

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422



Advances in Biochemistry

TOM 43, NR 2, 1997

Nobel 1996 dla immunologów	66
Synergistyczne efekty MDP i innych immunoterapeutyków	73
Episjalina (MUC 1)	80
Uszkodzenia DNA a cykl komórkowy	85
Ubikwitynacja u drożdży	91
Koordinacja syntezy DNA	98
Transaktywujące i onkogenne właściwości białka XHBV	105
Białka wiążące ATP	111
Miozyna w chorobach serca	120

***Kwartalnik „Postępy Biochemii”
wydawany z pomocą finansową
Komitetu Badań Naukowych oraz
Instytutu Biologii Doświadczal-
nej im. M. Nenckiego PAN***

<http://rcin.org.pl>

WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03
REDAKTORZY
Editors

GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15
HANNA LASKOWSKA
pon. i czw. 14-16
tel. 659-85-71 w. 441

RECENZENCI ZESZYTU
Referees of this issue
BARBARA GRZELAKOWSKA-
SZTABERT

(Warszawa)
KATARZYNA JAGUSZTYN-
KRYNICKA

(Warszawa)
ANNA JAKUBIEC-PUKA

(Warszawa)
ANDRZEJ KASPRZAK

(Montpellier)
IRENA KAŁOL

(Warszawa)
MAŁGORZATA MANTEU-
FFEL-CYMBOROWSKA

(Warszawa)
MARIAN MORDARSKI

(Wrocław)
GRAŻYNA PALAMARCZYK

(Warszawa)
WOJCIECH RODE

(Warszawa)
ADAM SZEWCZYK

(Warszawa)
GRZEGORZ WĘGRZYN

(Gdańsk)
IWONA ŻAK

(Katowice)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel. (2) 659-85-71 w. 441
poniedziałki, czwartki 14⁰⁰-16⁰⁰
fax (22) 22-53-42

SPIS TREŚCI CONTENTS



Nobel nierychliwy, ale sprawiedliwy: odkrycie restrykcji MHC nagrodzone po 22 latach (Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny w roku 1991)

Better late than never: Discovery of MHC restriction awarded with Nobel Prize after twenty two years (Nobel Prize in Physiology or Medicine for 1996)

PIOTR KUŚNIERCZYK 66

Synergistyczne efekty immunomodulatorów typu muramylopeptydów i innych leków stosowanych wspólnie w chemioterapii

Synergistic effect of immunomodulators of muramyl peptides type with other medicines

KRYSTYNA DZIERZBICKA, MAGDALENA GOZDOWSKA,
ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK 73

Episjalina — nowopoznany składnik glikokaliksu i błony komórkowej komórek nabłonkowych

Episialin — a new recognized component of glycocalyx and cell membrane of epithelial cells

ANDRZEJ GINDZIENSKI, KRZYSZTOF ZWIERZ 80

Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego

The influence of DNA damage on cell cycle regulation

PIOTR WIDŁAK 85

System ubikwitynacji i jego rola u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

The ubiquitin conjugation system and its role in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

ANNA TOBIASZ, TERESA ŻOŁĄDEK 91

Koordinacja syntezy nici prowadzącej i opóźnionej DNA w widelkach replikacyjnych

Coordination of the leading and lagging DNA strand synthesis

IWONA J. FIJAŁKOWSKA, PIOTR JONCZYK 98

„X” ostatnia niewiadoma wirusa zapalenia wątroby typu B? Transaktywujące i onkogenne własności białka XHBV

„X” the last unknown of hepatitis B virus? Transactivating and oncogenic properties of X protein

MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ 105

Wewnątrzkomórkowe białka wiążące ATP

Intracellular ATP-binding proteins

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA I SŁAWOMIR PIKUŁA . . 111

Zmiany w domenie regulatorowej główki miozyny obserwowane w niektórych chorobach serca

Changes in the regulatory domain of myosin head observed in some heart diseases

ANNA MOCZARSKA 120

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

Better late than never: Discovery of MHC restriction awarded with Nobel Prize after twenty two years (Nobel Prize in Physiology or Medicine for 1996)

PIOTR KUŚNIERCZYK*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Co wiadano przed odkryciem Doherty'ego i Zinkernagla
 - II-1. Limfocyty B i T
 - II-2. Główny kompleks zgodności tkankowej (MHC)
 - II-3. Biologiczna rola MHC
- III. Krótkie życiorysy laureatów
- IV. Odkrycie restrykcji MHC
- V. Konsekwencje odkrycia Zinkernagla i Doherty'ego: Dalszy rozwój badań nad rozpoznawaniem antygeny przez limfocyty T
- VI. Zakończenie

Wykaz stosowanych skrótów: H-2 — główny kompleks zgodności tkankowej myszy (*histocompatibility-2*); Ir — zdolność do odpowiedzi odpornościowej (*immune response*); LCMV — wirus limfocytarnego zapalenia spłotu naczyniowego i opon mózgowych; MHC — główny kompleks zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*); TCR — receptor limfocytu T (*T cell receptor*).

I. Wstęp

10 grudnia 1996 r. w Sztokholmie Peter C. Doherty (obecnie profesor na Wydziale Nauk Medycznych na Uniwersytecie Stanu Tennessee) i Rolf M. Zinkernagel (obecnie dyrektor Instytutu Immunologii na Uniwersytecie w Zurychu) odebrali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny [1]. W ten sposób po 22 latach uhonorowano tym najbardziej prestiżowym odznaczeniem odkrycie, jak układ odpornościowy rozpoznaje komórki zakażone wirusem. Miano-

Contents:

- I. Introduction
- II. What was known before Doherty's and Zinkernagel's discovery
 - II-1. Lymphocytes B and T
 - II-2. Major histocompatibility complex (MHC)
 - II-3. Biological role of MHC
- III. Short C.V.'s of laureates
- IV. The discovery of MHC restriction
- V. Consequences of Zinkernagel's and Doherty's discovery: Further advances in studies on antigen recognition by T lymphocytes
- VI. Epilogue

wicie Doherty i Zinkernagel stwierdzili, że zabijanie mysich komórek zakażonych wirusem przez limfocyty uczulone (tzn. pobrane od myszy zakażonych tym samym wirusem) zachodzi tylko wtedy, gdy limfocyty mogą rozpoznać na zabijanych komórkach nie tylko wirus, lecz także własne cząsteczki głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC, od Major Histocompatibility Complex) [2, 3]. Wkrótce okazało się, że mechanizm ten, polegający na jednoczesnym rozpoznaniu cząsteczki obcej (antygeny) i własnej (MHC), nie ogranicza się do odporności przeciw-wirusowej, lecz stanowi powszechny mechanizm rozpoznawania obcych i własnych struktur przez limfocyty T. Rozpoznanie obcego antygeny wyłącznie w „kontekście” własnej cząsteczki MHC nazwano restrykcją MHC (MHC restriction) [4].

II. Co wiadano przed odkryciem Doherty'ego i Zinkernagla

II-1. Limfocyty B i T

Limfocyty T, o których była mowa wyżej, stanowią

* Doc. dr hab., Laboratorium Immunogenetyki, Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; E-mail: pklusnier@immuno.iitd.pan.wroc.pl

bardzo ważny element odporności organizmu. Odporność ta objawia się tym, że większość z nas na ogół pozostaje w dobrym zdrowiu mimo, iż żyjemy w środowisku pełnym zarazków, pasożytów itp. Rozróżniamy odporność wrodzoną i nabytą [5]. Odporność wrodzona jest nieswoista i nie wiąże się bezpośrednio z tematem tego artykułu. Stanowi ona pierwszą zaporę dla intruzów i w większości wypadków skutecznie broni nas przed zakażeniem.

Zdarza się jednak, że w sprzyjających dla siebie warunkach patogeny drobonustrój (wirus, bakteria, grzyb) lub pasożyt (robak) przełamie bariery odporności wrodzonej, wtargnie do ustroju, zacznie namnażać się i atakować tkanki. Wówczas, z pewnym opóźnieniem, „rusza do ataku” odporność nabyta. Opóźnienie wynika z faktu, że struktury intruza (antygeny) odmienne od własnych składników ustroju muszą zostać rozpoznane jako obce przez limfocyty (wyspecjalizowane komórki posiadające odpowiednie swoiste receptory). Następnie limfocyty te muszą się namnożyć przez szereg podziałów komórkowych, a wreszcie przejść w stadium dojrzałe, zdolne do unieczynnienia lub likwidacji patogenu.

Od lat sześćdziesiątych znano dwie, funkcjonalnie odmienne, grupy limfocytów: komórki B, dojrzewające w szpiku kostnym u ssaków, a w kaletce Fabrycjusza u ptaków, oraz komórki T, dojrzewające w grasicy [5, 6]. Komórki B produkują przeciwciała (immunoglobuliny) uwalniane do osocza krwi i niektórych innych płynów ciała. Immunoglobuliny tkwią także

czone w płynach ciała bądź znajdujące się na powierzchni obcych komórek, np. bakteryjnych. Każdy limfocyt B posiada tylko jeden rodzaj receptora (immunoglobuliny) o określonej swoistości, tj. rozpoznający dany antygen, lecz nie reagujący z innymi, niespokrewnionymi antygenami. Zapobiega to zaangażowaniu się wszystkich lub bardzo wielu komórek B w odpowiedź na dany patogen, co groziłoby szkodliwymi skutkami ubocznymi nadmiernego odczynu odpornościowego. Komórki o tej samej swoistości immunoglobulin wywodzące się z tej samej komórki wyjściowej nazywamy klonem komórkowym. Procesem, który doprowadza do powstania receptora o danej swoistości jest rearanżacja genów immunoglobulinowych², za której odkrycie [9] Susumu Tonegawa otrzymał Nagrodę Nobla w 1987 r. (patrz Tab. 1). Tak więc, wytwarzając przeciwciała wydzielane do płynów ciała (głównie do osocza krwi), limfocyty B stanowią główny element swoistej, nabytej odporności humoralnej (gr. humor = płyn). Odporność taką można przenieść z osobnika na osobnika za pomocą surowicy (np. bierne uodpornienie ludzi za pomocą surowicy przeciwężcowej [5, 10]).

Z kolei limfocyty T są odpowiedzialne za swoistą odporność komórkową, tj. taką, którą można przenieść z jednego organizmu do drugiego nie za pomocą surowicy, lecz przez przeniesienie komórek (a ściślej limfocytów T). Wiedziانو, że limfocyty T bardzo silnie odpowiadają na niezgodne (inne niż ich własne) antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej,

Tabela 1.

Nagrody Nobla przyznane w dziedzinie fizjologii lub medycyny za osiągnięcia w badaniach immunologicznych

Rok	Laureaci	Osiągnięcia
1901	E. A. v. Behring (Niemcy)	Bierne uodpornienie surowicą odpornościową
1908	I. I. Miecznikow (Rosja) i P. Ehrlich (Niemcy)	Miecznikow: komórkowa teoria odporności (fagocyty); Ehrlich: pierwsze ogólne teorie odporności swoistej i autotolerancji
1913	C. R. Richet (Francja)	Pierwsze doświadczalne wykazanie anafilaksji
1919	J. Bordet (Belgia)	Hemoliza z udziałem przeciwciał i dopełniacza
1930	K. Landsteiner (Austria)	Układ grup krwi AB0 i prosty test do ich określania przed transfuzją
1951	M. Theiler (USA)	Szczepionka przeciw żółtej febrze
1960	F. M. Burnet (Australia) i P. B. Medawar (W. Brytania)	Burnet: teoria selekcji klonalnej i tolerancji; Medawar: doświadczalne potwierdzenie tych teorii
1972	G. M. Edelman (USA) i R. R. Porter (W. Brytania)	Budowa cząsteczki immunoglobiny
1980	B. Benacerraf (USA), J. Dausset (Francja) i G. D. Snell (USA)	Główny kompleks zgodności tkankowej myszy (H-2) i człowieka (HLA)
1984	N. K. Jerne (W. Brytania), G. J. F. Koehler (RFN) i C. Milstein (Argentyna)	Jerne: teorie rozwoju i regulacji układu odpornościowego; Koehler i Milstein: produkcja przeciwciał monoklonalnych
1987	S. Tonegawa (Japonia)	Genetyka immunoglobulin
1996	P. C. Doherty (Australia) i R. M. Zinkernagel (Szwajcaria)	Restrykcja MHC

Opracowano wg [26] i Encyklopedii Powszechnej PWN, t. 3, 1975 i t. 5, 1988.

w błonie komórkowej limfocytów B, stanowiąc ich receptory rozpoznające antygen. Limfocyty B mogą rozpoznawać antygeny w postaci natywnej, rozpusz-

² Rearanżacja genów immunoglobulinowych została ostatnio wielokrotnie omówiona w piśmiennictwie polskim [5, 7, 8].

MHC. Oprócz testów *in vivo*, stosowanych od kilkadziesiąt lat do badania odporności komórkowej, takich jak odrzucanie przeszczepów nowotworowych oraz przeszczepów skóry i innych tkanek prawidłowych, wprowadzono już w owym czasie metody *in vitro*. Należą do nich: test mieszanej hodowli limfocytów, w którym mierzy się odpowiedź proliferacyjną limfocytów jednego osobnika (lub szczepu wsobnego zwierząt doświadczalnych, w którym wszystkie osobniki są teoretycznie jednakowe) na antygeny (zwane alloantigenami) drugiego osobnika (lub szczepu wsobnego) oraz test cytotoksyczności komórkowej, mierzący zabijanie (lizę) komórek docelowych przez limfocyty T cytotoksyczne [4]. Poza bezpośrednią funkcją tzw. efektorową, czyli efektem cytotoksycznym (zabijaniem komórek docelowych) limfocyty T spełniają ważne funkcje regulujące działanie układu odpornościowego. Przede wszystkim limfocyty T okazały się niezbędne (jako tzw. komórki T wspomagające, helper T cells) dla wytwarzania przeciwciał przez limfocyty B przeciw ogromnej większości antygenów [5, 6]. Wiadomo było, że podobnie jak limfocyty B, limfocyty T cechuje klonalnie rozdzielona swoistość wobec rozpoznawanych antygenów, choć molekularne podłoże tej swoistości nie było jeszcze znane.

II-2. Główny kompleks zgodności tkankowej (MHC)

Główny kompleks zgodności tkankowej (MHC), który już kilkakrotnie tu wspomniano, został opisany u myszy, człowieka, innych ssaków oraz innych kręgowców, nie wyłączając płazów i ryb [4, 11, 20, 27, 28]. Jest to zespół ściśle sprzężonych ze sobą genów, kodujących cząsteczki występujące na powierzchni komórek. Podstawą do identyfikacji antygenów kodowanych przez MHC była przede wszystkim reakcja odrzucania przeszczepu *in vivo* (najpierw przeszczepów komórek nowotworowych, później także przeszczepów skóry i innych tkanek i narządów), a następnie jej odpowiedniki *in vitro* (jak już wspomniano wyżej, mieszana hodowla limfocytów i cytotoksyczność komórkowa). Jednocześnie zaczęto produkować surowice odpornościowe, pozwalające określać antygeny zgodności tkankowej w serologicznym teście cytotoksycznym z udziałem dopełniacza — metodzie znacznie szybszej i tańszej niż metody komórkowe. Testy serologiczne i komórkowe wykazały ogromną różnorodność (polimorfizm) antygenów MHC; stwierdzono to u myszy, ludzi i większości innych zbadanych gatunków kręgowców. Polimorfizm ten polega na występowaniu w obrębie gatunku bardzo wielu allelicznych form genu kodującego daną cząsteczkę MHC, przy czym każdy z tych alleli występuje w populacji osobników tego gatunku ze względnie niską częstością. Np. mysz MHC, zwany H-2, występuje w bardzo wielu postaciach allelicznych oznaczanych małymi literami alfabetu, np. H-2^b, H-2^d, H-2^k itd. Zastosowanie suro-

wic pozwoliło również wyizolować cząsteczki MHC i scharakteryzować je biochemicznie jako glikoproteiny [4].

