznie czynną formą TNF są jego trimery. Aktywacja obu receptorów zachodzi poprzez ich oligomeryzację po przyłączeniu homotrimeru TNF- α lub TNF- β (limfotoksyny- α). Obie cytokiny aktywują obydwa typy receptorów TNF, po czym następuje szybka internalizacja i degradacja tych kompleksów w endosomach. TNF-R75 wykazuje podobną aktywność biologiczną jak TNF-R55, zwłaszcza w komórkach T i komórkach ze zwiększoną ekspresją białka p75, ale w większości komórek rola TNF-R75 polega na wiązaniu TNF i przekazywaniu tego ligandu na receptor TNF-R55, charakteryzujący się mniejszym powinowactwem do ligandu. Stwierdzono występowanie specyficznych regionów receptorów TNF odpowiedzialnych za wytwarzanie różnych sygnałów. Region błonowy receptora powoduje aktywację nSM-azy prowadzącą do aktywacji „ukierunkowanych proliną”, serynowo/treoninowych kinaz białkowych (PDP — *proline directed protein kinases*), powodujących

aktywację kinazy Raf, fosfolipazy A2 i czynnika transkrypcji AP-1 [81, 82]. Z kolei odcinek około 80 aminokwasów końca C receptora, tzw. domena sygnału śmierci, jest odpowiedzialny za sygnał prowadzący do cytotoksyczności i apoptozy [83, 84], stymulacji syntezy NO i prawdopodobnie do aktywacji aSM-azy i czynnika transkrypcji NF κ B [81].

Ostatnio opisano białka, nazwane FADD i TRADD zawierające domeny homologiczne wobec domen śmierci w receptorach odpowiednio Fas/APO-1 i TNF-R55.

Zwiększenie ekspresji TRADD indukuje apoptozę i aktywuje NF κ B, co sprawia, że białko to jest uważane za ogniwo sygnału TNF-R55 dla obu tych procesów [praca przeglądowa: 85].

VI-2. Receptor Fas/APO-1

Błonowy receptor Fas/APO-1 należy do rodziny receptorów TNF i posiada homologiczny region w części zawierającej domenę śmierci, analogicznie do TNF-R55, który generuje sygnał do apoptozy [83]. Receptor Fas/APO-1 jest jednym z najistotniejszych czynników regulacji czynności układu immunologicznego, ponieważ umożliwia on ograniczenie wzrostu klonów i nagromadzania limfocytów po wniknięciu antygeny do narządów limfatycznych. Jest on również odpowiedzialny za procesy eliminacji, przez komórki wyposażone w ligandy dla tego receptora, zaktywowanych i proliferujących limfocytów obwodowych, a także komórek, które uległy transformacji nowotworowej lub infekcji wirusowej [86]. Podobnie jak w przypadku TNF-R55, aktywacja Fas/APO-1-R przez ligandy może również prowadzić do aktywacji komórek [87].

VI-3. Różne drogi przenoszenia sygnału pochodzącego od nSM-azy i aSM-azy

Wyróżnienie regionów TNF-R55 odpowiedzialnych za aktywację nSM-azy i aSM-azy i różna lokalizacja tych enzymów w komórce sugeruje różne funkcje tych dwu enzymów w przenoszeniu sygnału TNF-R55, co znalazło potwierdzenia w badaniach W i e g m a n n a i w s p. [81]. Zgromadzone obecnie dane pozwoliły na zaproponowanie sekwencji reakcji zilustrowanych na rycinie 2.

Po aktywacji nSM-azy powstający ceramid aktywuje związaną z błonami specyficzną kinazę białkową (CAPK), która fosforyluje receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF-R) w komórkach A431 [88]. Wzrost aktywności tej kinazy obserwowano również w pierwszych minutach po podziałaniu TNF- α na komórki HL-60. Szybka aktywacja, zdolność analogów ceramidu do wywoływania efektów ligandu oraz rekonstrukcja kaskady reakcji w układzie bezkomórkowym pozwoliły uznać ten szlak sфингомielinowy za istotną drogę przenoszenia sygnału pochodzącego od TNF [4]. CAPK należy do grupy kinaz PDP, które

fosforylują fragment X-Ser/Tre-Pro-X substratu. Do grupy tej należą również kinazy MAP (MAPK) i kinazy cdc2. CAPK wymaga do fosforylacji najmniejszego fragmentu zawierającego Leu-Tre-Pro [89, 90].

Równocześnie wykazano, że TNF- α aktywuje kinazę MAP w fibroblastach [91], a w komórkach HL-60 traktowanych sfingomieliną lub ceramidem dochodzi do fosforylacji i aktywacji kinazy p42 MAP [54]. Kinazy MAP są kinazami serynowo/treoninowymi, które odgrywają ważną rolę w przenoszeniu sygnału mitogennego pochodzącego od wielu receptorów stymulowanych przez różne ligandy, włączając w to kinazy tyrozynowe receptorów i receptory sprzężone z białkiem G. Kinazy MAP, do których należą najlepiej poznane 42 kDa ERK1 czyli p42 MAPK i 44 kDa ERK2 czyli p44 MAPK, są aktywowane na skutek fosforylacji reszt tyrozyny i treoniny przez specyficzne kinazy MAPK: MEK1 i MEK2. Z kolei kinazy MEK są regulowane przez fosforylację seryny w ich cząsteczce przez kinazy kinazy MEK i kinazę Raf. Zróżnicowanie kinaz kinazy MEK uważa się za główny czynnik umożliwiający zróżnicowanie dróg sygnałowych prowadzących do MAPK [92-94].