II-3. Biologiczna rola MHC

Do czasu odkrycia przez D o h e r t y ' e g o i Z i n k e r n a g l a zjawiska restrykcji MHC rola biologiczna tego kompleksu i znaczenie jego polimorfizmu nie były znane. Główne zjawisko obserwowane w związku z MHC, bezpośredni powód jego odkrycia — odrzucanie przeszczepów odmiennych genetycznie od gospodarza — jest sytuacją sztuczną. Wiedzano już wprawdzie, że zdolność ustroju, a ściślej jego limfocytów T, do odpowiedzi na proste syntetyczne antygeny peptydowe, a nawet na niektóre natywne antygeny białkowe, jest regulowana przez geny sprzężone z MHC, tzw. geny zdolności do odpowiedzi odpornościowej, Ir (*Immune response*) [4], lecz nie znano mechanizmu tej regulacji.

W ciągu dziesięciolecia poprzedzającego doświadczenia Z i n k e r n a g l a i D o h e r t y ' e g o inni badacze wielokrotnie byli już o krok od dokonania odkrycia restrykcji MHC, lecz za każdym razem obowiązujące w owym czasie teorie powstrzymywały ich przed postawieniem „kropki nad i”. Pierwszym takim momentem było odkrycie wspomnianych już genów Ir (odpowiedzi odpornościowej). Nawet wykrycie najważniejszych genów Ir w obrębie MHC nie pozwoliło immunologom skojarzyć tych faktów i wysunąć hipotezy, że geny Ir i geny MHC są tym samym. Przeciwnie, wysuwano nawet teorię, że geny Ir kodują receptor antygeny na limfocycie T [4].

Drugim momentem było spostrzeżenie, że odporność niektórych szczepów myszy na pewne wirusy chorobotwórcze jest związana z MHC. Trzecim — wykazanie, że współpraca limfocytów T z innymi komórkami układu odpornościowego (makrofagami, limfocytami B), konieczna dla rozwoju wielu typów odpowiedzi humoralnej i komórkowej, wymaga zgodności w MHC [4].

W wielu dyscyplinach nauki świetnych odkryć dokonali badacze, którzy dopiero wkroczyli do danej dziedziny i nie myśleli według schematów narzuconych przez aktualnie obowiązujące teorie, tak jak ludzie pracujący na tym polu od lat [12]. Podobnie było w naszym przypadku: Z i n k e r n a g e l i D o h e r t y byli młodymi ludźmi tuż po doktoracie, byli jeszcze obaj nowicjuszami w immunologii, a w dodatku pracowali w wielkim geograficznym oddaleniu od głównych ośrodków naukowych.

III. Krótkie życiorysy laureatów

Peter C. D o h e r t y, Australijczyk, ukończył medycynę weterynaryjną i po krótkiej praktyce w stanowej uczelni weterynaryjnej w Brisbane wyjechał na stypendium doktoranckie do Instytutu Badawczego More-

dun w Edynburgu (Szkocja). Uzyskał tam stopień doktora za badania nad wirusowymi chorobami owiec, problemem o ogromnym znaczeniu dla gospodarki australijskiej. Następnie powrócił do Australii, gdzie uzyskał zatrudnienie w Szkole Badań Medycznych im. Johna Curtina w Canberra. Tam też wkrótce przybył, do tego samego laboratorium, stypendysta Zinkernagel i wówczas zaczęli pracować razem.

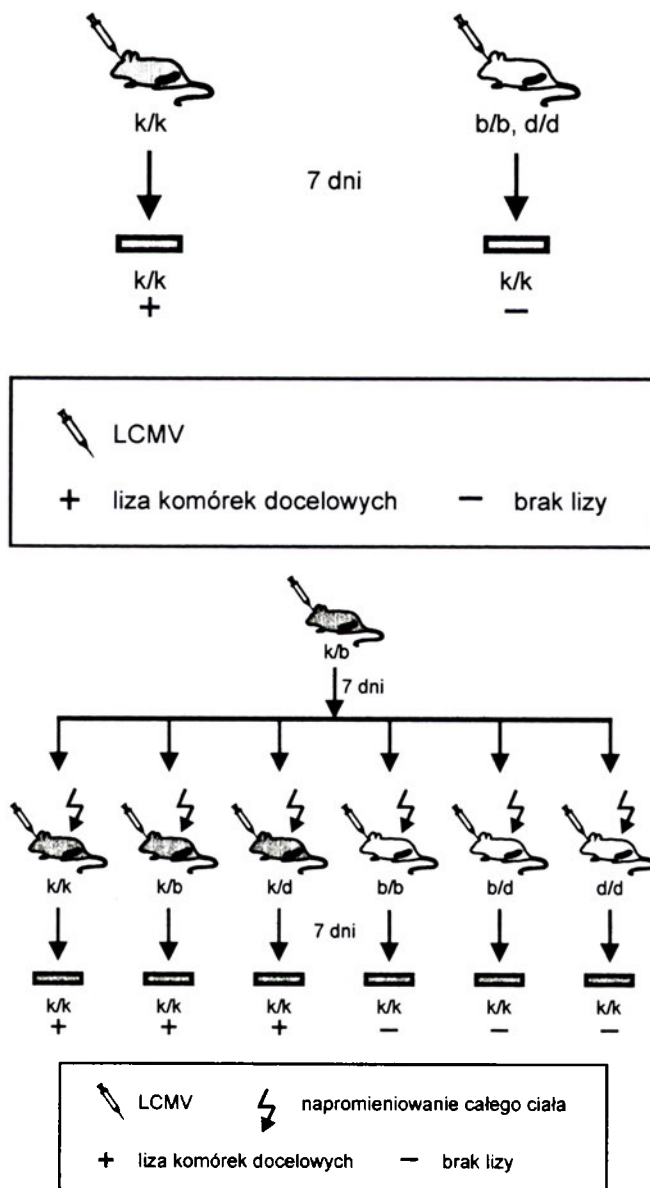
Rolf M. Zinkernagel, Szwajcar, ukończył medycynę w Bazylei, zamierzając pierwotnie zostać chirurgiem. Jednakże po kilkumiesięcznym stażu w klinice chirurgicznej odstąpił od tego zamiaru i zrobił kurs immunologii. Po doktoracie, zainteresowany chorobami zakaźnymi, złożył podanie o staż podoktorski w Szkole im. Johna Curtina, uzyskał stypendium i po przyjeździe do Australii nawiązał współpracę z Dohertym [4].

IV. Odkrycie restrykcji MHC

Wkrótce po rozpoczęciu wspólnej pracy Doherty i Zinkernagel przeczytali artykuł donoszący, że odporność na wirusa limfocytarnego zapalenia spłotu naczyniowego i opon mózgowych (LCMV = *Lymphocytic ChorioMeningitis Virus*) u myszy jest związana z genem Ir sprzężonym z MHC. LCMV jest zasadniczo nieszkodliwy dla myszy, o ile nie wstrzyknie się go bezpośrednio do mózgu. Wówczas zakaża komórki wyścielające jamy mózgu i rdzenia i powoduje śmierć zwierzęcia. Bezpośrednim powodem śmierci nie jest jednak sam wirus, lecz wywołana przezeń komórkowa odpowiedź odpornościowa: cytotoksyczne limfocyty T zabijają zakażone komórki rozpoznając na nich antygeny wirusa. W ten sposób zniszczona zostaje bariera krew-mózg i następuje brak równowagi osmotycznej w płynach otaczających mózg [4].

Zinkernagel i Doherty postanowili sprawdzić, czy odporność na zakażenie LCMV jest związana ze zdolnością (lub jej brakiem) do wytwarzania cytotoksycznych limfocytów T skierowanych przeciw temu wirusowi. W tym celu zakażali domózgowo wirusem różne dostępne im szczepy myszy, a po tygodniu pobierali od nich limfocyty śledziona i sprawdzali *in vitro* ich zdolność do zabijania zakażonych LCMV komórek fibroblastycznej linii L, znakowanych chromem 51 (były to jedyne komórki docelowe stosowane w owym czasie w tamtejszym laboratorium). Myszy wszystkich badanych szczepów, niezależnie jakie posiadały MHC, ginęły wskutek zakażenia wirusem (czyli nie potwierdziło się pierwotne doniesienie). Ale ku zaskoczeniu Zinkernagla i Doherty'ego zakażone komórki L (H-2^k) były zabijane wyłącznie przez limfocyty od zakażonych myszy ze szczepów posiadających H-2^k, ale nie przez limfocyty od szczepów o innym H-2 [2] (Ryc. 1A). W tej samej pracy autorzy wykazali, że zakażone LCMV makrofagi H-2^d były zabijane przez limfocyty od zakażonych myszy

H-2^d, lecz nie H-2^k. Wyniki te były pozornie zgodne z panującą wówczas teorią, że do oddziaływań między komórkami układu odpornościowego niezbędna jest identyczność ich MHC („like-like interaction” = oddziaływanie poprzez podobieństwo lub „intimacy model” = oddziaływanie przez bliski kontakt). Jednakże następne doświadczenia Zinkernagla i Doherty'ego opublikowane w pół roku później [3] wykazały, że jest inaczej, a więc teoria podobieństwa nie jest prawdziwa. Wyniki te uzyskano w skomplikowanym doświadczeniu z przenoszeniem komórek (Ryc. 1B): myszom pierwszego pokolenia mieszańców (F₁) dwóch szczepów o różnym MHC, mianowicie H-2^k i H-2^b, wstrzyknięto domózgowo LCMV. Po tygodniu od tych myszy pobrano komórki śledziona i przeniesiono je do innych myszy, napromieniowanych (czyli ze zniszczonym własnym układem odpornościowym) i zakażonych LCMV. Myszy-biorcy miały różne antygeny H-2 (H-2^k, H-2^b lub H-2^d). Celem tego



Ryc. 1. Schematy doświadczeń Zinkernagla i Doherty'ego, które doprowadziły do odkrycia restrykcji MHC. A — doświadczenia opisane w pierwszym doniesieniu [2]. B — doświadczenia opisane w drugim doniesieniu [3].

przenoszenia komórek była ich restymulacja antygenami wirusa u myszy o różnym H-2. Gdyby teoria podobieństwa była prawdziwa, wówczas limfocyty H-2^k/H-2^b (tzn. posiadające zarówno H-2^k jak i H-2^b) restymulowane wirusem u myszy H-2^b zabijałyby komórki H-2^k tak samo wydajnie, jak limfocyty restymulowane u myszy H-2^k. Tak jednak nie było (Ryc. 1B): tylko komórki T restymulowane wirusem w środowisku H-2^k były w stanie zabić komórki docelowe H-2^k. Z wyniku tego *Doherty* i *Zinkernagel* wyciągnęli wniosek, że przeciwwirusowe limfocyty T, aby zabić zakażoną wirusem komórkę docelową, oprócz antygeny wirusa muszą na niej rozpoznać cząsteczkę MHC i to tę samą, którą rozpoznały przy poprzednim kontakcie z tym antygenem. *Doherty* i *Zinkernagel* zaproponowali wówczas, że limfocyty T rozpoznają „zmienione własne” („altered self”) antygeny H-2, a czynnikiem zmieniającym może być wirus, modyfikacja chemiczna itp. Zgodnie z tą hipotezą, silna reakcja na obce antygeny (alloantygeny) MHC miała być również następstwem rozpoznania zmienionych (w tym przypadku genetycznie) własnych cząsteczek MHC [3, 13]. Chociaż autorzy ci nie znali oczywiście molekularnego mechanizmu tej zmiany, możemy z perspektywy 22 lat powiedzieć, że ich ówczesny pogląd był zasadniczo słuszny. Postaramy się to wykazać w dalszej części tego artykułu.

Publikacja opisująca omówione wyżej wyniki [3] podziałała jak grom z jasnego nieba: inni badacze swoistości limfocytów T natychmiast zreinterpretowali swoje dotychczasowe wyniki i podjęli dalsze eksperymenty dla sprawdzenia słuszności teorii restrykcji MHC w ich układach doświadczalnych. Okazało się, że zjawisko opisane przez *Zinkernagla* i *Doherty’ego* występuje również w innych badanych układach i jest ogólną zasadą rozpoznawania antygeny przez limfocyt T. Jest ono również wytłumaczeniem roli genów Ir (choć zrozumienie tego, że to właśnie cząsteczki MHC są produktami „genów Ir”, przyszło w parę lat później). „Pokazywanie” obcego antygeny limfocytowi T przez cząsteczkę MHC na powierzchni innej komórki nazwano „prezentacją antygeny” (*antigen presentation*).

Nie ulega oczywiście wątpliwości, że gdyby *Zinkernagel* i *Doherty* nie odkryli restrykcji MHC, zjawisko to zostałoby wcześniej lub później poznane przez innych, którzy już byli tego bardzo bliscy. Dlatego słyszy się głosy niektórych immunologów, że Nagroda Nobla nie należała się *Doherty’emu* i *Zinkernaglowi* lub nie tylko im. Tym niemniej, to właśnie ci dwaj młodzi wówczas ludzie dokonali tego odkrycia i ich zasługa jest niepodważalna.

V. Konsekwencje odkrycia Zinkernagla i Doherty’ego

Po odkryciu restrykcji MHC w odpowiedzi na

antygeny wirusa i potwierdzeniu natychmiast tego zjawiska w odpowiedzi na inne antygeny, nastąpił bujny rozwój immunologii. Tutaj wyliczymy tylko te dalsze odkrycia, które są bezpośrednio związane z rolą cząsteczek MHC w rozpoznawaniu antygenów przez limfocyty T.

a) Dwie klasy cząsteczek MHC: odkryto, że oprócz znanych już cząsteczek MHC (nazywanych obecnie cząsteczkami klasy I), prezentujących obce antygeny limfocytom T cytotoksycznym, istnieją cząsteczki MHC klasy II [4, 5, 14, 20, 27]. Mają one inną budowę i odgrywają rolę w przedstawianiu antygeny limfocytom T, zwanym pomocniczymi, przez makrofagi, limfocyty B i inne komórki układu odpornościowego nazwane komórkami prezentującymi antygen [4-6, 14].

b) Dwie subpopulacje limfocytów T: równocześnie odkryto, że właściwości cytotoksyczna i wspomagająca nie są funkcją tych samych limfocytów T zależnie od okoliczności, lecz dwu odrębnych ich subpopulacji, oznaczanych dziś jako komórki CD8⁺ (cytotoksyczne) i CD4⁺ (wspomagające) [14-16]. Obecne na powierzchni tych komórek cząsteczki CD8 i CD4 odgrywają również ważną rolę w dojrzewaniu limfocytów T w grasicy [17]³.

c) Każda z tych subpopulacji limfocytów T rozpoznaje antygeny prezentowane przez inną klasę cząsteczek MHC: klasę I rozpoznają komórki CD8⁺, klasę II — komórki CD4⁺ [14, 16, 17].

d) Przeciwciała monoklonalne [5, 8, 18] przeciw MHC umożliwiły izolowanie tych cząsteczek w czystej postaci i ich scharakteryzowanie biochemiczne.

e) Krystalizacja czystych cząsteczek MHC i ich analiza rentgenowska pozwoliła na dokładne poznanie budowy cząsteczek obu klas [19, 20]. Najważniejszym dla restrykcji MHC fragmentem cząsteczki jest część dystalna (najdalsza od powierzchni komórki), zawierająca bruzdę, która może wiązać antygeny.

f) Dzięki zbadaniu ich struktury odkryto, że cząsteczki MHC nie wiążą na ogół całych białek, lecz peptydy powstałe z ich częściowej degradacji proteolitycznej [5, 20, 21]. Aminokwasy peptydu nie schowane w bruzdzie MHC, lecz wystające z niej na zewnątrz mogą wchodzić w kontakt z TCR, za którego pośrednictwem limfocyt T jednocześnie rozpoznaje cząsteczkę MHC i związany przez nią peptyd. Kompleks MHC-peptyd jest to właśnie „zmodyfikowane własne MHC” postulowane 22 lata temu przez *Doherty’ego* i *Zinkernagla*.

g) Izolowanie, oczyszczanie i sekwencjonowanie peptydów naturalnie związanych w komórce przez

³ Za oba wspomniane cykle prac: odkrycie podziału limfocytów T na subpopulacje CD8⁺ i CD8⁻ (= CD4⁺) oraz udowodnienie roli cząsteczek CD8 i CD4 w selekcji limfocytów T w grasicy, prof. Paweł Kisielow z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN we Wrocławiu, pracujący obecnie w Bazylejskim Instytucie Immunologii, otrzymał w 1993 r. Nagrodę im. Jurzykowskiego, zwaną „polskim Noblem”.

cząsteczki MHC obu klas doprowadziły do określenia reszt aminokwasowych niezbędnych dla związania peptydu przez daną cząsteczkę MHC czyli do ustalenia tzw. motywów aminokwasowych peptydów wiązanych przez poszczególne cząsteczki obu klas [21]⁴. Ma to ogromne potencjalne znaczenie praktyczne dla opracowania szczepionek immunizujących (np. przy chorobach zakaźnych i nowotworach) lub odczulających (przy chorobach autoimmunizacyjnych).

h) Odkrycie i zsekwencjonowanie genów obu łańcuchów polipeptydowych receptora antygeny limfocytów T [22] spowodowało następny przełom w badaniach nad swoistością limfocytów T. M.in. przeniesienie (transfekcja) genów receptora antygeny z jednego klonu limfocytów T do drugiego pozwoliło wykazać, że ten sam receptor wystarcza dla rozpoznania zarówno cząsteczki MHC jak i prezentowanego przez nią antygeny [23]. Dokładne krystalograficzne zbadanie budowy receptora antygeny limfocytów T [24, 25] pozwoli na ostateczne zdefiniowanie jego regionów kontaktujących się z cząsteczką MHC i z peptydem.