W następnych badaniach stwierdzono, że stymulacja komórek HL-60 przez TNF powoduje w przeciągu sekund fosforylację kinazy Raf, kinazy serynowo/treoninowej, która bierze udział w przenoszeniu sygnału mitogennych cytokin, co sugeruje, że Raf może pośredniczyć w przenoszeniu sygnału generowanego przez tę cytokinę [82]. Podobny efekt uzyskano działając na komórki ceramidem lub sfingomieliną. Grupa Kolesnicka wykazała, że CAPK tworzy kompleks z Raf i fosforyluje tą kinazę powodując wzrost jej aktywności wobec MEK kinazy w komórkach HL-60. W ten sposób droga przenoszenia sygnału sfingomielinowego została powiązana ze szlakiem MAPK [95]. Belka i w sp. [82] uzyskali wyniki sugerujące, że nSM-aza, a nie aSM-aza, bierze udział w wywoływanej przez TNF- α fosforylacji i aktywacji kinazy Raf.

Kinaza MAP z kolei fosforyluje i aktywuje cytosolową fosfolipazę A2 [96] w odpowiedzi na ceramid utworzony przez nSM-azę [81]. Aktywacja PLA₂ wydaje się być odpowiedzialna za nagromadzenie kwasu arachidonowego i jego metabolitów, leukotrienów i prostaglandyn, powodujących reakcje zapalne w wyniku działania TNF.

Badania *in vitro* wpływu ceramidu na fosforylację białek doprowadziły do wykrycia serynowo/treoninowej fosfatazy białkowej (CAPP) aktywowanej bezpośrednio i w specyficzny sposób przez ceramid [59]. Fosfataza ta należy do grupy fosfataz PP2A w skład których wchodzi trzy podjednostki: A — o niezidentyfikowanej funkcji, B — regulatorowej i C — katalitycznej, mogących występować w formie mono-di-, lub trimeru. Ceramid aktywuje wyłącznie formę trimeryczną działając na podjednostkę B. CAPP jest hamowana przez niskie stężenia kwasu okadajowego, specyficznego inhibitora tego typu fosfataz [60]. Nanomolarne

stężenia kwasu okadajowego powodują zahamowanie wywoływanej przez ceramid apoptozy i ekspresji c-myc w komórkach HL-60, podobnie jak to obserwowano po traktowaniu TNF- α , co potwierdza rolę CAPP w tych procesach [61].

Metabolity sfingomieliny biorą również udział w przenoszeniu sygnału do aktywacji i translokacji czynnika transkrypcji NF κ B. Krönke i w sp. [97] wykazali, że egzogenna sfingomielinaza i ceramid powoduje degradację I- κ B, fizjologicznego inhibitora NF κ B i aktywację tego czynnika transkrypcji. Nie jest jasne czy aktywacja kinazy Raf wystarcza do aktywacji i translokacji NF κ B jak to sugerowały badania Finco i Baldwina [98]. Ostatnio uzyskano dane świadczące o tym, że ceramid nagromadzony w komórkach w wyniku aktywacji aSM-azy przez DAG, utworzony przez zaktywowaną PC-PLC, jest odpowiedzialny za aktywację NF κ B. Aktywacja aSM-azy jest zależna od tej samej domeny receptora, która jest odpowiedzialna za aktywację PC-PLC [81]. Autorzy ci sugerują, że aktywacja aSM-azy zachodzi w endosomach, w których znajduje się DAG utworzony po aktywacji PC-PLC i internalizowany razem z TNF-R55.

Coraz więcej danych dotyczy występowania nowej drogi przenoszenia sygnału, która jest specyficznie włączana w odpowiedzi na stres np. pod wpływem TNF lub uszkodzenie tkanek w wyniku hipoksji, promieniowania UV czy chemioterapii. Czynniki te aktywują zarówno nSM-azę i aSM-azę jak i aktywowane stresem kinazy białkowe (SAPK, JNK). Westwick i w sp. [99, 100] wykazali aktywację SAPK przez TNF, co powoduje stymulację zależnej od AP-1 transkrypcji genów i indukcję translokacji NF κ B do jądra i transkrypcji genów zależnych od tego czynnika. Potencjalnym pośrednikiem tych procesów jest ceramid powstający w wyniku aktywacji sfingomielinazy. Stwierdzono natomiast tylko niewielką stymulację aktywności MAPK przez TNF- α i hamowanie tych kinaz przez ceramid [100].

Stosunkowo mniej danych dotyczy udziału sfingolipidów w przenoszeniu sygnału Fas/APO-1. Cifone i w sp. [101] wykazali aktywację nSM-azy, aSM-azy, PLA₂ i PC PLC po stymulacji Fas/APO-1 i udział ceramidu w inicjacji apoptozy przez ten receptor. Uzyskano również dane o aktywacji kinazy MAP i udziale kinazy Raf w tym procesie [101]. Natomiast nie udało się stwierdzić aktywacji NF κ B przez sygnał Fas/APO-1 [102]. Wydaje się, że sygnał receptora Fas/APO-1 do apoptozy przenoszony przez ceramid nie wymaga i nie jest zależny od ekspresji genów [103].

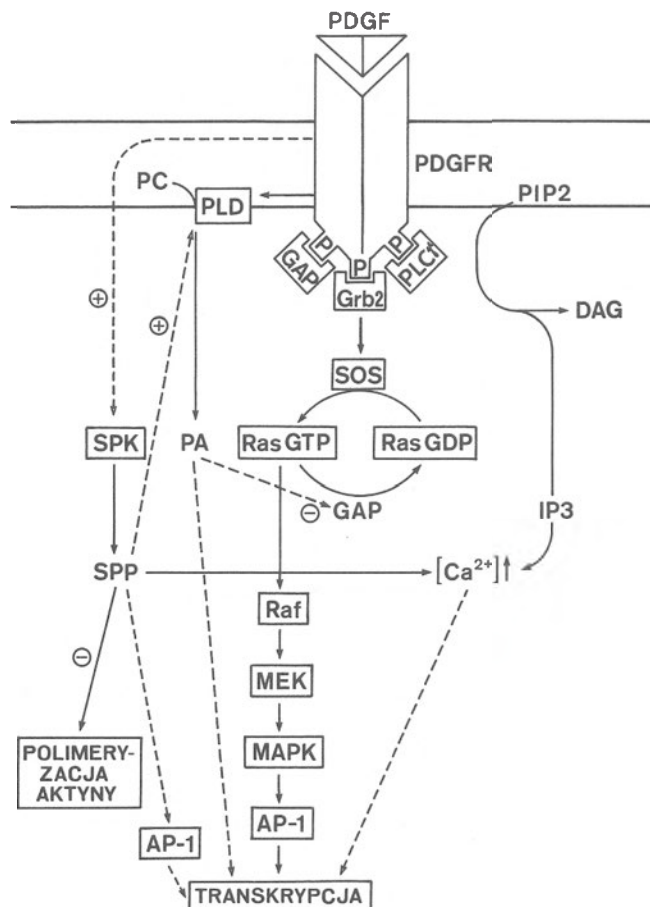
VI-4. Receptor PDGF

Badania przeprowadzone przez Kestera i w sp. [104] wskazują na powiązanie sfingozyny z procesem mitozy niezależnym od kinazy białkowej C. Na modelu

in vitro komórek mezangialnych oraz w układzie bezkomórkowym wykazano, że płytkowy czynnik wzrostu stymuluje tworzenie mitogennych metabolitów sfingolipidów poprzez aktywację ceramidazy działającej w zasadowym zakresie pH, degradującej ceramidy, oraz sfingomielinazy dostarczającej ceramidu, podczas gdy cytokiny IL-1 i TNF- α aktywują sfingomielinazę pozostając bez wpływu na ceramidazę [104]. Autorom tym udało się uzyskać oddzielenie zależnej od czynnika wzrostu mitogenezy od powodowanych przez cytokiny różnicowania i apoptozy komórek, zależnie od rodzaju metabolitu sfingolipidowego nagromadzanego w wyniku specyficznej aktywacji odpowiednich enzymów szlaku sfingomielinowego.

Wyniki *Olivera i Spiegela* [105] pokazały, że PDGF powoduje gwałtowny i przejściowy wzrost poziomu sfingozyny i SPP w fibroblastach Swiss 3T3, podczas gdy nie obserwowano tych zmian w obecności EGF. Autorki stwierdziły przejściowy wzrost aktywności cytosolowej kinazy sfingozynowej, co w konsekwencji reguluje wewnątrzkomórkowy poziom SPP i potwierdza rolę tego czynnika w przenoszeniu sygnału PDGF (Ryc. 4). Również w komórkach mięśni gładkich naczyń PDGF podnosi poziom sfingozyny przy równoczesnym obniżeniu wewnątrzkomórkowego poziomu ceramidu. Ponadto L-cykloseryna, inhibitor syntezy sfingolipidów, a także DL-treo-dihydrosfingozyna, inhibitor kinazy sfingozynowej hamują stymulowaną przez PDGF syntezę DNA, pozostając bez wpływu na proliferację komórek wywołowaną EGF [106]. Z badań *Su i wsp.* [107] wynika, że SPP indukuje syntezę DNA i podziały komórkowe przez aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1. Inhibitor kinazy sfingozynowej (DL-treo-dihydrosfingozyna) zniósł zdolność wiązania AP-1 do DNA. SPP powoduje również gwałtowny wzrost stężenia kwasu fosfatydowego oraz wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia $[Ca^{2+}]_i$, jak to zostało opisane wcześniej. Kwas fosfatydowy jest ważnym aktywatorem Ras [108] i kaskady kinaz MAP, a także stymuluje zdolność AP-1 do wiązania DNA [107]. Proponowany przez *Spiegel i wsp.* [8] schemat udziału metabolitów sfingomieliny w przenoszeniu sygnału PDGF jest pokazany na rycinie 3.

Ostatnio *Hudson i wsp.* [74] wykazali, że w ludzkich komórkach raka naskórka A431 sfingozyna nie ma wpływu na wewnątrzkomórkowe stężenie wolnego wapnia $[Ca^{2+}]_i$, natomiast znacznie stymuluje napływ wapnia stymulowany przez EGF. Towarzyszy temu fosforylacja reszt serynowych dwu niezidentyfikowanych białek, które prawdopodobnie są włączone w przenoszenie sygnału receptora EGF. Inni badacze stwierdzili, że ceramid stymuluje fosforylację receptora EGF w tych samych komórkach, co sugeruje udział ceramidu w tym procesie [109]. Badania *Kestera i wsp.* [104] sugerują, że PDGF stymuluje nSM-azę w mezangialnych komórkach kłębkowych nerek szczura poprzez fosforylację reszt



Ryc. 3 Udział metabolitów sfingomieliny w przenoszeniu sygnału indukowanego aktywacją receptora PDGF. Przyłączenie PDGF do receptora powoduje fosforylację tyrozyny białka receptorowego, co umożliwia przyłączenie białek adaptacyjnych Grb2, fosfolipazy C γ (PLC γ) i białka aktywującego GTP-azę (GAP). Wiązanie Grb2 prowadzi do aktywacji układu Ras i rozpoczyna kaskadę kinaz białkowych od kinazy Raf do MAPK, powodując aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1. Jednocześnie PDGF-R aktywuje fosfolipazę D (PLD), kinazę sfingozynową (SPK), która katalizuje powstanie sfingozyno-1-P (SPP). SPP również aktywuje PLD, powodując nagromadzenie kwasu fosfatydowego (PA), prowadzące do wzrostu cytosolowego stężenia wapnia, niezależnie od inozytolotrisfosforanu (IP $_3$) gromadzonego w wyniku aktywacji PLC γ . SPP hamuje także polimeryzację aktyny w komórkach nowotworowych.

tyrozynowych. Obserwacja ta stanowi punkt wyjścia do spekulacji na temat różnorodnych odpowiedzi komórek na działanie czynników wzrostu i cytokin.