Powyższy przegląd nie wyczerpuje listy osiągnięć immunologii, będących następstwem zrozumienia restrykcji MHC. Chcieliśmy tu tylko zasygnalizować najważniejsze z nich. Można przypuścić z dużym prawdopodobieństwem, że wiele z wymienionych wyżej odkryć również zostanie nagrodzonych „Noblem” i to w niedalekiej przyszłości. Lista nagród Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny przyznanych w ostatnich kilkudziesięciu latach za odkrycia immunologiczne (Tab. 1) świadczy o wielkim i wciąż rosnącym znaczeniu tej gałęzi nauk biomedycznych.

Tak więc odkryta przez Zinkernagla i Doherty'ego restrykcja MHC polega, jak wiemy dzięki zasygnalizowanym tu odkryciom, na molekularnych mechanizmach obróbki i prezentacji antygeny przez komórki zwane prezentującymi oraz rozpoznaniu tego antygeny przez limfocyty T. Peptydy pochodzące z proteolitycznej degradacji białek są wiązane przez cząsteczki MHC i transportowane na powierzchnię komórki, gdzie mogą być rozpoznane przez te limfocyty T, które posiadają receptor o odpowiedniej swoistości. Rozpoznawany jest zarówno peptyd, jak i „przedstawiająca” go cząsteczka MHC. W jednoczesne rozpoznanie obu tych cząsteczek zaangażowany jest ten sam receptor limfocytu T.

W zdrowym, nie zakażonym organizmie cząsteczki MHC wiążą i „przedstawiają” limfocytom T peptydy pochodzące przeważnie z własnych białek ciała. W prawidłowych warunkach peptydy te nie wywołują odczynów odpornościowych, ponieważ podczas rozwoju limfocytów T potencjalnie autoreaktywne ich klony są eliminowane lub unieczynniane. Jednakże

w pewnych, niekorzystnych dla ustroju okolicznościach własne peptydy mogą zostać rozpoznane jako rzekomo obce i wywołać reakcję autoagresywną. Prowadzi to do rozwoju choroby autoimmunizacyjnej. Dokładne poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podłoża tego rodzaju chorób może pomóc w znalezieniu skutecznych sposobów ich leczenia. Próby takie są już obecnie podejmowane.

W razie zakażenia ustroju zarazek wytwarza sam swoje białka lub zmusza komórki gospodarza do ich produkcji. Peptydy wywodzące się z tych białek pojawiają się na powierzchni komórek gospodarza dzięki prezentującym je cząsteczkom MHC. Stanowi to sygnał dla układu odpornościowego, że pojawiło się coś obcego. Rozpoczyna się wówczas swoista reakcja odpornościowa przeciw patogennemu drobnoustrojowi. Poznanie restrykcji MHC i jej molekularnego mechanizmu umożliwi racjonalne poszukiwanie bezpiecznych, syntetycznych szczepionek przeciw wielu patogenom.

VI. Zakończenie

Na zakończenie ceremonii wręczenia zeszłorocznych Nagród Nobla odbył się bankiet, w czasie którego jeden z laureatów każdej Nagrody musiał wygłosić toast. Rolf C. Zinkernagel, przemawiając w imieniu swoim i Petera M. Doherty'ego, podzielił pracowników nauki na zbieraczy, klasyfikatorów, poszukiwaczy, rzemieślników, artystów, poetów nauki, filozofów oraz mistyków i wyznał, że Peter należy do kategorii mistyków, a on sam do zbieraczy. Jak widać, połączenie zmundnego zbieracza danych z „mystykiem” umiejącym dojrzeć możliwość ich interpretacji przeoczoną do owej pory przez innych badaczy przyniosło znakomity owoc w postaci ujawnienia restrykcji MHC — mechanizmu prezentacji i swoistego rozpoznawania antygeny we wszystkich odczynach wykonywanych lub nadzorowanych przez limfocyty T, czyli w niemal wszystkich reakcjach układu odpornościowego.

*Artykuł otrzymano 20 lutego 1997 r.
Zaakceptowano do druku 25 lutego 1997 r.*

Piśmiennictwo

Ze względu na ograniczenie objętości pracy wymieniono tylko najważniejsze pozycje piśmiennictwa, starając się podawać polskie podręczniki i prace przeglądowe tam, gdzie informacje w nich zawarte lub cytowana przez nie literatura przedmiotu wystarczy zainteresowaniu czytelnikowi do rozszerzenia wiedzy.

1. Nobelfoersamlingen, Karolinska Institutet, Press release, October 7, 1996
2. Zinkernagel R M, Doherty P C (1974) *Nature* (Lond) **248**: 701-702
3. Zinkernagel R M, Doherty P C (1974) *Nature* (Lond) **251**: 547-548
4. Klein J (1986) *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*, Wiley, New York

⁴ Za te badania prof. Hans-Georg Rammensee, obecnie na Uniwersytecie Tuebingen, otrzymał szereg prestiżowych nagród niemieckich, m.in. im. G.W. Leibnitza i im. P. Ehrlicha.

5. Jakóbiński M (1995) w: Immunologia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
6. Nossal G J V (1993) *Świat Nauki* **11**: 21-29
7. Janusz M (1992) *Kosmos* **41**: 383-400
8. Rudnicka W (1992) *Kosmos* **41**: 413-428
9. Tonegawa S (1983) *Nature (Lond)* **302**: 575-581
10. Hyde R M (w druku) Immunologia, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław
11. Salter-Cid L, Flajnik M F (1995) *Crit Rev Immunol* **15**: 31-75
12. Beveridge W I B (1960) Sztuka badań naukowych, PZWL, Warszawa
13. Doherty P C, Zinkernagel (1975) *Lancet* (June 28): 1406-1409
14. Kuśnierczyk P (1992) *Kosmos* **41**: 349-369
15. Kisielow P, Hirst J A, Shiku H, Beverly P C L, Hoffman M K, Boyse E A, Oettgen H F (1975) *Nature (Lond)* **253**: 219-220
16. Kisielow P (1984) *Post Hig Med Dośw.* **38**: 577-599
17. von Boehmer H, Kisielow P (1991) *Świat Nauki* **12**: 48-56
18. Paprocka M (1993) *Kosmos* **43**: 273-284
19. Bjoerkman P J, Saper M A, Samraoui B, Bennett W S, Strominger J L, Wiley D C (1987) *Nature (Lond)* **329**: 506-512
20. Falkiewicz B, Liberek B (1996) *Post Biochem* **42**: 41-48
21. Rammensee H-G, Friede T, Stevanović (1995) *Immunogenetics* **41**: 177-228
22. Hedrick S M, Cohen D I, Nielsen E A, Davis M M (1984) *Nature (Lond)* **308**: 149-153
23. Dembić Z, Haas W, Weiss S, McCubrey J, Kiefer H, von Boehmer H, Steinmetz M (1988) *Nature (Lond)* **320**: 232-238
24. Bentley G A, Boulot G, Karjalainen K, Mariuzza R A (1995) *Science* **267**: 1984-1987
25. Fields B A, Ober B, Malchiodi E L, Lebedeva M I, Braden B C, Ysem X, Kim J-K, Shao X, Ward E S, Mariuzza R A (1995) *Science* **270**: 1821-1824
26. Nobel award for Doherty and Zinkernagel (1996) *Immunol Today* **17**: 541-542
27. Falkiewicz B, Liberek B (1996) *Post Biochem* **42**: 340-349
28. Płytycz B, Seljelid R (1996) *Central-Europ J. Immunol* **21**: 3-11

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

zaprasza do udziału w Konkursie
na najlepszy wykład akademicki
w roku 1997

Regulamin nagrody

1. Intencją nagrody jest popularyzacja biochemii i biologii molekularnej oraz pozyskanie materiałów dydaktycznych.
2. Warunkiem wzięcia udziału w Konkursie jest przygotowanie wykładu na wybrany temat uwzględniający najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie oraz ilustrujących go materiałów w postaci maszynopisu, rysunków i kompletu przezroczy. Termin nadsyłania materiałów mija 30.04.1997 r.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizuje sesję, na której zostaną wygłoszone konkursowe wykłady. Maksymalny czas wystąpienia 2 × 45 minut. W 1997 roku sesja odbędzie się na początku czerwca. Nagroda Główna i wyróżnienia zostaną przyznane w dniu Konkursu.

Członkowie Zarządu Głównego tworzą Komisję Konkursową. Oceniają oni prezentację, wartość merytoryczną i dydaktyczną wykładów przyznając od 0 do 10 punktów. Komisja obraduje

niejawnie, a protokół z obrad i inne materiały pozostają w dokumentacji Towarzystwa. Nagrodę uzyska osoba, która otrzyma największą liczbę punktów. Nazwisko zwycięzcy Konkursu zostanie podane do wiadomości Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w „Postępach Biochemii” oraz w „Listach”.

Materiały konkursowe: maszynopis wykładu, rysunki, przezrocza i programy komputerowe stają się własnością Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i będą rozpowszechniane w placówkach naukowych i dydaktycznych jako wykłady autorskie nagrodzonych osób, rekomendowane przez Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wymagana jest pisemna zgoda na przekazanie materiałów na własność Towarzystwa. Towarzystwo zastrzega sobie prawo do zakupu materiałów nienagrodzonych.

Niniejsza wersja regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 5 listopada 1990 roku.

Synergistyczne efekty immunomodulatorów typu muramylopeptydów i innych leków stosowanych wspólnie w chemioterapii

Synergistic effect of immunomodulators of muramyl peptides type with other medicines

KRYSTYNA DZIERZBICKA¹
MAGDALENA GOZDOWSKA²
ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK³

Spis treści:

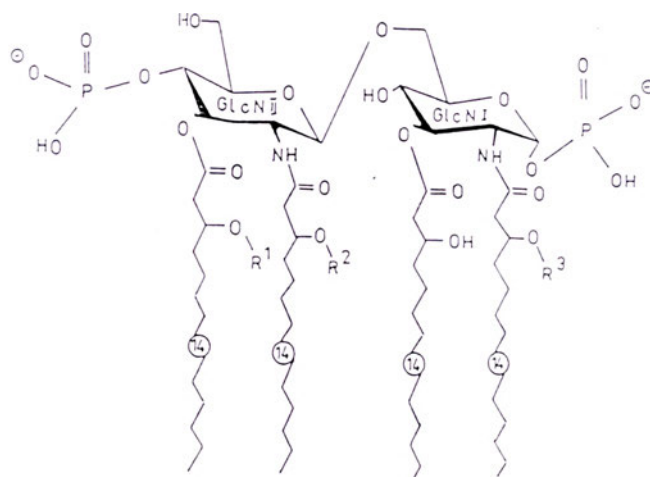
- I. Wstęp
- II. Muramyłodipeptyd — MDP
- III. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z antybiotykami
 - III-1. Leczenie infekcji bakteryjnych
 - III-2. Leczenie infekcji grzybiczych
 - III-3. Leczenie infekcji pasożytniczych
 - III-4. Leczenie infekcji wirusowych
- IV. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z innymi immunomodulatorami
 - IV-1. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z diestrami trehalozy
 - IV-2. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z endotoksynami
 - IV-3. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z cytokinami
 - IV-4. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z tuftsyną
- V. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z cytostatykami
- VI. Muramylopeptydy, adiuwantowe składniki szczepionek
- VII. Możliwość zastosowań klinicznych

Contents:

- I. Introduction
- II. Muramyl dipeptide — MDP
- III. Synergistic effect of muramyl peptides with antibiotics
 - III-1. Treatment of bacterial infections
 - III-2. Treatment of fungal infections
 - III-3. Treatment of parasitic infections
 - III-4. Treatment of viral infections
- IV. Synergistic effect of muramyl peptides with other immunomodulators
 - IV-1. Synergistic effect of muramyl peptides with trehalose diesters
 - IV-2. Synergistic effect of muramyl peptides with endotoxins
 - IV-3. Synergistic effect of muramyl peptides with cytokines
 - IV-4. Synergistic effect of muramyl peptides with tuftsin
- V. Synergistic effect of muramyl peptides with cytostatics
- VI. Muramyl peptides adjuvant components for vaccines
- VII. Possibility of clinical applications

Wykaz stosowanych skrótów: A-171 — monosacharydowy syntetyczny analog Lipidu A (Lipid A Ryc. 1) zawierający w poz. C-2 i C-3 (R)-3-hydroksytetradekanoilo- lub (R)-3-(hydroksytetradekanoiloksylo)-tetradekanoilo-4-fosforano-glukozaminę; A-172 — monosacharydowy syntetyczny analog Lipidu A zawierający w poz. C-2 i C-3 (R)-3-(hydroksytetradekanoiloksylo)-tetradekanoilo- lub (R)-3-tetradekanoiloksylo-tetradekanoilo-4-fosforano-glukozaminę; A-506 — disacharydowy analog Lipidu A; B30-MDP — 6-0-(2-tetra-decyloheksadekanoilo)-MDP; CGP19835 — zob. MTP-PE; CSF — czynnik stymulujący kolonizację (*colony stimulating factor*); ED₅₀ — 50-procentowa dawka efektywna (50% effective dose); FCA — kompletny adiuwant Freuda (*Freud's complete adjuvant*); FUdR — 5-fluoro-2'-dezoksyuridy-na; 5FU — 5-fluorouracyl; G-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (*granulocyte colony stimulating factor*); GM-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrop-*

hage colony stimulating factor); GMD — β -1, 4- N-acetylo-glukozamyl-MDP; HLA-DR — antygeny kodowane przez



Ryc. 1. Lipid A. R¹ — reszta laurylowa, R² — reszta mirystylowa, R³ — H

¹Dr inż., ²mgr inż., ³prof. dr hab. inż., Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

region DR u człowieka (*I-region-associated antigens in man*), IgG — immunoglobulina klasy G; IL-1 α — interleukina 1 α ; LPS — lipopolisacharyd; L18-MDP — 6-*O*-stearoilo-MDP; MAF — czynnik aktywujący makrofagi (*macrophage activating factor*); MDP — muramylo-dipeptyd (*N*-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutamina); M-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (*macrophage-colony stimulating factor*); MDP-Lys(L18) — *N*² (*N*-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutaminylo)-*N*⁶-stearoilo-L-lizyna; MTP-PE — *N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutaminylo-L-alanylo-2-(1', 2'-dipalmitoilo-sn-glicerolo-3'-hydroksyfosforyloksy)-etyloamid; Murabutide — ester *n*-butylowy *N*-acetylmuramylo-L-alanylo-D-glutaminy; nor-MDP — analog MDP nie zawierający grupy metylowej w łańcuchu bocznym kwasu muraminowego; r-IFN- γ — rekombinowany interferon gamma; 6-*O*-stearoilo-[Abu¹] MDP — *N*-acetylo-6-*O*-stearoilo-muramylo-L- α -aminobutyrylo-D-izoglutamina; TCF — hipoteza immunologicznej kontroli wzrostu (*tissue coding factor*); TDM — 6,6'-dimykolilo- α , α' -D-trehaloza; TNF — czynnik martwicy nowotworu (*tumor necrosis factor*).