VII. Uwagi końcowe

Podsumowując, można stwierdzić, że sfingozyna, SPP i ceramidy posiadają właściwości predestynujące je do roli wtórnych pośredników przekazywania sygnału pomiędzy błoną komórkową, w której są zlokalizowane receptory czynników wzrostu i cytokin, pułą wewnątrzkomórkowego wapnia, kaskadami kinaz i fosfataz białkowych i czynnikami regulującymi ekspresję genów w procesach prowadzących do podziałów, różnicowania i apoptozy komórek. Metabolity sfingomieliny wywołują zróżnicowane odpowiedzi komórkowe, występują w komórce w niskich stężeniach, które po stymulacji ulegają gwałtownemu i przejści-

ciowemu podwyższeniu powodując uwalnianie wapnia z puli wewnątrzkomórkowej przez mechanizm niezależny od IP₃, aktywację PDP kinaz i specyficznej fosfatazy oraz czynników transkrypcji. Mogą one również wzmacniać lub osłabiać kaskadę reakcji poprzez efekt pozytywnej lub negatywnej kontroli zwrotnej.

Artykuł otrzymano 25 kwietnia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 16 maja 1996 r.

Piśmiennictwo

- Okazaki T, Bell RM, Hannun YA (1989) *J Biol Chem* **264**: 19076-19080
- Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y (1991) *J Biol Chem* **266**: 484-489
- Hannun YA (1994) *J Biol Chem* **269**: 3125-3138
- Kolesnick RN, Golde DW (1994) *Cell* **77**: 325-328
- Beyaert R, Fiers W (1994) *FEBS Lett* **340**: 9-16
- Kwiatkowska J (1994) *Post Biochem* **40**: 130-134
- Rakowska M, Zborowski J (1992) *Post Biol Kom* **19**: 369-384
- Spiegel S, Milstien S (1995) *J Membrane Biol* **146**: 225-237
- Mathias S, Kolesnick RN (1993) *Adv Lipid Res* **25**: 65-90
- Hannun NY, Bell RM (1989) *Science* **243**: 500-507
- Koval M, Pagano RM (1991) *Biochim Biophys Acta* **1082**: 113-125
- Okazaki T, Bielawska A, Bell RM, Hannun YA (1990) *J Biol Chem* **265**: 15823-15831
- Olivera A, Buckley NE, Spiegel S (1992) *J Biol Chem* **267**: 26121-26127
- Wakita H, Togura Y, Yagi H, Nishimura K, Furukawa F, Tagikawa M (1994) *Arch Dermatol Res* **286**: 350-354
- Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH Jr, Bell RM (1986) *J Biol Chem* **261**: 12604-12609
- Merrill AH (1991) *J Bioenerg Biomembr* **23**: 83-104
- Hannun YA, Bell RM (1987) *Science* **235**: 670-674
- Zhang H, Buckley NE, Gibson K, Spiegel S (1990) *J Biol Chem* **265**: 78-81
- Desai NN, Zhang H, Olivera A, Mattie ME, Spiegel S (1992) *J Biol Chem* **267**: 23122-23128
- Zhang H, Desai NN, Murphey JM, Spiegel S (1990) *J Biol Chem* **265**: 21309-21316
- Jamal Z, Martin A, Munoz AG, Brindley DN (1991) *J Biol Chem* **266**: 2988-2996
- Yamada K, Sakane F, Imai S-I, Takemura H (1993) *Biochim Biophys Acta* **1169**: 217-224
- Arnold RS, Newton AC (1991) *Biochemistry* **30**: 7747-7754
- Pushkavera MY, Khan WA, Alessenko AV, Sahyoun N, Hannun YA (1992) *J Biol Chem* **267**: 15246-15251
- Igarashi Y, Hakamori S, Toyokuni T, Dean B, Fujita S, Suimoto M, Ogawa T, ElGhendy, Racker E (1989) *Biochemistry* **28**: 6796-6800
- Igarashi Y, Kitamura K, Toyokuni T, Dean B, Fenderson B, Ogawa T, Hakamori S (1990) *J Biol Chem* **265**: 5385-5389
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S (1991) *J Cell Biol* **114**: 155-167
- Buehrer BM, Bell RM (1992) *J Biol Chem* **267**: 3154-3159
- Olivera A, Spiegel S (1993) *Nature (Lond)* **365**: 557-560
- Desai NN, Spiegel S (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 361-366
- Desai NN, Carlson RO, Mattie ME, Olivera A (1991) *Buckley NE, Seki T, Brooker G, Spiegel S (1993) J Cell Biol* **121**: 1385-1395
- Lavie Y, Piterman O, Liscovitch M (1990) *FEBS Lett* **277**: 7-10
- Sakane F, Yamada K, Kanoch H (1989) *FEBS Lett* **255**: 409-413
- Murayama T, Ui M (1987) *J Biol Chem* **262**: 5522-5529
- Yu CI, Tsai MH, Stacey DW (1988) *Cell* **52**: 63-71
- Barbacid M (1987) *Annu Rev Biochem* **56**: 779-827
- Ben-Av P, Liscovitch M (1989) *FEBS Lett* **259**: 64-66
- Exton JH (1990) *J Biol Chem* **165**: 1-4
- Murayama T, Ui M (1992) *J Biol Chem* **267**: 12463-12467
- Ghosh TK, Bian J, Gill DL (1990) *Science (WASH. DC)* **248**: 1653-1656
- McCaffrey PG, Rosner MR (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **146**: 140-146
- Nizhizuka Y (1992) *Science* **256**: 607-614
- Sikora E (1994) *Post Biochem* **40**: 150-160
- Hannun YA, Obeid LM (1995) *TIBS* **20**: 73-77
- Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Taylor RS, Gewirtz DA, Grant S (1994) *Proc Natl Acad Sci* **71**: 73-77
- Bielawska A, Crane HM, Liotta D, Obeid LM, Hannun YA (1993) *J Biol Chem* **268**: 26226-26232
- Quintans J, Kilkus J, McShan CL, Gottschalk AR, Dawson G (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 710-714
- Van Veldhoven PP, Matthews TJ, Bolognesi DP, Bell RM (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 209-216
- Obeid LM i Hannun YA (1995) *J Cell Biochem* **58**: 191-198
- Dbaiibo GS, Pushkareva MY, Jayadev S, Schwarz JK, Horowitz JM, Obeid LM, Hannun YA (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1347-1351
- Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA (1993) *Science* **258**: 1769-1771
- Sawai H, Okazaki T, Yamamoto H, Okano H, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Ishikura H, Umahara H, Domae N (1995) *J Biol Chem* **270**: 27326-27331
- Brach MA, Gruss HJ, Sott C, Herrmann F (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 4284-4290
- Raines MA, Kolesnick RN, Golde DW (1993) *J Biol Chem* **268**: 14572-14575
- Derijard B, Hibi M, Wu I-H, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) *Cell* **76**: 1025-1037
- Minden A, Lin A, Smeal T, Derijard B, Cobb M, Davis R, Karin M (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 6683-6688
- Mathias S, Dressler KA, Kolesnick RN (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10009-10013
- Liu J, Mathias S, Yang Z, Kolesnick RN (1994) *J Biol Chem* **269**: 3047-3052
- Dobrowsky RT, Hannun YA (1992) *J Biol Chem* **267**: 5048-5051
- Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA (1993) *J Biol Chem* **268**: 15523-15530
- Wolff RA, Dobrowsky RT, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA (1994) *J Biol Chem* **269**: 19605-19609
- Ohta H (1994) *FEBS Lett* **355**: 267-270
- Spiegel S, Olivera A, Zhang H, Thompson EW, Su Y, Berger A (1994) *Breast Canc Res Treatm* **31**: 337-348
- Lippman ME, Dickcon RB (1989) *Rec Prog Horm Res* **45**: 383-439
- Sadahira Y, Ruan F, Hakomori S, Igarashi Y (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9686-9690
- Chao CP, Lauderkin SJF, Ballou LR (1994) *J Biol Chem* **269**: 5849-5856
- Wong K, Kwan YL (1993) *Cell Calcium* **14**: 493-505
- Yule DI, Wu D, Essington TE, Shayman JA, Williams JA (1993) *J Biol Chem* **268**: 12353-12358
- Olivera A, Zhang H, Carlson RO, Mattie ME, Schmidt RR, Spiegel S (1994) *J Biol Chem* **269**: 17924-17930
- Breitmayer J-P, Bernard A, Aussel C (1994) *J Biol Chem* **269**: 5054-5058
- Mattie M, Brooker G, Spiegel S (1994) *J Biol Chem* **269**: 3181-3188
- Okajima F, Kondo Y (1995) *J Biol Chem* **270**: 26332-26340
- Sabbadini RA, Betto R, Teresi A, Fachechi-

- Cassano G, Salviati G (1992) *J Biol Chem* **267**: 15475-15484
74. Hudson PL, Pedersen WA, Saltsman WS, Lis-covitch M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Blunsztajn JK (1994) *J Biol Chem* **269**: 21885-21890
 75. Kindman LA, Kim S, McDonald TV, Gardner P (1994) *J Biol Chem* **269**: 13088-13091
 76. Kim S, Lakhani V, Costa DJ, Sharara AI, Fitz JG, Huang LW, Peters KG, Kindman LA (1995) *J Biol Chem* **270**: 5266-5269
 77. Schutze S, Machleidt T, Kronke M (1994) *J Leukoc Biol* **56**: 533-541
 78. Vilcek J, Lee TH (1991) *J Biol Chem* **266**: 7313-7316
 79. Wałajtyś-Rode E (1995) *Kosmos* **44**: 451-464
 80. Vandenabelle P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995) *Trends in Cell Biology* **5**: 382-399
 81. Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M (1994) *Cell* **78**: 1005-1015
 82. Belka C, Wiegmann K, Adam D, Holland R, Neuloch M, Herrman F, Krönke M, Brach MA (1995) *EMBO J* **14**: 1156-1165
 83. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV (1993) *Cell* **74**: 845-853
 84. Itoh N, Nagata S (1993) *J Biol Chem* **268**: 10932-10937
 85. Tewari M, Dixit VM (1996) *Curr Opin Genet Dev* **6**: 39-44
 86. Nagata S, Goldstein P (1995) *Science* **267**: 1449-1456
 87. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskowsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH (1993) *J Exp Med* **176**: 2231-2235
 88. Davis RJ (1993) *J Biol Chem* **268**: 14553-14556
 89. Kennelly PJ, Krebs EG (1991) *J Biol Chem* **266**: 1555-1558
 90. Joseph CK, Byun HS, Bittman R, Kolesnick RN (1993) *J Biol Chem* **268**: 20002-20006
 91. Van Lint J, Agostinis P, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W, Merlevede W, Vandenneede JR (1992) *J Biol Chem* **267**: 17997-17801
 92. Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday I, Sizeland AM, Weinberg RA (1993) *Nature (Lond)* **363**: 45-51
 93. Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D (1993) *Nature (Lond)* **363**: 88-92
 94. Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Bowtell D (1993) *Nature (Lond)* **363**: 83-87
 95. Yao B, Zhang Y, Delikat S, Mathias S, Basu S, Kolesnick R (1995) *Nature (Lond)* **378**: 307-310
 96. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf IL, Seth A, Davis RJ (1993) *Cell* **72**: 269-278
 97. Mahleidt T, Wiegmann K, Henkel T, Schütze S, Baeuerle P, Krönke M (1994) *J Biol Chem* **269**: 13760-13765
 98. Finko TS, Baldwin AS, Jr (1993) *J Biol Chem* **268**: 17676-17679
 99. Westwick JK, Weitzel C, Minden A, Karin M, Brenner DA (1994) *J Biol Chem* **269**: 26396-26401
 100. Westwick JK, Bielawska A, Dbaibo G, Hannun YA, Brenner DA (1996) *J Biol Chem* **270**: 22689-22692
 101. Cifone MG, Roncaoli P, DeMaria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G, Testi R (1995) *EMBO J* **14**: 5859-5868
 102. Schulze-Osthoff K, Krammer P, Droge W (1994) *EMBO J* **13**: 4587-4596
 103. Wong GHW, Goeddel DV (1994) *J Immunol* **152**: 1751-1755
 104. Coroneos E, Martinez M, McKenna S, Kester M (1995) *J Biol Chem* **270**: 23305-23309
 105. Olivera A, Spiegel S (1993) *Nature (Lond)* **365**: 557-560
 106. Jakobs LS, Kester M (1993) *Am J Physiol* **265**: c740-c747
 107. Su Y, Rosenthal D, Smulson M, Spiegel S (1994) *J Biol Chem* **269**: 16512-16517
 108. Tsai M, Yu C, Stacey DW (1990) *Science* **250**: 982-985
 109. Goldkorn T, Dressler KA, Muindi J, Radin NS, Mendelsohn J, Menaldino D, Liotta D, Kolesnick RN (1991) *J Biol Chem* **266**: 16092-16098