I. Wstęp

Współczesna immunologia jest ukierunkowana głównie na stosowanie syntetycznych, chemicznie czystych związków. Stwierdzenie to dotyczy również adiuwantów stosowanych w syntetycznych szczepionkach nowej generacji. Opisano serie takich związków jak: muramylopeptydy, pochodne kwasów nukleinowych, pochodne zawierające siarkę (np. Levamisol), różne polimery (np. kopolimery piranowe, siarczan dekstranu), glikolipidy (np. lipid A), retinol i inne. Należy jednak pamiętać, że związki te stosowane jako immunomodulatory wzmagają działanie nie tylko szczepionek odpornościowych, ale mogą również być stosowane w terapii wielolekowej dając efekty synergistyczne. W tej publikacji skupimy się na synergistycznym działaniu MDP i jego analogów z różnymi lekami. W ostatnich latach pochodne MDP są intensywnie badane, ponieważ silnie stymulują odporność humoralną, komórkową i niespecyficzną organizmu.

II. Muramylo-dipeptyd — MDP

W 1945 r. Freud opisał możliwość wzmagania odpowiedzi immunologicznej indukowanej za pomocą różnych antygenów. Stosowane antygeny rozpuszczone lub zawieszane w wodzie, a następnie zemulgowane z prątkami kwasoopornymi w oleju mineralnym dają emulsję wodno-olejową zwaną kompletnym adiuwantem Freuda (FCA) [1]. Preparat ten, postrzegany jako jeden z najsilniej działających immunostymulatorów, ma ograniczone zastosowanie kliniczne, spowodowane licznymi objawami ubocznymi na organizm ludzki.

W 1974 r. Ellouz i wsp. [2] opisali syntezę *N*-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutaminy (muramylo-dipeptyd, MDP, Wzór I), najmniejszej adiuwantowo czynnej cząsteczki otrzymanej na wzór naturalnego fragmentu ściany komórkowej *Mycobacterium*. Okazało się, że MDP wykazywał dłuższe działanie niż

kompletny adiuwant Freuda (FCA), nie był immunogennym, a przede wszystkim był niskotoksyczny i pozbawiony wielu efektów ubocznych, które uniemożliwiały kliniczne zastosowanie kompletnego adiuwantu Freuda [3]. W poszukiwaniu analogów bardziej selektywnych, o dłuższym czasie działania i wyższej aktywności zsyntezowano kilkaset analogów MDP. Modyfikacje, miały na celu otrzymanie pochodnych MDP o zwiększonej lipofilowości, zarówno poprzez zmiany reszty cukrowej kwasu muraminowego, składu aminokwasowego muramylo-dipeptydu, jak też poprzez modyfikację C-końcowej grupy karboksylowej.

Tabela 1 przedstawia 9 lipofilowych pochodnych MDP, które ze względu na swoje właściwości biologiczne zostały poddane badaniom klinicznym [4].

III. Synergistyczne oddziaływanie muramylo-dipeptydów z antybiotykami

W 1980 r. zauważono, że immunomodulatory typu MDP zwiększają aktywność antybiotyków wywołując niekiedy addytywny, a często synergistyczny efekt. Mimo to, większość początkowo prowadzonych badań eksperymentalnych z udziałem MDP skoncentrowana była na wykorzystywaniu immunomodulacyjnych właściwości muramylopeptydów, jako preparatów wzmacniających system odpornościowy organizmów w zwalczaniu różnego rodzaju infekcji [5, 6]. Dopiero w ostatnich latach wykazano, że łączne podawanie immunomodulatorów typu MDP z różnymi chemioterapeutykami jest korzystne w leczeniu niektórych chorób zakaźnych, ponieważ takie podejście powoduje nie tylko osłabienie układu chorobotwórczego (patogennego), ale zapewnia również wzmacnianie systemu obronnego organizmu gospodarza.

Poniżej przedstawiamy kilka eksperymentalnych przykładów leczenia infekcji bakteryjnych, grzybiczych, pasożytniczych i wirusowych, opartych na synergicznym współdziałaniu immunomodulatorów typu MDP i antybiotyków.

III-1. Leczenie infekcji bakteryjnych

Profilaktyczne podawanie MDP lub nor-MDP (10 mg/kg, 24 godz. przed infekcją i w czasie infekcji)

Wzór I. MDP

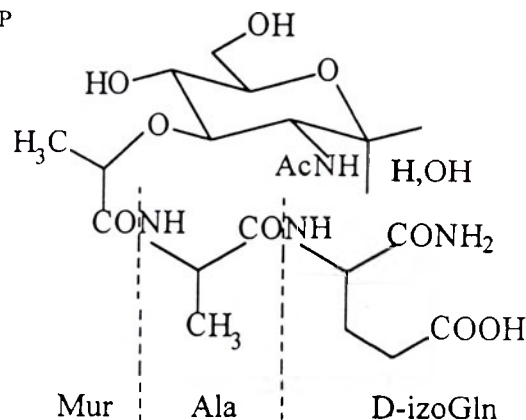
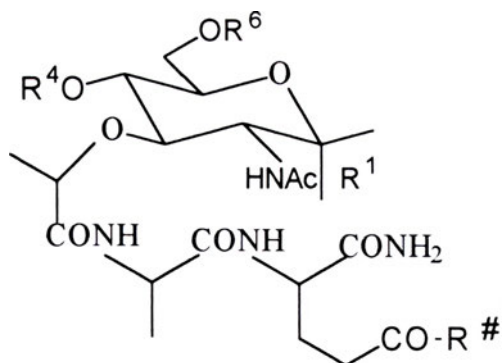


Tabela 1.

Lipofilowe analogi MDP.



R ¹	R ⁴	R ⁶	R	Profil biolog.*
OH	H	—COCH(C ₁₄ H ₂₉) ₂	OH	BT
OH	H	aminoacylo	OH	AB
OH	C ₅ H ₁₁ CO—	C ₅ H ₁₁ CO—	OH	TV
β-S-alkanoilo	H	H	H	A
OH	H	H	L—Lys—ε—COC ₁₇ H ₃₅	BTV
OH	H	H	L—Ala—OCH ₂ CHCH ₂ OCOC ₁₅	BTV
			 OCOC ₁₅ H ₃₁	
OH	H	H	L—Ala—cholesterylo—(3)	ATV
OH	H	H	L—Ala—dipalmitoilo—kefalina (MTP—PE)	ATV
OH	H	H	GlnOnBu zamiast izoGln	A

* A: aktywność adiuwantowa; B: aktywność przeciwbakteryjna; T: aktywność przeciwnowotworowa; V: aktywność przeciwwirusowa

skutecznie redukowało 50% efektywną dawkę (ED₅₀) antybiotyku cefroksadyny, u myszy zainfekowanych *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* lub *Streptococcus pyogenes*, natomiast nie miało wpływu na myszy zainfekowane *Streptococcus pneumoniae* [7]. W doświadczeniach, w których myszom wcześniej podano jedną z dwu lipofilowych pochodnych MDP: L18-MDP [8] lub MDP-Lys (L18) (100 µg na mysz, 24 godz. przed infekcją), zauważono 7-krotną redukcję ED₅₀ cefazoliny (przy infekcji *E. coli*), gentamycyny (przy infekcji *Pseudomonas aeruginos*) i aminopenicyliny (przy infekcji *S. aureus*), w porównaniu z myszami kontrolnymi, którym nie podawano muramylopeptydów.

Profilaktyczne dawki MDP zmniejszają śmiertelność myszy z zapaleniem otrzewnej wywołanym przez wewnątrzotrzewnowe wstrzyknięcie mieszanej kultury bakterii [10]. Całkowitą ochronę (100% przeżycie zainfekowanych szczurów) zapewniało profilaktyczne podanie MDP przed infekcją i leczenie antybiotykiem cefoksytyną, w trakcie infekcji [10]. W przypadku zapalenia płuc wywołanego u myszy (lub szczura) przez *K. pneumoniae* przeżywało 36%, którym podawano sam antybiotyk, cefmenoksym; 60% którym podawano cefmenoksym i MDP-Lys(L18) przed infekcją, podczas gdy spośród zwierząt nieleczonych, przeżywało tylko 8% (kontrola) [11].

Sugeruje się, zatem że muramylopeptydy mogą być

wykorzystywane w terapii antybiotykowej w przypadkach infekcji bakteryjnych, ponieważ wpływają na produkcję czynnika stymulującego kolonizację (CSF [12, 13], M-CSF [14], GM-CSF [15], G-CSF [16]).

III-2. Leczenie infekcji grzybiczych

W szeregu prac oceniano zdolność licznych pochodnych MDP (np. nor-MDP, 6-O-stearoilo[Abu']MDP) do redukowania 50% dawki efektywnej (ED₅₀) amfoterycyny B, flucytozyny, papulakandyny i innych antybiotyków stosowanych do zwalczania infekcji grzybiczych [17]. Na przykład dawka 0,1 mg/kg pochodnej MDP podana 24 godz. przed infekcją redukowała ED₅₀ amfoterycyny B 3-krotnie, natomiast wzrost dawki pochodnej MDP do 10 mg/kg prowadził do 10-krotnej redukcji ED₅₀ amfoterycyny B. Możliwość obniżania terapeutycznych dawek antybiotyków przeciwgrzybiczych ma ogromne znaczenie praktyczne, z uwagi na ich wysoką toksyczność dla organizmów wyższych.

III-3. Leczenie infekcji pasożytniczych

Muramylopeptydy wielokrotnie zwiększają efekt działania Glucantime (lek zawierający antymon) w leczeniu leiszmaniozy u myszy i chomików. Zarówno Glucantime (37,5 mg/kg dziennie po infekcji przez 8-11 dni), jak i MDP (3 mg/kg dziennie 4 i 2 dni przed

infekcją) oddzielnie były mało skuteczne w leczeniu tej choroby, a w połączeniu w podobnych dawkach prowadziły do całkowitego wyleczenia [18].

III-4. Leczenie infekcji wirusowych

Do nielicznych prac opisujących łączne stosowanie pochodnych MDP z czynnikiem przeciwwirusowym należy leczenie myszy z zapaleniem płuc wywołanym przez wirus opryszczki zwykłej typu 1. Podawano im zawarty w liposomach analog MTP-PE (w 3 dniu po infekcji) w połączeniu z lekiem przeciwwirusowym, o nazwie ribawirin. Terapia ta spowodowała wzrost przeżywalności myszy do 80%, co było sukcesem, ponieważ podawanie każdego czynnika z osobna nie było skuteczne (MTP-PE — 20%; ribawirin — 0%; kontrola — 0%) [19, 20].

IV. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z innymi immunomodulatorami

W wielu układach doświadczalnych infekcji badano synergistyczne oddziaływanie MDP (i jego pochodnych) z innymi naturalnymi lub syntetycznymi immunomodulatorami, takimi na przykład jak: TDM (diestry trehalozy), LPS (lipopolisacharydy), lipid A, czy cytokiny.

IV-1. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z diestrami trehalozy

Synergistyczne oddziaływanie MDP z TDM, stymulujące zarówno bakteryjną odporność niespecyficzną, jak i aktywność przeciwnowotworową i przeciwwirusową, stwierdzono na wielu układach eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo* [21-23], takich jak rak wątroby świnek morskich, czy grypa lub gruźlica myszy. Wykazano na przykład, że 75 µg TDM plus 150 µg lipofilowej pochodnej B-30MDP lub 6-O-stearoilo-MDP, wstrzyknięte dożylnie, chronią myszy przeciwko wirusowi grypy w znacznie większym stopniu niż sam MDP [24]. MDP w połączeniu z TDM nasila reakcje nadwrażliwości typu późnego (DTH) i miano przeciwciał swoistych dla albuminy jaja u szczurów. Wykazano doświadczalnie, że w wyniku zastosowania mieszaniny TDM z MDP jako adiuwanta występuje nasilenie odpowiedzi immunologicznej przeciwko białkom ściany komórkowej *B. abortus* [25].

Zarówno MDP jak TDM stymulują rozmaite funkcje makrofagów [26]. Stymulowanie przez MDP makrofagów płucnych, a przez TDM makrofagów otrzewnowych, przyczynia się do nasilenia odpowiedzi immunologicznej u zwierząt zakażonych donosowo *A. culbertseni* lub doustnie *T. gondii* [26]. MDP, jak i TDM, osobno pośredniczą w stymulowaniu cytotoxicności komórek naturalnych zabójców (NK), odgrywających ważną rolę obronną w przypadku zakażeń wirusowych [27]. Nie udały się jednak próby

ochrony zwierząt (pawianów) traktowanych MDP + TDM przed zarażeniem *Schistosoma mansoni* i *S. haematobium* [28]. Nie wykluczono, że wynik ten mógł być spowodowany zastosowaniem nieodpowiednich dawek badanych adiuwantów.

IV-2. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z endotoksynami

W 1993 r. przeprowadzono badania, które wykazały, że MDP w połączeniu z LPS aktywował uwalnianie TNF przez psie monocyty. Komórki te, inkubowane z MDP lub MDP + LPS, wykazywały cytostatyczną aktywność przeciw psim komórkom kostniakomięsaka [29]. Martwica włókniamięsa u myszy BALB/c wzrastała po równoczesnym dożylnym podaniu MDP i LPS [30]. Łączne działanie LPS z MDP było mniej toksyczne, niż samego lipopolisacharydu. LPS powodował wzrost produkcji interferonu- γ u myszy, którym wstępnie podawano MDP [30, 31].

Lipid A jest jednym z głównych składników ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Przypisuje się mu odpowiedzialność za silne, toksyczne właściwości lipopolisacharydów bakteryjnych. W ubiegłym dziesięcioleciu położono duży nacisk na prace prowadzące do otrzymania analogów lipidu A pozbawionych toksycznych efektów przejawianych przez preparaty naturalne. Otrzymane syntetyczne monosacharydowe analogi A-171 i A-172 są 500-1000 razy mniej toksyczne od naturalnego LPS [32]. W 1991 r. badano aktywność przeciwnowotworową syntetycznych monosacharydowych analogów lipidu A (A-171) i A-172) w stosunku do włókniamięsa. Komórki włókniamięsa (5×10^5) były wszczepione podskórnie myszom BALB/c (dzień 0), a po 7 dniach podano dożylnie syntetyczny analog A-172 (50 µg/mysz) i 10 µg MDP. Zauważono wyraźne nasilenie hamowania rozwoju nowotworu przez syntetyczny analog monosacharydowy A-172 we współdziałaniu z MDP (70% w porównaniu do 49% bez MDP). Mimo że aktywność przeciwnowotworowa disacharydowego syntetycznego analogu lipidu A (A-506), czy naturalnego LPS, we współdziałaniu z MDP jest wyższa niż syntetycznych monosacharydowych analogów lipidu A (A-171 i A-172) i MDP, to stosowanie tych pierwszych jest ograniczone ze względu na ich silniejsze działanie uboczne.