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 1996 roku

Z przyjemnością informuję naszych Czytelników o przyznaniu przez Zarząd Główny Towarzystwa:

dorocznej nagrody im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną całkowicie w laboratoriach krajowych i opublikowaną w minionym roku;

dorocznej nagrody im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł opublikowany w kwartalniku *Postępy Biochemii* w roku poprzednim;

dorocznej nagrody za najlepszy wykład akademicki wygłoszony w b.r. w ramach Konkursu organizowanego przez Sekcję Dydaktyki P.T. Bioch.;

po raz pierwszy nagrody im. Antoniego Dmochowskiego za szczególne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii.

Nagroda im. J. K. Parnasa:

Kol. Kol. Alicja Wawrzynów i Maciej Żylicz z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego za pracę pt. **"Divergent effects of ATP on binding of the DnaK nad DnaJ chaperones to each other, or to their various native and denaturated protein substrates"**, *J. Biol. Chem.* **270** (33), 19300—19306, 1995.

Nagroda im. B. Skarżyńskiego:

Kol. Barbara Grzelakowska-Sztabert z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie za artykuł pt. **„Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów kinaz cyklinozależnych"**, *Post. Bioch.* **41** (2), 80—93, 1995.

Nagroda za wykład akademicki:

Kol. Hanna Czeczot z Katedry i Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie za wykład pt. „**Biochemia nasienia**”.

Kol. Zygmunt Pojda z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie, za wykład pt. „**Cytokiny w regulacji odpowiedzi układu krwiotwórczego**”.



Laureaci konkursu na najlepszy wykład akademicki w roku 1996: dr Hanna Czeczot, prof. dr hab. Zygmunt Pojda.

Nagroda im. A. Dmochowskiego:

Kol. Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz z Uniwersytetu Łódzkiego za podręcznik pt. „**Cytobiochemia**”, opublikowany w 1995 r. przez PWN.

Kol. Grzegorz Bartosz z Uniwersytetu Łódzkiego za podręcznik pt. „**Dwa oblicza tlenu**” opublikowany w 1995 r. przez PWN (wyróżnienie).

Wszystkim Laureatom składamy serdeczne gratulacje i najlepsze życzenia.

Redakcja

SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

Sprawozdanie z VII Sympozjum Fluorowego

W dniach 26-27 kwietnia 1996 r. odbyło się w Szczecinie siódme sympozjum z cyklu Metabolizm Fluoru zorganizowane przez Katedrę i Zakład Biochemii i Chemii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie oraz szczeciński oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W obradach uczestniczyły 64 osoby. Tematem wiodącym sympozjum była analityka związków fluoru. Po raz pierwszy oprócz części teoretycznej zorganizowano warsztaty będące częścią praktyczną sympozjum.

Spotkanie rozpoczęło się referatem Prof. dr hab. Zygmunta Machoya pt. „25 lat kompleksowych badań metabolizmu fluoru w Szczecinie”, podsumowującym stan badań prowadzonych w Katedrze Biochemii i Chemii w Szczecinie oraz omawiającym wcześniej organizowane sympozja fluorowe.

Kolejne referaty dotyczyły analityki związków fluoru. W pierwszym Prof. dr hab. Wojciech Czarnowski z Katedry Toksykologii AM w Gdańsku, przedstawił różne sposoby przygotowania próbek materiału biologicznego do analizy fluoru, zagadnienie niezwykle ważne dla tych, którzy zajmują się tą problematyką. W drugim referacie, przedstawionym przez dr Tadeusza Ogońskiego z Katedry Biochemii i Chemii PAM w Szczecinie zostały omówione metody stosowane w analityce fluoru ze szczególnym uwzględnieniem dwóch z nich — potencjometrycznej i chromatografii gazowej — stosowanych rutynowo w PAM w Szczecinie. Kolejny referat nt. oznaczania fluoru potencjalnie przyswajalnego z żywności wygłosiła dr hab. Anna Wędzisz z Zakładu Bromatologii IBŚB AM w Łodzi. Część referatową zakończyło wystąpienie mgr Andrzeja Sudera, przedstawiciela firmy Jenoptik Polska z Poznania, na temat zastosowania wyrobów firmy Eppendorf w mikroanalizie. Wyroby te (pipety, wyroby polietylenowe) ze względu na bardzo wysoką jakość oraz dużą niezawodność bardzo dobrze nadają się do prac wymagających wysokiej dokładności dając pełną gwarancję uzyskania precyzyjnych i powtarzalnych wyników.

W drugiej części sympozjum przedstawiono streszczenia z 17 prac doświadczalnych. Wszystkie prezentowane prace zostały uprzednio poddane recenzji oraz ogłoszone drukiem w wydawnictwie pt. „Analityka związków fluoru” (ISBN 83-86342-19-6) wydanym przez organizatorów pod redakcją Tadeusza Ogońskiego, Doroty Samujło oraz Zygmunta Machoya. Tematyka prezentowanych prac obejmowała zagadnienia z zakresu biochemii oraz ekologii związków fluoru ze szczególnym uwypukleniem zagadnień metodycznych. Prace zostały wykonane w następujących ośrodkach akademickich Polski — Gdańsk, Kraków, Lublin, Łódź, Poznań, Sosnowiec, Szczecin, Tychy.

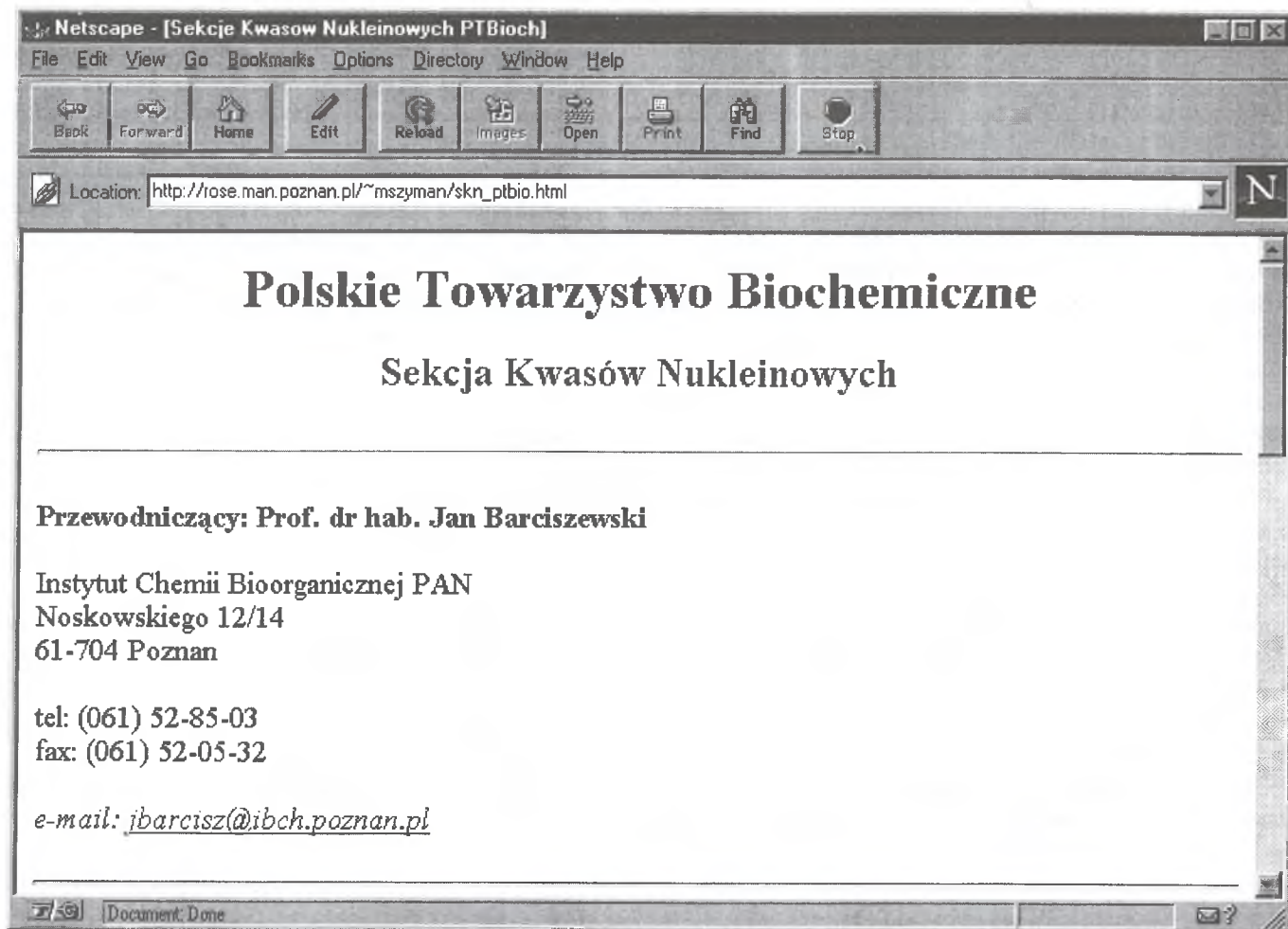
Sympozjum zgromadziło również wiele osób zainteresowanych aktualnym stanem wiedzy w dziedzinie badań nad metabolizmem fluoru w Polsce lub uczestnictwem w warsztatach praktycznych w dniu 27 kwietnia 1996 r. Ku zadowoleniu organizatorów w zajęciach praktycznych wzięło udział 20 osób. Uczestnikom warsztatów przedstawiono zestawy aparatury oraz omówiono sposoby przygotowania próbek do oznaczania fluoru w materiale biologicznym. Pracownicy Katedry omawiali zasady postępowania analitycznego oraz prezentowali praktyczne możliwości wykorzystania chromatografii gazowej oraz metod potencjometrycznych (elektrod fluoroselektywnych) do oznaczania fluoru w różnorodnym materiale biologicznym. W podsumowaniu sympozjum Pracownia Analityki Fluoru Katedry Biochemii i Chemii PAM w Szczecinie, przyjęła na siebie zobowiązanie okresowego organizowania sympozjów fluorowych oraz utworzenia w Szczecinie ośrodka koordynującego całokształt prac z zakresu metodyki badań związków fluoru na terenie Polski.