IV-3. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z cytokinami

Opisano synergistyczne stymulowanie makrofagów *in situ* w mysich pęcherzykach płucnych przez MDP podany w liposomach razem z MAF [33]. Prawdopodobnie makrofagi wymagają wcześniejszego kontaktu z MAF, a MDP stanowi sygnał dodatkowy wyzwalamyjący/wzmacniający reakcję. Wielokrotne wstrzyknięcie liposomów zawierających MDP + MAF

powodowało zahamowanie przerzutów guza do płuc i węzłów chłonnych i zapewniało przeżywanie 50% myszy. W innych badaniach opisano wzrost przeciwnowotworowej aktywności zwierzęcych makrofagów i ludzkich monocytów po podaniu MDP łącznie z interferonem- γ (IFN- γ) [34]. Stymulacja taka była swoista gatunkowo. I w tym wypadku MDP wzmacniał stymulację zapoczątkowaną interferonem- γ , a wyrażoną w postaci wzrostu ekspresji HLA-DR i receptora fragmentu F_c przeciwciał, wzmożonego metabolizmu utleniającego oraz wzrostu aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej. Okazało się jednak, że podawanie zamkniętej w liposomach mieszaniny r-IFN- γ z MDP, zapewniało dużą aktywność i znosiło swoistość gatunkową aktywowania cytotoksycznej funkcji makrofagów i monocytów przez interferon- γ [35]. Monocyty ludzi zdrowych stymulowane hydrofilową pochodną nor-MDP jednocześnie z IFN- γ uwalniają TCF odpowiedzialny za własności cytotoxiczne w stosunku do komórek zmienionych nowotworowo [36]. Natomiast lipofilowa pochodna MTP-PE podana razem z IFN- γ zwiększa ekspresję antygenów zgodności tkankowej MHC klasy I i II, powodując jednocześnie obniżenie ilości antygenów CD₁₄ [37]. W warunkach *in vitro* IL-2 + MDP (1-10 μ g/ml) wzmacnia produkcję przeciwciał, a IL-4 + MDP (1-10 μ g/ml) powoduje wzrost proliferacji preaktywowanych limfocytów B [38, 39].

W 1992 r. przeprowadzono eksperymenty [40], których celem było zbadanie czy współdziałanie pochodnej MDP (CGP19835) z interferonem- γ lub IL-2 może zahamować przerzuty do płuc myszy komórek nowotworowych nerkowego gruczolakoraka. Po 10 dniach od wszczepienia myszom BALB/c nerkowych komórek gruczolakoraka usunięto im chirurgicznie nerkę z lokalnym nowotworem, po czym dożylnie podawano liposomy, zawierające pochodną MDP i interferon- γ lub interleukinę-2. Podawanie systemowe liposomalnej CGP19835 łącznie z interferonem- γ lub interleukiną-2 znacznie redukowało liczbę płucnych przerzutów nowotworu u myszy z wyciętą nerką. Wyniki te zdają się sugerować, że podawanie liposomów zawierających syntetyczne aktywatory makrofagów, takie jak pochodne MDP, w połączeniu z cytokinami typu interferonu- γ , czy interleukiny-2 może okazać się skuteczne w zwalczaniu choroby. Ciekawe, że muramylopeptydy właśnie, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [4, 41, 15, 16], stymulują różnicowanie komórek produkujących cytokiny jak i produkcję samych cytokin.

IV-4. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z tuftsyną

Tuftsyna jest naturalnie występującym tetrapeptydem (Thr-Lys-Pro-Arg), aktywującym wiele funkcji makrofagów i granulocytów, takich jak fagocytoza, pinocytoza, ruchliwość, chemotaksja, aktywność bakteriobójcza i przeciwnowotworowa [42]. Pierwsze

doniesienia literaturowe na temat łącznego działania MDP i tuftsyny pojawiły się w 1993 r. Dotyczyły one między innymi niezdolnych do hamowania wewnątrzkomórkowej replikacji *Brucella abortus* makrofagów z sutka wołowego. Podanie tuftsyny i MDP przywracało makrofagom tę właściwość. Współdziałanie syntetycznej pochodnej MDP (GMDP), o wysokiej aktywności adiuwantowej, z tuftsyną wykazano w testach immunologicznych, stwierdzając stymulację produkcji przeciwciał przeciw albuminom jaja, stymulację reakcji nadwrażliwości typu późnego (DTH) i stymulację fagocytozy [43]. Mieszanina GMDP z tuftsyną i GMDP połączony wiązaniem kowalencyjnym z tuftsyną podawana w soli fizjologicznej wykazywała wysoką, porównywalną z IFA (niekompletnym adiuwantem Freuda), aktywność adiuwantową.

V. Synergistyczne oddziaływanie muramylopeptydów z cytostatykami

Liczne badania potwierdziły, że makrofagi wątroby mogą być aktywowane *in vitro*, w wyniku inkubacji z różnymi immunomodulatorami, takimi jak MDP, MTP-PE, czy lipopolisacharydy [44-46]. Sprawdzano też ewentualne efekty działania leków cytostatycznych w aktywowaniu makrofagów wątroby [47]. Oceniano efekt działania 5-fluorouracylu (5FU) i 5-fluoro-2'-dezyksyurydyny (FUdR) na makrofagi wątroby uprzednio aktywowane immunomodulatorami, w tym MDP w liposomach. Nie wykazano by 5FU czy FUdR wpływały na aktywność makrofagów, natomiast w połączeniu z MDP aktywność fagocytarna wzrastała, co może świadczyć o efekcie synergistycznym.

VI. Muramylopeptydy, adiuwantowe składniki szczepionek

Syntetyczne muramylopeptydy nie wywołują szkodliwych efektów ubocznych cechujących kompletny adiuwant Freuda, w tym dolegliwości autoimmunizacyjnych. Bada się więc ich aktywność adiuwantową zwiększającą skuteczność szczepionek uodparniających. Co więcej, aktywność adiuwantową muramylopeptydów można zwiększyć poprzez ich kowalencyjne przyłączenie do antygeny. Skórnej leiszmaniozie u myszy BALB/c zapobiegano przez stosowanie odpowiednio oczyszczonego antygeny i MDP. Ludzkich ochotników udało się uodparnić na tę infekcję przez dodawanie do szczepionek apirogennego Murabutide jak adiuwanta [48].

Jednym z najbardziej obiecujących adiuwantów jest „Syntex adjuvant formulation” (SAF), zawierający MDP [Thr] w emulsji ze skwalenem i Tween 80 stosowany w szczepionkach przeciwko wirusowi kocięj białaczki. Zapoczątkowano też próby kliniczne ze szczepionkami zawierającymi SAF przeciwko następującym infekcjom: wirusem małpiego zespołu nabytego niedoboru odporności (SAIDS), wirusami grypy,

wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV), wirusem Epstein-Barra (EBV) i wirusem opryszczki zwykłej (HSV) [49].

Jednym ze znacznych osiągnięć immunologii klinicznej są tzw. szczepionki II generacji, wolne od niebezpiecznych zanieczyszczeń pochodzenia biologicznego. W miejsce zdezaktywowanych bakterii, wirusów, czy pasożytów, całych lub ich fragmentów, stosuje się określone peptydy będące naturalnymi determinantami antygenowymi różnych mikroorganizmów chorobotwórczych. Same antygeny peptydowe wykazują bardzo słabą aktywność immunizacyjną, można ją jednak zwiększyć przez przyłączenie ich do określonych nośników. Dalszy wzrost antygenowości można osiągnąć przez równoczesne podawanie typowych adiuwantów, najczęściej pochodnych MDP lub MDP chemicznie połączonych z układem haptenu-nośnika [50]. Przykładem może być szczepionka antykoncepcyjna przebadana na 30 australijskich kobietach. Składa się ona z syntetycznego peptydu, odpowiadającego fragmentowi 109-145 części β podjednostki ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, związanego z inaktywowaną toksyną (toksoid) dyfterytu, emulgowanego w mieszaninie skwalenu-Arlacel i zawierającego nor-MDP jako adiuwant [51].

Podejmowane są próby otrzymywania szczepionek zawierających kopolimery więcej niż jednego antygenowego determinanta z adiuwantem, co może umożliwić otrzymanie szczepionek poliwalentnych. Przetestowano, między innymi, szczepionkę tetrawalentną wywołującą w obecności Murabutide wytwarzanie przeciwciał dla czterech antygenów inaktywowanych paciorkowców oraz zarazków takich chorób, jak: dyfteryt, malaria, zapalenie wątroby [52]. Wykazano także wysoką przydatność adiuwantową fosforowej pochodnej MDP (MTP-PE) między innymi w szczepionce przeciwko wirusowi typu I (HIV-1) oraz w szczepionce (IVV) przeciwko grypie [53, 54].

VII. Możliwość zastosowań klinicznych

Muramylopeptydy oraz ich syntetyczne analogi znajdujące się w trakcie zaawansowanych badań klinicznych, dają obiecujące wyniki. W tabeli 1 wymieniono pochodne MDP szczególnie ważne z punktu widzenia farmakologii. Z dotychczasowych doświadczeń wynika, że połączona chemioterapia z udziałem MDP jest najczęściej skuteczna wtedy, gdy MDP jest podawany profilaktycznie (24 godz. lub więcej przed infekcją). Optymalna kombinacja stosowanych czynników powinna uwzględniać profilaktycznie działającą dawkę immunomodulatora, czas jego podania i właściwą dawkę chemioterapeutyku [55, 56]. Wysuwa się sugestia, że kliniczne stosowanie immunostymulujących dawek MDP, w połączeniu z terapią antybiotykową, może dać dobre rezultaty w osłanianiu grup wysokiego ryzyka, szczególnie pacjentów z neutropenią. Jednak przed rutynowym powszechnym stosowaniem immu-

nomodulatorów typu MDP musi być szczegółowo określony ich toksykologiczny profil mimo, że pochodne MDP uważane są za mało toksyczne [57]. Synergistyczne oddziaływanie immunomodulatorów typu MDP z innymi lekami chemioterapii jest nadal szeroko badane w warunkach *in vitro* i *in vivo* pod kątem ich potencjalnych możliwości w leczeniu zakażeń i nowotworów.

Podziękowanie Pani dr Małgorzacie Stachowiak, która sprawdzała manuskrypt pod kątem terminologii medycznej, Komitetowi Badań Naukowych za finansowanie pracy w ramach projektu badawczego Nr 6P206 001 07.

Artykuł otrzymano 12 czerwca 1996 r.
Zaakceptowano do druku 2 stycznia 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Freud I, Sommer M, Walter (1945) *Science* **102**: 200-202
2. Ellouz F, Adam A, Ciorbarn R, Lederer E (1974) *Biochem Biophys Res Commun* **59**: 1317-1325
3. Chedid L, Lederer (1978) *Biochem Pharmacology* **27**: 2183-2186
4. Baschang G (1989) *Tetrahedron* **45**: 6331-6360
5. Dukor P, Schumann G (1987) W: Majde JA (red) *Immunopharmacology of Infections Diseases: Vaccine Adjuvants and Modulators of Non-Specific Resistance*. Alan R. Liss, New York, str 255-265
6. Parant M (1987) W: Majde JA (red) *Immunopharmacology of Infections Diseases: Vaccine Adjuvants and Modulators of Non-Specific Resistance*. Alan R. Liss, New York, str 235-244
7. Dietrich FM, Sackmann W, Zak O, Dukor P (1979) In: Nelson JD, Grassi C, eds *Current Chemotherapy and Infections Disease*. Proceedings of the 11th International Congresses of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol 2. Washington, DC: American Society for Microbiology, str 1730-1732
8. Osada Y, Mitsuyama M, Une T (1982) *Infect Immun* **37**: 292-300
9. Otani T, Une T, Osada Y (1988) *Arzneimittelforschung* **38**: 969-976
10. Dunn CW, Horton JW, Walker OB (1989) *Am J Surg* **157**: 548-551
11. Tataro O, Nakahama C, Soejima R, et al. (1989) In: Rubinstein R, Adam D, eds. *Recent advances in chemotherapy*. Proceedings of the 16th International Congress of Chemotherapy. Vol 1. E. Lewin-Epstein, Jerusalem **34**: 1-2
12. Yamaguchi F, Akasaki M, Tsukada W (1988) *Arzneimittelforschung* **38**: 980-983
13. Galelli A, Charlot B, Phillips NC, Chedid L (1989) *Cancer Res* **49**: 810-815
14. Akahane K, Yamaguchi F, Kita Y, Une T, Osada Y (1990) *Arzneimittelforschung* **40**: 179-183
15. Brondy VC, Kaushansky K, Shoemaker SG, Aggarwal BB, Adamson JW (1990) *J Immunol* **40**: 3789-3794
16. Shimoda K, Okamura O, Kawasaki C, Omori F, Matsuguchi T, Niho Y (1990) *Int J Immunopharmacol* **7**: 25729-736
17. Sackmann W, Dietrich FM (1981) In: Periti P, Grassi GG, eds. *Current chemotherapy and immunotherapy*. Proceedings of the 12th International Congress of Chemotherapy. Vol 2. Washington, DC: American Society for Microbiology, str 1162-1164
18. Adinolfi LE, Bonventre PF, Vander Pas M, Eppstein DA (1985) *Infect Immun* **48**: 409-416
19. Dietrich FM, Hochkeppel HK, Lukas B (1986) *Int J Immunopharmacol* **8**: 931-942
20. Gangemi JD, Nachtigal M, Barnhart D, Krech L, Jani P (1987) *J Infect Dis* **155**: 510-517

21. Yarkoni E, Lederer E, Rapp H (1981) *Infect Immun* **32**: 273-276
22. McLanghlin CA, et al. (1980) *Science* **208**: 415-416
23. Masihi KN, Brenner W, Azuma I, Lange W, Muller S (1984) *Infect Immun* **43**: 233-237
24. Masihi KN, Brehmer W, Lange W, Ribí E, Schwartzman S (1984) *J Biol Resp Modif* **3**: 663-671
25. Lederer E (1986) *Int J Immunotherapy* **4**: 267-278
26. Masihi KN, Bhaduri CR, Werner H, Janitschke K, Lange W (1986) *Int Archs Allergy appl Immun* **81**: 112-117
27. Masihi KN, Lange W, Rhode-Schulz B (1987) *Cancer Immunol Immunother* **24**: 19-24
28. Sturrock R. F, Cottrell BJ, Mahmond AAF, Chedid L, Kimani R (1985) *Parasitology* **90**: 101-104
29. Kurzman ID, Shi FE, MacEwen G (1993) *Veterinary Immunology and Immunopathology* **38**: 45-56
30. Bloksma N, Hofhuis FMA, Willers JMN (1984) *Cancer Letter* **32**: 159-162
31. Bloksma N, Hofhuis FMA, Willers JMN (1984) *Cancer Immunol Immunother* **17**: 154-157
32. Shimizu T, Ohtsuka Y, Yanagihara Y, et al. (1991) *Immunopharmac* **13**: 605-611
33. Sone D, Fidler IJ (1981) *Cell Immunol* **57**: 42-45
34. Sone S, Lopez-Berestein G, Fidler I (1986) *Cancer Immunol Immunother* **21**: 93-99
35. Fidler I, Fogler W, Kleinerman E, Saiki I (1985) *J Immunol* **135**: 4289-4296
36. Pace JL, Russell SW, Torres BA, Johnson HM, Gray PW (1983) *J Immunol* **130**: 2011-2013
37. Landmann R, Wesp M, Dukor P (1988) *Cell Immunol* **117**: 45-55
38. Souvannavong V, Adam A (1988) *J Chromatogr* **440**: 95-103
39. Souvannavong V, Brown S, Adam A (1988) *Molec Immunol* **25**: 385-391
40. Dinney CPN, Utsugi T, Fidler IJ, von Eschenbach AC, Killian JJ (1992) *Cancer Research* **52**: 1155-1161
41. Dinarello CA, Krueger JM (1986) *FASEB J* **45**: 2545-2548
42. Price RE, Templeton JW, Smith R, Adams LG (1993) *Veterinary Immunology and Immunopathology* **36**: 265-279
43. Titov VM, Meshcheryakova EA, Balashova TA, et al. (1995) *Int J Peptide Protein Res* **45**: 348-355
44. Kemeny N (1983) *Semin Oncol* **10**: 148-158
45. Daemen T, Veninga A, Dijkstra J, Scherphog GL (1989) *J Immunol* **142**: 2469-2474
46. Daemen T, Veninga A, Roerdiuk FH, Scherphog GL (1989) *Biochem Biophys Acta* **991**: 145-151
47. Daemen T, Regts J, Morselt H, Scherphog GL (1992) *Int J Immunopharmac* **14**: 857-864
48. Vouldoukis I, Ogunkolade BSW, Frommel D, Alier N, Monjour L (1988) *Experienta* **44**: 56-57
49. Allison AC, Byars NE, Waters RV (1986) W: Nervig RM et al (red) *Advances in carriers and adjuvants for veterinary biologics* Ames Iowa: Iowa State University Press, str 91-103
50. Chedid L (1986) W: Chedid L, Hadden JW, Spreafico F, Dukor P, Willoughby D (red) *Advances in immunopharmacology 3* Pergamon Press, Oxford, str 329-336
51. Jones WR, Judd SJ, Ing RMY et al (1988) *Lancet* **2**: 1295-1298
52. Kołodziejczyk AM, Kołodziejczyk AS (1987) *Post Bioch* **33**: 203-229
53. Wintsch J, et al (1991) *J Infect Dis* **162**: 219-225
54. Keitel W, Couch R, Bond N, et al (1993) *Vaccine* **11**: 909-913
55. Zak O, O'Reilly T (1990) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**: 472-478
56. Zak O, O'Reilly T (1991) *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 1527-1531
57. Ichihara N, Kanazawa R, Saski S, et al (1988) *Arzneimittelforschung* **38**: 1043-1069

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

Obecny adres:

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

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

Episjalina — nowopoznany składnik glikokaliks i błony komórkowej komórek nabłonkowych

Episialin — a new recognized component of glycocalyx and cell membrane of epithelial cells

ANDRZEJ GINDZIENSKI¹,
KRZYSZTOF ZWIERZ²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura episjaliny i lokalizacja genu episjaliny w genomie człowieka
- III. Biosynteza episjaliny
- IV. Nadekspresja i patologiczne formy episjaliny
- V. Cechy antygenowe patologicznych form episjaliny

Wykaz stosowanych skrótów: NANA — kwas N-acetyloneuraminowy.

I. Wstęp

Episjalina jest nabłonkową glikoproteiną, zlokalizowaną na szczytowej powierzchni błony komórek nabłonka gruczołowego, komórek endotelialnych w węzłach chłonnych, oraz powierzchniach komórek wyściełających jamy ciała (*mesothelium*) i zwróconych do ich światła [1]. Częsteczkom episjaliny przypisuje się funkcję antyadhezyjną i zdolność wiązania patogenów (antygenów), co utrudnia ich dostęp do receptorów komórkowych [2, 3]. Materiałem z którego izoluje się episjalinę jest mleko lub siara człowieka [4-8] lub zwierząt [9-12], dokąd przechodzi wraz z błoną komórkową w formie otoczki kuleczek mleka, oderwana od komórki w procesie laktacji [13].

Wczesne obserwacje dotyczące występowania w surowicy krwi antygeny związane z komórkami gruczołu piersiowego i tłuszczowymi osłonkami kuleczek mleka pochodzą z pierwszej połowy lat osiemdziesiątych [14-17]. Antygen ten był wykrywany w surowicy u kobiet z rakiem piersi, szczególnie po pojawieniu się przerzutów. Antygen stanowi mucyno-podobna substancja, określana przez różnych autorów mianem PAS-0, MAM-6, episjalina, *non-penetrating glycoprotein* (NPG), *epithelial membrane antigen* (EMA), *polimorphic epithelial mucin* (PEM), antygen CA15-3,

¹ Dr hab., Zakład Chemii Ogólnej i Organicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok ² dr hab., Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok

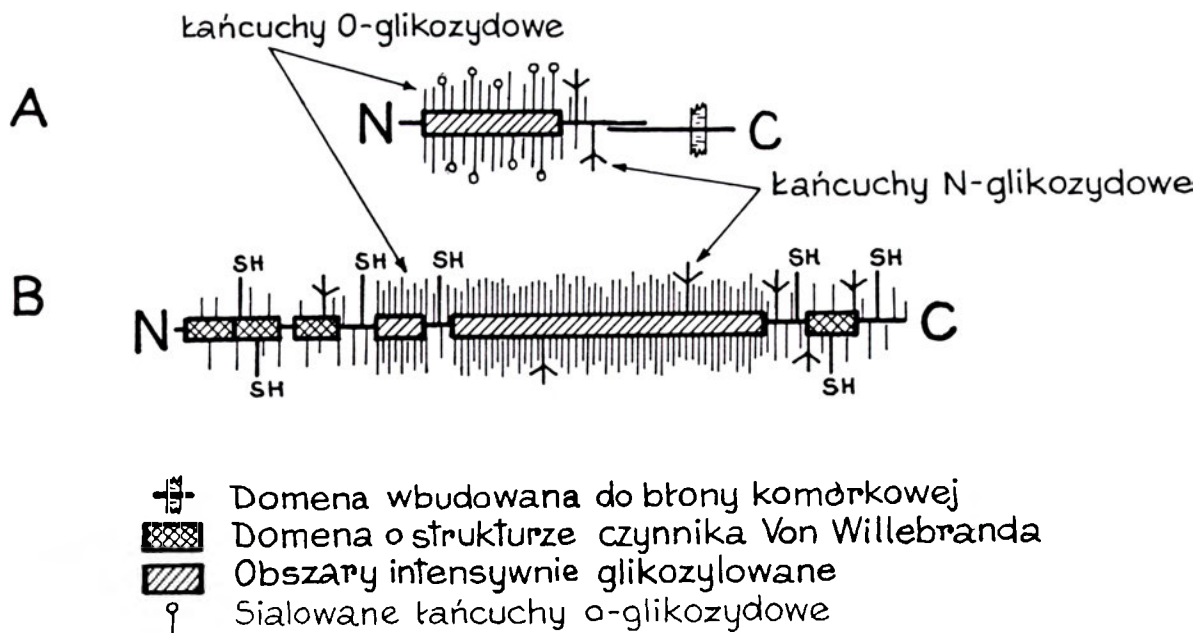
Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of episialin and localization of the gene in human genome
- III. Biosynthesis of episialin
- IV. Overexpression of episialin and its pathological forms
- V. Antigenic properties of pathological forms of episialin

czy epitektyna [13, 18, 19]. We współczesnym piśmiennictwie najczęściej używane są nazwy: episjalina, MUC1 lub PEM.

II. Struktura episjaliny i lokalizacja genu episjaliny w genomie człowieka

Otrzymanie cDNA rdzenia białkowego episjaliny pozwoliło na uzyskanie szeregu informacji dotyczących jej budowy i lokalizacji genu episjaliny w genomie [20-23]. Episjalina jest produktem genu oznaczonego symbolem MUC1, który w genomie człowieka jest zlokalizowany w chromosomie 1q21-24 [24-28]. Gen episjaliny zawiera 7 egzonów, z których w drugim znajdują się sekwencje nukleotydowe kodujące powtarzające się 20-aminokwasowe tandemy [29], zajmujące 2/3 częsteczki rdzenia białkowego. Każdy allel genu zawiera zmienną liczbę powtarzających się tandemów, co jest przyczyną znacznego polimorfizmu częsteczki. Determinantę antygenową rozpoznawaną przez monoklonalne przeciwciała stanowią konserwatywne 7-aminokwasowe struktury peptydowe PDTRPAP, zlokalizowane pomiędzy glikozylowaniami tandemami [20, 22, 30-32]. Episjalinę wyizolowano również z ludzkiej surowicy, częściowo oczyszczono oraz zidentyfikowano immunologicznie jako polimorficzną glikoproteinę o masie cz. ok. 400 kDa [33, 34]. Episjalina występuje w formie związanej z błoną komórkową i od mucyn wydzielniczych, których właściwości były przedmiotem odrębnego artykułu [35] różni się mniejszą masą cząsteczkową, mniejszą gęstością 0-glikozylacji, brakiem grup -SH umożliwiających powstawanie disiarczkowych oligomerów, oraz i tym, że nie tworzy żelu. Na rycinie 1A przedstawiony jest



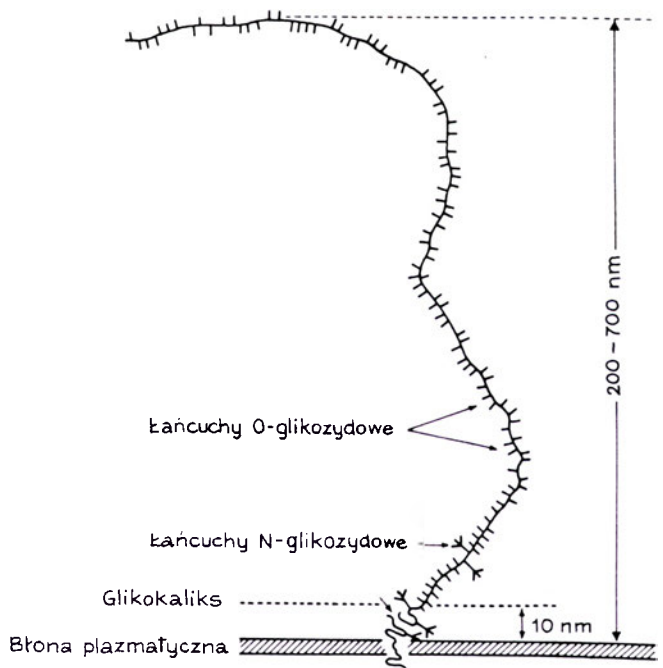
Ryc. 1. Schemat budowy episjaliny (A) i mucyny wydzielniczej (B) (wg [36], zmodyfikowany). Na rycinie zaznaczono N- i C-końcowe zakończenia łańcuchów polipeptydowych.

schemat budowy cząsteczki episjaliny z zaznaczeniem domeny wbudowanej do błony komórkowej w pobliżu C-końca cząsteczki. Rycina 1B przedstawia budowę podjednostki mucyny wydzielniczej.

Wbudowana do błony komórkowej cząsteczka episjaliny jest złożona z wielkiej zewnątrzkomórkowej domeny zawierającej od 1000 do 2200 aminokwasów, domeny błonowej i z domeny cytoplazmatycznej zawierającej 69 aminokwasów [20-23], (Ryc. 2). Na podstawie struktury cDNA ustalono, że w domenie zewnątrzkomórkowej każda z 20-aminokwasowych powtarzających się sekwencji zawiera liczne reszty seryny i treoniny (stanowiące 5 potencjalnych miejsc O-glikozylacji), oraz reszty proliny. Genetycznie uwarunkowana liczba powtórzeń waha się od 30 do 90, co wyraża się różną długością zewnątrzkomórkowej domeny. Z powodu licznych reszt prolinowych w łańcuchu polipeptydowym, w cząsteczce episjaliny dominuje struktura typu beta, ulegająca dodatkowo usztywnieniu wskutek dość gęstego rozmieszczenia łańcuchów oligosacharydowych. Przyjmując za J e n t o f t e m [43], że intensywnie O-glikozylowany 28-aminokwasowy peptyd ma długość 7 nm, mucyno-podobna domena episjaliny wystaje na 200-700 nm ponad błonę komórkową (Ryc. 2). Łańcuchy oligosacharydowe stanowiące ok. 50% masy cząsteczki mają skład typowy dla mucyn, z nieco większą zawartością galaktozy i NANA. Wykazano również występowanie pojedynczych łańcuchów oligosacharydowych połączonych N-glikozydowo [5, 10].

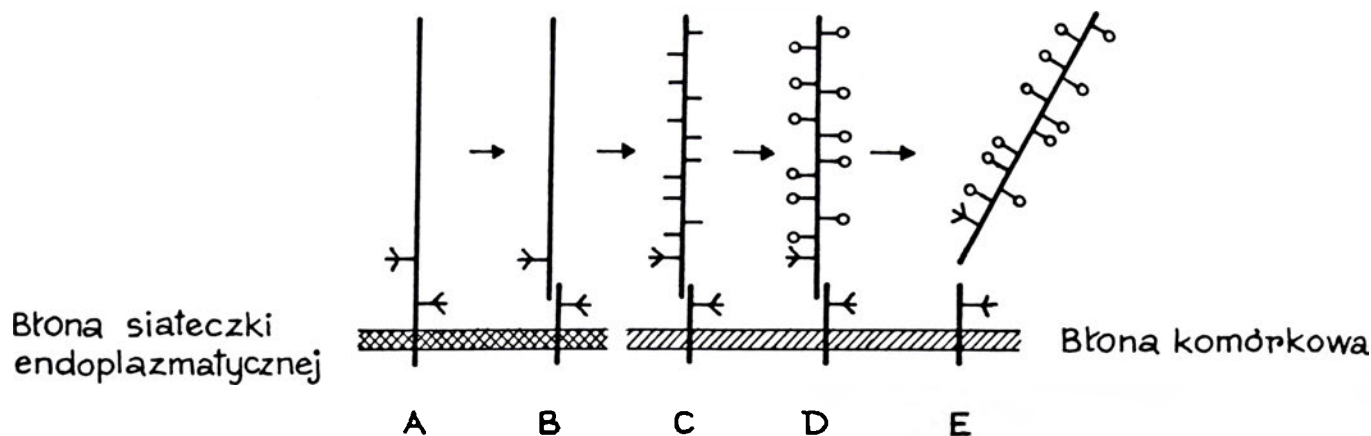
III. Biosynteza episjaliny

Biosynteza episjaliny w hodowlach tkankowych mutantów komórkowych badana była przez kilka zespołów [37-40]. W pierwszym etapie powstaje N-glikozylowany prekursor białkowy (ok. 200 kDa)



Ryc. 2. Episjalina i jej usytuowanie w błonie komórkowej. Strzałką zaznaczono miejsce niekwalencyjnego oddziaływania pomiędzy podjednostkami (wg [2], zmodyfikowany).

(Ryc. 3A) którego masa cząsteczkowa już po 4 min. ulega zmniejszeniu jeszcze w retikulum endoplazmatycznym wskutek odcięcia od C-końca cząsteczki fragmentu o masie 20 kDa (Ryc. 3B). Mimo tego obie części cząsteczki tworzą stabilny kompleks; C-końcowy peptyd ma charakter hydrofobowy i zostaje wbudowany do błony komórkowej, w której pełni rolę kotwicy dla większej podjednostki [20-22, 41], (Ryc. 3C). Do większej podjednostki, reprezentującej mucynopodobną domenę N-końcową, podczas wewnątrzkomórkowej wędrówki w kierunku błony komórkowej dobudowują się liczne O-glikozydowe łańcuchy oligosacharydowe (Ryc. 3C). Dalszy etap biosyntezy to dobudowywanie reszt kwasu sialowego, które stanowią zakoń-



Ryc. 3. Etapy biosyntezy episjaliny (wg [2], zmodyfikowany).