Tadeusz Ogoński
Kierownik Katedry

SEKCJA KWASÓW NUKLEINOWYCH POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

W grudniu 1995 r. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na mój wniosek, powołał do życia Sekcję Kwasów Nukleinowych. Celem tej inicjatywy jest integracja środowiska badaczy podejmujących tematykę kwasów nukleinowych, ich funkcji, struktury i właściwości. Powinna to być również płaszczyzna rzeczowych dyskusji nie tylko teoretycznych ale również szczegółowych problemów warsztatowych. Formą działalności sekcji będą spotkania i konferencje naukowe organizowane w różnych ośrodkach naukowych. Będą one dotyczyły różnych aspektów biologii molekularnej kwasów nukleinowych. Będzie to również platforma prezentacji i promocji młodych biochemików oraz laureatów konkursów organizowanych przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne.

W celu przyspieszenia obiegu informacji otwarta została w sieci Internet strona WWW (Word Wide Web), na której umieszczane będą wszelkie wiadomości i komunikaty dotyczące aktualnych zamierzeń i działalności sekcji. Jest możliwość nadsyłania i umieszczania na tej stronie własnych wypowiedzi, uwag i komentarzy na temat aktualnych zadań badawczych, udoskonaleń technicznych, ciekawych wyników. Jest możliwość zamieszczania wszelkich sugestii, notatek, informacji o konferencjach, nowych książkach, metodach, wizytach gości zagranicznych, własnych pracach opublikowanych, seminariach lokalnych oraz wszelkich innych sprawach, które mogą być interesujące dla biochemików kwasów nukleinowych i nie tylko. Można podzielić się swoimi przemyśleniami dotyczącymi ogólnych problemów nauki. Materiały te mogą stanowić podstawę do publikacji na WWW biuletynu informacyjnego naszej sekcji. Strona WWW i jej adres widoczne są na ryc. 1.



Informuję jednocześnie, że pierwsze spotkanie naukowe już się odbyło. Konferencja miała na celu podkreślenie ważności i uczczenie 30 rocznicy odkrycia kodu genetycznego. Oprócz referatów dotyczących problemów rozpoznawania kwasów nukleinowych i białek, które wygłosili: Dr hab. G. Węgrzyn, Prof. dr hab. R. Adamiak, Dr hab. J. Zakrzewska-Czerwińska, Prof. dr hab. T. Twardowski, Dr hab. Z. Szwejkowska-Kulińska, Doc. dr hab. K. Szyfter i Dr A. Przykorska, odbyła się sesja otwarta, w której każdy z uczestników mógł w ciągu 5 minut przedstawić własne wyniki badawcze. W sesji tej wystąpili: Doc. dr hab. W. Baer-Dubowska, Prof. dr hab. R. Oliński, Prof. dr hab. A. Małkiewicz, Dr M. Figlerowicz, Mgr M. Oczkowski, Mgr K. Lesniewicz i Mgr W. Kaczmarek.

Zapraszam do czytania stron WWW.

Jan Barciszewski

**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.).

SEKCJA MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ
i
ODDZIAŁ POZNAŃSKI TOWARZYSTWA PATOLOGÓW

organizują Sympozjum Mikroskopii Elektronowej. Odbędzie się ono **6 grudnia 1996 r.** w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej A.M. w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49. Planujemy sympozjum jednodniowe w godzinach od 9.00 do 17.00.

Tematem przewodnim będą: **ultrastruktura płuca w fizjologii i patologii oraz diagnostyka ultrastrukturalna**. Przewidujemy także tematy wolne. Termin nadsyłania zgłoszeń uczestnictwa czynnego i biernego upływa z dniem **30 października**.

Streszczenia należy nadesłać także do dnia **30 października**. Streszczenia będą drukowane jako wydawnictwo Patologii Polskiej w języku angielskim. Akceptujemy także streszczenia polskie (czasopismo posiada własnego tłumacza).

Koszt uczestnictwa wyniesie 15 zł. Noclegi w cenie ok. 80 zł możemy zabezpieczyć w Hotelu „Olimpia” w pobliżu miejsca obrad.

Serdecznie zapraszamy do wzięcia udziału.

Prof. dr hab. W. Salwa-Żurawska

Prof. dr hab. W. Biczysko

Prace prosimy nadsyłać na adres:

Pracownia Mikroskopii Elektronowej
Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej
Akademia Medyczna w Poznaniu
ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. 0-61/673-481

lub 0-61/67-68-41 wewn. 481, 482, 483

fax. 0-61/673-481

Nr konta bankowego Oddziału Poznańskiego Polskiego Towarzystwa Patologów:
PKO BP I Oddz. w Poznaniu nr 63513-9827-132

**W. Mejbbaum-Katzenellenbogen's
Seminars on Molecular Biology
4. Nuclear Organization and
Intracellular Transport
(ARF and Protein 14-3-3)
Wrocław/Szklarska Poręba, June 23—25**
Info: Prof. Jan Szopa
Uniwersytet Wrocławski, Inst. Biochemii
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław, Poland
Fax (48) +71 252-930

Wskazówki dla autorów

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

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

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

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie, podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać 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 „Postępkach 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 standardowej, 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.

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

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

ILUSTRACJE: Ryciny winny być gotowe do reprodukcji. Fotografie czarno-białe (kontrastowe), powinny być wykonane na papierze matowym. 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 „górną-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa

UWAGA

Zawiadamiamy o zmianie numeru konta prenumeraty **Postępów Biochemii**.
Nowy numer konta: PBK XIII O/Warszawa 370044-1225-2720-3-69

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1996 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napi-

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

**Prenumerata krajowa dla instytucji:
60.00 zł**

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

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



Pokwitowanie dla wpłacającego

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-2720-3-69

stempel

Pobrano opłatę

Zł.

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-2720-3-69

stempel

Pobrano opłatę

Zł.

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-2720-3-69

stempel

Pobrano opłatę

Zł.

.....
podpis przyjmującego