- A — N-glikozylowany prekursor episjaliny
- B — kompleks N-glikozylowanego prekursora z podjednostką transbłonową
- C — prekursor po O-glikozytacji
- D — prekursor po sialilacji
- E — oddysocjowanie episjaliny od podjednostki transbłonowej.

czenie łańcuchów oligosacharydowych, co łącznie zwiększa masę cząsteczkową episjaliny do ok. 400 kDa (Ryc. 3D). Większa podjednostka pozostaje czasowo zakotwiczona w błonie komórkowej poprzez interakcję z podjednostką C-końcową [38]. Kilka godzin po zakończeniu syntezy i wbudowaniu episjaliny do błony komórkowej, obecność O-glikozylowanej podjednostki episjaliny można wykazać w medium hodowlanym (Ryc. 3E). Nie zostało dotąd wyjaśnione, czy jest to skutkiem dysocjacji czy też kolejnej modyfikacji proteolitycznej produktu biosyntezy. Czas półtrwania glikozylowanej podjednostki w formie związanej z błoną komórkową wynosi 18-24 godziny. Sugeruje się, że proces odrywania się większej podjednostki od błony komórkowej może zachodzić również *in vivo* [42].

IV. Nadekspresja i patologiczne formy episjaliny

W badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych wykazano, że właściwości komórek transfekowanych cDNA episjaliny ulegają wyraźnej zmianie. Kilka linii komórek po transfekcji wykazywało, w porównaniu z komórkami w hodowli kontrolnej, obniżenie interakcji z podłożem i wzrost w formie zawiesziny [2, 42, 44]. Episjalina ulega podwyższonej ekspresji w komórkach transformowanych i uważa się, że wskutek nadekspresji genu MUC1 episjalina pojawia się na całej powierzchni błony komórkowej, także i w warstwie pomiędzy komórkami, zaburzając adhezję komórkową [2, 15, 44, 45]. Antyadhezyjne właściwości episjaliny nie mają związku ani z jej polimorficzną strukturą ani też z odpychającym działaniem ujemnie naładowanych reszt NANA. Decydujące znaczenie wydaje się mieć mechaniczne rozdzielanie warstw receptorowych sąsiadujących komórek. Przy szerokości tej warstwy rzędu 10 nm, wskutek pojawienia się episjaliny, komórki zostają oddzielone od siebie na odległość setek nanometrów (Ryc. 2). Potwier-

dzeniem tego może być fakt, że cząsteczki episjaliny w których liczba powtarzających się sekwencji uległa zredukowaniu i których długość jest mniejsza niż 90 nm, tracą swe anty-adhezyjne właściwości. Można sądzić, że pojawienie się episjaliny pomiędzy komórkami zmniejsza zależne od integryny i kadheryny E oddziaływania międzykomórkowe wskutek oddzielenia od siebie warstw receptorowych sąsiadujących komórek [42, 44]. Interesujące jest, że obecność episjaliny na powierzchni transformowanych komórek nie blokuje wiązania przeciwciał antyintegrynowych [44, 46], prawdopodobnie z powodu większej elastyczności ligandów nie związanych z błoną komórkową.

Innym skutkiem nadekspresji episjaliny na powierzchni transformowanych komórek jest obniżenie ich zdolności do koniugacji z cytotoksycznymi limfocytami. Wykazano na przykład, że liza przez limfocyty LAK transfekowanych komórek czerniaka A375 była znacznie wolniejsza niż liza rewertantów tych komórek lub docelowych dla limfocytów LAK komórek K-562 [47]. Ochronną rolę episjaliny przed immunodestrukcją komórek potwierdzają badania na myszkach, którym do żyły ogonowej wprowadzano episjalino-pozytywne komórki A375 lub ich rewertanty. Stwierdzono, że liczba guzków przerzutowych w płucach myszek po iniekcji tych pierwszych była znacznie większa. Mimo że w hodowli rewertantów którymi szczepiono myszki, komórki episjalino-pozytywne stanowiły tylko 1%, to w masie guzków przerzutowych ich odsetek wzrastał do 25%. Potwierdza to wysoki potencjał przerzutowy komórek pokrytych episjaliną [42].

V. Cechy antygenowe patologicznych form episjaliny

W stanach patologicznych u człowieka episjalina może ulegać nadekspresji w komórkach w których fizjologicznie występuje, co uwidacznia się w nasileniu reakcji histochemicznych tych komórek z monoklona-

inymi przeciwciałami [2] oraz pojawieniu się episjaliny w surowicy krwi [48, 49]. Badania episjaliny w surowicy krwi zostały zainicjowane przez Burchella [50] i Hilkensa [51]. W surowicy zdrowego człowieka antygen episjaliny jest także wykrywalny, szczególnie u kobiet w ciąży, u palaczy i osób starszych [52, 53]. Jak wykazano z użyciem monoclonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko rdzeniowi białkowemu episjaliny, ekspresja episjaliny w komórkach raka gruczołu piersiowego wzrasta około 10-krotnie [42].

Do uzyskiwania anty-episjalinowych przeciwciał monoclonalnych używa się nie glikozylowanego białka, pochodzącego z komórek transfekowanych cDNA episjaliny, stąd przeciwciała wykazują swoistość w stosunku do jej polipeptydowego rdzenia. Powtarzające się sekwencje aminokwasowe rdzenia mają silne właściwości antygenowe [54]. To że antygenowa determinanta episjaliny jest w cząsteczce powtarzana wielokrotnie, może mieć znaczenie zarówno w skuteczniejszej immunizacji jak też i w łatwiejszym wiązaniu przeciwciał. Zwiększona wykrywalność episjaliny w testach z przeciwciałami przeciwko domenom peptydowym może wynikać nie tylko z nadekspresji ale też z większej dostępności polipeptydowych epitopów wskutek niepełnej glikozylacji, co jest cechą charakterystyczną glikoprotein pochodzących ze zmutowanych tkanek [1, 55-57]. Dotychczas do stałej praktyki klinicznej wszedł tylko test CA 15-3 wprowadzony do diagnostyki raka gruczołu piersiowego przez Tobiasa [58].

W diagnostyce rzadziej są wykorzystywane właściwości antygenowe oligosacharydowej części episjaliny, z powodu jej wielkiej zmienności. Nie mniej w ostatnich latach pojawiły się nowe testy immunologiczne wykrywające ze zwiększoną czułością niektóre antygeny związane ze strukturami oligosacharydowymi [53]. W celach diagnostycznych do rozpoznawania patologicznych antygenów próbuje się również wykorzystywać przeciwciała i lektyny, rozpoznające produkty niekompletnej glikozylacji białkowego rdzenia episjaliny, jak antygeny Tn i sjalo-Tn [59]. Z transformacją nowotworową związane jest wyłęganie oligosacharydowych antygenów sialo-Lewis^a i sialo-Lewis^x [60]. Obecność sialo-Lewis^a w strukturze episjaliny jest wynikiem indukcji alfa-2,3-sjalotransferazy [61], wykazującej kilkakrotnie większą aktywność w komórkach transformowanych [62]. Antygen ten, fizjologicznie występujący w żółci i ślinie [63], pojawia się wraz z antygenem sialo-Lewis^x w surowicy chorych z rakiem trzustki i jelit [64, 65]. W raku okrężnicy, w ponad 90% przypadków, cząsteczki episjaliny mają wbudowany do struktur oligosacharydowych antygen sialo-Lewis^x, nie występujący w episjalinie ze zdrowych tkanek [66]. Antygen sialo-Lewis^x występuje także na powierzchni leukocytów i komórek HL-60, i jest ligandem dla śródbłonkowej selektyny E. Obecność znacznie większej liczby komórek sialo-Lewis^x — pozytywnych w guzach przerzutowych niż w guzie pier-

wotnym, wskazuje na możliwość pośredniczenia selektyny E w powstawaniu przerzutów [67, 68]. Wykazano bowiem, że oczyszczone preparaty episjaliny niosące antygeny sialo-Lewis^a i sialo-Lewis^x hamują adhezję komórek HL-60 -sialo-Lewis^x — pozytywnych do selektyny E [69].

Należy jednak zauważyć, że wystandaryzowanie testów służących do wykrywania antygenów występujących na cząsteczce episjaliny łączy się z poważnymi trudnościami. Jest to spowodowane zmienną liczbą epitopów wynikającą z heterogenności cząsteczki, a także maskowaniem epitopów przez obecne w surowicy własne przeciwciała. Szczególnym przykładem takiej sytuacji jest wrzodziejące zapalenie jelit, w którym wykrywa się znaczny poziom tych przeciwciał [70, 71]. Oprócz wykorzystywania episjaliny w diagnostyce, trwają badania nad zastosowaniem w leczeniu syntetycznych antygenów o strukturze episjaliny. Pewne nadzieje co do możliwości wykorzystania episjaliny do innego celu niż diagnostyka, można wiązać z doniesieniami o próbach użycia syntetycznych antygenów o strukturze episjaliny do immunizacji pacjentów chorych na chorobę nowotworową [72-74].

Artykuł otrzymano 19 listopada 1996 r.
Zaakceptowano do druku 25 lutego 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Zotter S, Hageman PC, Lossnitzer A, Mooi WJ, Hilgers J (1988) *Cancer Rev* 11-12: 55-101
2. Hilkens J, Ligtenberg MJL, Vos HL, Litvinov SV (1992) *TIBS* 17: 359-363
3. Lessuffleur T, Zweibaum A, Real FX (1994) *Crit Rev Oncol Hematol* 17: 153-180
4. Shimizu M, Yamauchi K, Miyauchi Y, Sakurai T, Tokugawa K, McIlhinney RAJ (1986) *Biochem J* 233: 725-730
5. Shimizu M, Yamauchi K (1982) *Biochem J* 91: 515-524
6. Sekine H, Ohno T, Kufe DW (1985) *J Immunol* 135: 3610-3615
7. Gendler SJ, Burchell JM, Duhing T, Lamport D, White R, Parker M, Taylor-Papadimitriou J (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6060-6064
8. Hanisch G, Uhlenbruck G, Dienst C, Stottrop M, Hippauf E (1985) *Eur J Biochem* 149: 323-330
9. Cawston TE, Anderson M, Cheeseman GC (1976) *Dairy Res* 43: 401-409
10. Snow LD, Colton DG, Carraway KL (1977) *Arch Biochem Biophys* 179: 690-697
11. Campana WM, Josephson VR, Patton S (1992) *Comp Biochem Physiol* 103B: 261-266
12. Johnson VG, Greenwalt DE, Madara PJ, Mather IH (1988) *Biochem J* 251: 507-514
13. Patton S, Gendler SJ, Spicer AP (1995) *Biochim Biophys Acta* 1241: 407-424
14. Burchell J, Durbin H, Taylor-Papadimitriou J (1983) *J Immunol* 131: 508-513
15. Hilkens J, Buijs F, Hilgers J, Hagemann Ph, Calafat J, Sonnenberg A, van der Valk M (1984) *Int J Cancer* 34: 197-206
16. Price MR, Edwards S, Owainati A, Bullock JE, Ferry B, Robins RA, Baldwin RW (1985) *Int J Cancer* 36: 567-574
17. Lan MS, Bast RC, Colnaghi MI, Knapp RC, Colcher D, Schlom J, Metzgar RS (1987) *Int J Cancer* 39: 68-72

18. Nguyen PL, Niehans GA, Cherwith DL, Kim YS, Ho SB (1996) *Tumor Biol* 17: 176-192
19. Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillet C, Taylor-Papadimitriou J (1989) *Int J Cancer* 43: 1072-1076
20. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhing T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani E-N, Wilson D (1990) *J Biol Chem* 265: 15286-15293
21. Lan MS, Batra SK, Qi W-N, Metzgar RS, Hollingsworth MA (1990) *J Biol Chem* 265: 15294-15299
22. Ligtenberg MJL, Vos HL, Gennissen AMC, Hilkens J (1990) *J Biol Chem* 265: 5573-5578
23. Wreschner DH, Hareuveni M, Tsarfaty I, Smorodinski N, Horev J, Zaretsky J, Kotkes P, Weiss M, Lathe R, Dion A, Keydar I (1990) *Eur J Biochem* 189: 463-473
24. Swallow DM, Gendler S, Griffiths B, Kearney A, Povey S, Sheer D, Palmer RW, Taylor-Papadimitriou J (1987) *Ann Hum Genet* 51: 289-294
25. Middleton-Price H, Gendler S, Malcolm S (1988) *Ann Hum Genet* 52: 273-278
26. Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhing T, Rothbard J, Burchell J (1988) *J Biol Chem* 263: 12820-12823
27. Swallow DM, Gendler S, Griffiths B, Corney G, Taylor-Papadimitriou J, Bramwell ME (1987) *Nature (Lond)* 328: 82-84
28. Swallow D, Gendler S, Griffiths B, Kearney A, Povey S, Sheer D, Palmer RW, Taylor-Papadimitriou J (1987) *Ann Hum Genet* 51: 289-294
29. Lancaster CA, Peat N, Duhing T, Wilson D, Taylor-Papadimitriou J, Gendler SJ (1990) *Biochem Biophys Res Comm* 173: 1019-1029
30. Price MR, Hudecz F, O'Sullivan C, Baldwin RW, Edwards PM, Tendler SJB (1990) *Mol Immunol* 27: 795-802
31. Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Boshel M, Gendler S, Duhing T (1989) *Int J Cancer* 44: 691-696
32. Price MR, Pugh JA, Hudecz F, Griffiths W, Jacobs E, Symonds IM, Clarke AC, Chan W, Baldwin RW (1990) *Br J Cancer* 61: 681-686
33. Price MR, Sekowski M, Tendler SJB (1991) *J Immunol Meth* 139: 83-90
34. Price MR, Clarke AJ, Robertson JFR, O'Sullivan C, Baldwin RW, Blamey RW (1990) *Cancer Immunol Immunother* 31: 269-272
35. Gindziński A, Zwierz K (1991) *Post Biochem* 37: 146-153
36. Gum JR (1995) *Biochem Soc Trans* 23: 795-799
37. Hilkens J, Buijs F (1988) *J Biol Chem* 263: 4215-4222
38. Ligtenberg MJL, Kruijshaar L, Buijs F, van Meijer M, Litvinov SV, Hilkens J (1992) *J Biol Chem* 267: 6171-6177
39. Linsley PS, Kallestad JC, Horn D (1988) *J Biol Chem* 263: 8390-8397
40. Abe M, Kufe D (1989) *Cancer Res* 49: 2834-2839
41. Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lamport TD, Kim YS (1989) *J Biol Chem* 264: 6480-6487
42. Hilkens J, Wesseling J, Vos HL, Storm J, Boer B, van der Valk SW, Maas MCE (1995) *Biochem Soc Trans* 23: 822-826
43. Jentoft N (1990) *Trends Biochem Sci* 15: 291-294
44. Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J (1996) *Molec Biol Cell* 7: 565-577
45. Ligtenberg MJL, Buijs F, Vos HL, Hilkens J (1992) *Cancer Res* 52: 2318-2324
46. Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J (1995) *J Cell Biol* 129: 255-265
47. Van de Viel-Van Kemenade E, Ligtenberg MJL, de Boer AJ, Buijs F, Vos HL, Melief CJM, Hilkens J, Figdor CG (1993) *J Immunol* 151: 767-776
48. Tondini C, Hayes DF, Gelnam R, Henderson IC, Kufe DW (1988) *Cancer Res* 48: 4107-4112
49. Hilkens J (1992) W: Sell S (red) *Serological Cancer Markers*, Humana Press, Totowa, NJ, str 260-281
50. Burchell J, Wang D, Taylor-Papadimitriou J (1984) *Int J Cancer* 34: 763-768
51. Hilkens J, Kroezen V, Bonfrer JM, De BJM, Bruning PF (1986) *Cancer Res* 46: 2582-2587
52. McGuckin MA, Ramm LE, Joy GJ, Devine PL, Ward BG (1993) *Clin Chim Acta* 214: 139-151
53. Layton GT, Golder J, Johnston S, McGuckin MA, Ward B, Lo T, Williams P, Bishop JF, Jeal P, Francis P, Xing P-X, McKenzie IFC (1991) *J Tumor Marker Oncol* 6: 1-8
54. Gendler SJ, Taylor-Papadimitriou J, Duhing T, Rothbard J, Burchell J (1988) *J Biol Chem* 263: 12820-12823
55. Hilkens J, Buijs F, Ligtenberg M (1989) *Cancer Res* 49: 786-793
56. Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Grilling A, Lewis A, Millis R, Lamport D (1987) *Cancer Res* 47: 5476-5482
57. Hull SR, Bright A, Garraway KL, Abe M, Hayes DF, Kufe DW (1989) *Cancer Commun* 1: 261-267
58. Tobias R, Rotwell C, Wagner J, Green A, Liu YS (1985) *Clin Chem* 31: 986
59. Lisowska E (1995) *Acta Biochim Polon* 42: 11-18
60. Ugorski M, Kłopotcki A G (1996) *Post Hig Med Dośw* 50: 209-231
61. Magnani JL, Nilsson B, Brockhaus M, Zopf D, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1982) *J Biol Chem* 257: 14365-14369
62. Brockhausen I, Yang Y-M, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J (1995) *Eur J Biochem* 233: 607-617
63. Zopf D, Hansson GC (1988) *Adv Exp Med Biol* 228: 657-676
64. Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1983) *Cancer Res* 43: 5489-5492
65. Kannagi R, Fukushi Y, Tashikawa T, Noda A, Shin S, Shigeta K, Hirauia N, Fukuda Y, Inamoto T, Hakomori S, Imura H (1986) *Cancer Res* 46: 2619-2626
66. Hanski C, Dreschler K, Hanisch F-G, Sheehan J, Manske M, Ogorek D, Klussmann E, Hanski M-L, Blank M, Xing P-X, McKenzie IFC, Devine PL, Riecken E-O (1993) *Cancer Res* 53: 4082-4088
67. Matsushita Y, Cleary KR, Ota DM, Hoff SD, Irimura T (1990) *Lab Invest* 63: 780-791
68. Matsusako T, Muramatsu H, Shirahama T, Ohi Y (1991) *Biochem Biophys Res Commun* 181: 1218-1222
69. Zhang K, Baeckstrom D, Brevinge H, Hansson GC (1996) *J Cell Biochem* 60: 538-549
70. Gourevitch MM, von Mensdorff-Pouilly S, Litvinov SV, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraeten AA, Hilgers J (1995) *Brit J Cancer* 72: 934-938
71. Hinoda Y, Nakagawa N, Nakamura H, Makiguchi Y, Itoh F, Adachi M, Yabana T, Imai K, Yachi A (1993) *Immunol Lett* 35: 163-168
72. Graham RA, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J (1996) *Cancer Immunol Immunother* 42: 71-80
73. MacLean GD, Reddish MA, Koganty RR, Longenecker BM (1996) *J Immunother* 19: 59-68
74. Agrawal B, Reddish MA, Longenecker BM (1996) *J Immunol* 157: 2089-2095

Prenumerata „Postępów Biochemii” w 1997 r.
Prenumerata dla instytucji — 60 zł
Indywidualna — 30 zł
50% zniżki dla członków PTBioch.

Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego

The influence of DNA damage on cell cycle regulation

PIOTR WIDŁAK*

Spis treści:

- I. Regulacja cyklu komórkowego
- II. Blokada w fazie G1 — decydująca rola białka p53
- III. Blokada cyklu komórkowego w fazie G2
- IV. Mechanizmy rozpoznawania uszkodzeń
- V. Cykl komórkowy a naprawa DNA
- VI. Apoptoza a uszkodzenia DNA
- VII. Uwagi końcowe

Wejście w cykl podziałowy komórek zawierających uszkodzony DNA wiąże się z niebezpieczeństwem wprowadzenia błędów do zapisu informacji genetycznej. Obecność uszkodzeń DNA (indukowanych na przykład przez fizyczne czy chemiczne genotoksyczne czynniki środowiskowe) może wywołać zablokowanie kompleksu replikacyjnego lub spowodować nieprawidłowe odczytanie informacji kodowanej przez uszkodzony fragment. Efektem uszkodzeń może więc być powstanie różnorodnych mutacji. W komórkach eukariotycznych odpowiedzią na uszkodzenie DNA jest zainicjowanie naprawy DNA i zablokowanie cyklu komórkowego do czasu, kiedy uszkodzenia zostaną usunięte z genomu, a w przypadku niemożliwości usunięcia uszkodzeń, skierowanie komórki na drogę apoptozy.

I. Regulacja cyklu komórkowego

Cykl życiowy komórki eukariotycznej został opisany w roku 1953 przez Howarda i Pelca [1] jako powtarzające się zjawisko mitozy i okresu międzymitotycznego (podzielonego na fazę G1, fazę S i fazę G2). Zdarzenia zachodzące w cyklu komórkowym zorganizowane są w taki sposób, że inicjacja każdego etapu możliwa jest po prawidłowym zakończeniu etapu poprzedzającego. Mechanizmy takiej regulacji zależne są od specyficznych genów i noszą nazwę punktów kontrolnych (ang.: *checkpoints*). Kontrola cyklu uniemożliwia podział niekompletnie powielonego materiału genetycznego, a także powielanie i podział materiału genetycznego zawierającego uszkodzenia [2, przeg. w: 3]. Procesy decydujące o wejściu komórki w fazę S mają miejsce w fazie G1 („punkt

Contents:

- I. Regulation of the cell cycle
- II. Cell cycle arrest in G1; involvement of p53
- III. Cell cycle arrest in G2
- IV. Mechanisms of damage recognition
- V. Cell cycle and DNA repair
- VI. DNA damage and apoptosis
- VII. Concluding remarks

kontrolny” G1/S), a procesy decydujące o wejściu komórki w fazę M mają miejsce w fazie G2 („punkt kontrolny” G2/M). W komórce funkcjonują również mechanizmy kontrolujące prawidłowość przebiegu fazy S i M. O rozpoczęciu kolejnej fazy cyklu komórkowego decydują zarówno czynniki endogenne jak i czynniki pochodzące spoza komórki (np. czynniki wzrostowe — mitogeny). Stwierdzono, że jednym z czynników mających decydujące znaczenie dla regulacji cyklu komórkowego jest aktywność kinaz białkowych zależnych od cyklin, CDK (ang.: *cyclin-dependent kinase*). W komórkach ssaków wykryto obecność kilku białek CDK (oznaczanych jako Cdk z kolejnym numerem). Białka CDK obecne są w jądrze w ciągu całego cyklu komórkowego, natomiast ich aktywność regulowana jest przez przyłączenie do podjednostki katalitycznej białkowego aktywatora — odpowiedniej cykliny. Cykliny są białkami, których synteza i poziom zależy od fazy cyklu komórkowego [przeg. w: 4].

W komórkach kręgowców o przejściu granicy G1/S decyduje aktywność kompleksów cykliny D/Cdk4 i cykliny E/Cdk2, oraz cykliny A/Cdk2. Wydaje się, że jednym z najważniejszych substratów dla kinaz CDK i efektem dla „zegara” cyklu komórkowego w fazie G1 jest białko pRB (kodowane przez gen zmutowany w komórkach siatkówczaka — retinoblastomy). Białko pRB tworzy kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym E2F — kompleks będący represorem transkrypcji genów zależnych od E2F. Fosforylacja białka pRB (i prawdopodobnie E2F) przez kompleks cykliny D/Cdk4 lub cykliny E/Cdk2 inicjuje rozpad kompleksu pRB/E2F i aktywację genów zależnych od czynnika E2F [przeg. w: 5]. Aktywacja kinaz CDK, obok wiązania odpowiedniej cykliny, następuje dzięki fosforylacji przez kompleks kinazy Cdk7 z cykliną H (CAK; ang.: *CDK activating kinase*). Aktywność kinaz Cdk4 i Cdk2 hamowana jest przez wiązanie białkowych inhibitorów — białek CDKI (ang.: *CDK inhibitor*). Należące do tej grupy białka p16^{INK4A}, p15^{INK4A}, p21^{CIP1}

* Dr: Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

oraz p15^{INK4B/MTS2} są prawdopodobnie kompetytorami cyklin D (a więc są inhibitorami specyficznymi dla kinaz zależnych od cykliny D). Dwa inne białka z grupy CDKI, p21^{WAF1/CIP1} oraz p27^{KIP1}, są inhibitorami mniej specyficznymi, hamującymi aktywność większości kompleksów cykliny/CDK [przeg. w: 6, 7].

Czynnikiem mającym decydujące znaczenie dla rozpoczęcia mitozy jest aktywność kompleksu MPF (ang.: *mitosis-promoting factor*). W komórkach ssaków MPF tworzony jest przez cyklinę B i kinazę Cdc2 (białko Cdc2 oznaczane jest również Cdk1). Aktywność MPF zależna jest od poziomu cykliny B oraz od fosforylacji i defosforylacji kinazy Cdc2 (w której, poza CAK, bierze udział kinaza Wee1 i fosfataza Cdc25) [przeg. w: 8]. Powyższy skrót jedynie sygnalizuje złożoność mechanizmów regulacji cyklu komórkowego. Pełny przegląd zagadnień dotyczących regulacji cyklu komórkowego można znaleźć w licznych pracach opublikowanych w ciągu ostatnich kilku lat [7-12].

II. Blokada w fazie G1 — decydująca rola białka p53

W ciągu ostatnich 3-4 lat opublikowano ogromną liczbę prac dotyczących mechanizmów zahamowania wzrostu komórek poddanych działaniu czynników uszkodzających DNA. Dane doświadczalne zgodnie wskazują, że dla zablokowania cyklu komórkowego w fazie G1 decydujące znaczenie ma aktywność białka p53, a dokładniej, indukowana czynnikami genotoksycznymi akumulacja prawidłowego (niezmutowanego) białka p53 w jądrze komórkowym [13-16]. Akumulacja białka p53 nie jest wynikiem transkrypcji genu *de novo*. Postuluje się, że nagromadzenie tego białka może być wynikiem między innymi: odmiennej obróbki transkryptów (alternatywny "splicing"), stabilizacji w wyniku obróbki potranslacyjnej (fosforylacja, oligomeryzacja, tworzenie kompleksów z innymi białkami), czy też redystrybucji w obrębie komórki [przeg. w: 17].

Przypuszcza się, że udział białka p53 w blokadzie cyklu komórkowego związany jest z jego oddziaływaniem w charakterze czynnika transkrypcyjnego z DNA. Do genów aktywowanych przez p53 należy WAF1/CIP1. Gen ten koduje białko p21, które jest inhibitorem kinaz cyklino-zależnych [18-20]. Białko p21 tworzy kompleksy również z białkiem PCNA, będącym podjednostką polimerazy δ DNA. Powstanie kompleksu p21/PCNA blokuje replikacyjną syntezę DNA, lecz nie blokuje syntezy reperacyjnej DNA [21, 22]. Tak więc, białko p21 może zablokować cykl komórkowy poprzez dwa niezależne mechanizmy, z których jeden (przynajmniej potencjalnie) umożliwia zablokowanie replikacji uszkodzonego DNA w komórkach, które już weszły w fazę S. Innym genem aktywowanym przez białko p53 jest GADD45 (ang. *growth arrest and DNA damage-inducible*). Białko Gadd45, podobnie jak p21, wiąże się z PCNA. Stwierdzono, że Gadd45 blokuje wejście komórek w fazę S i jednocześnie

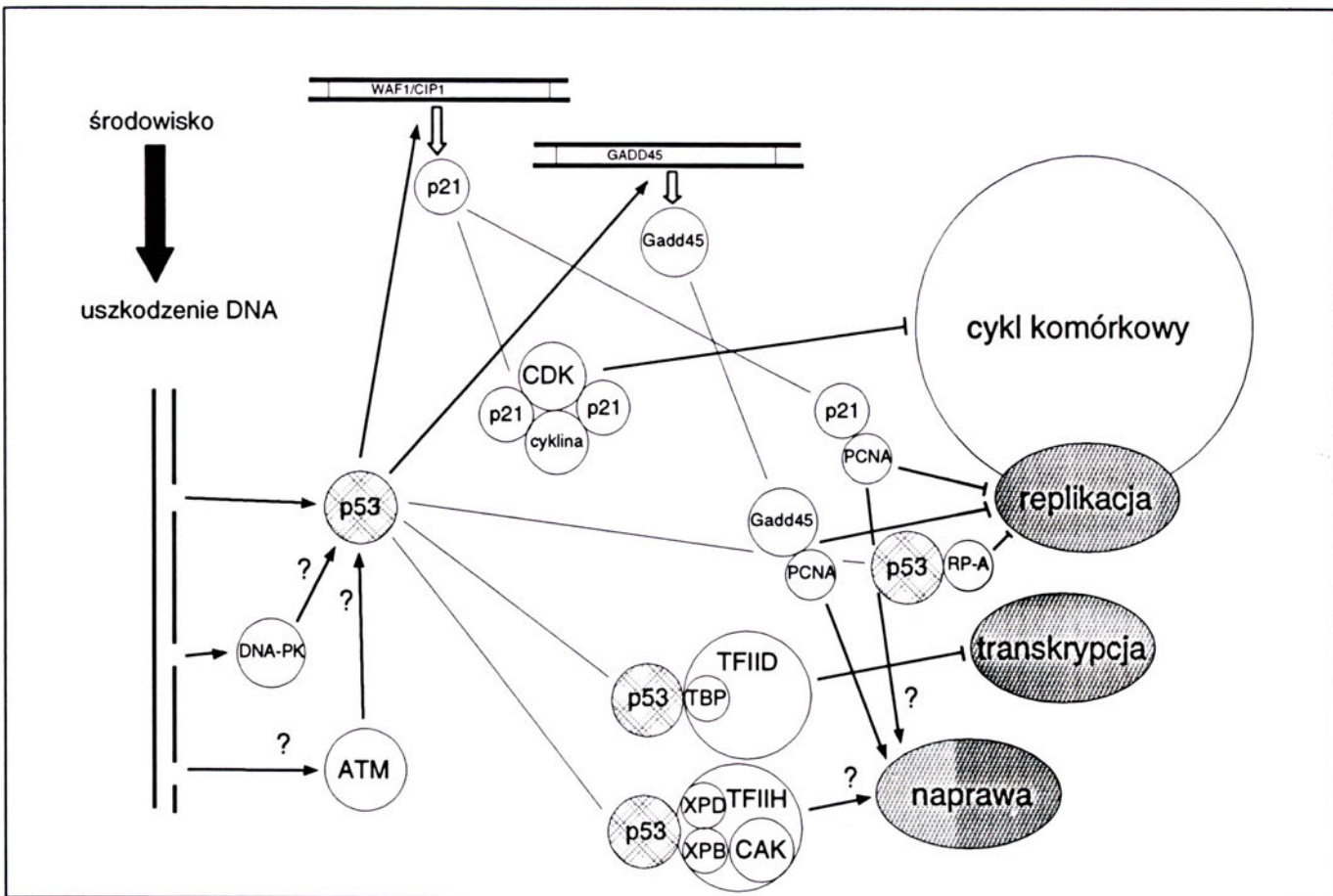
stymuluje szybkość naprawy DNA [23].

Udział białka p53 w regulacji cyklu może również wynikać ze zdolności do tworzenia kompleksów z innymi białkami. Białko p53 tworzy kompleks z białkiem TBP (ang. *TATA box-binding polypeptide*), będącym podjednostką generalnego czynnika transkrypcyjnego TFIID. Związanie p53 z TBP hamuje transkrypcję genów nie posiadających tzw. "p53-response element" (np. onkogeny *c-fos* i *c-jun*) [24, 25]. Tak więc p53 mogłoby oddziaływać na cykl komórkowy również działając jako represor transkrypcji genów niezbędnych do jego przebiegu. Białko p53 ma także zdolność wiązania się z białkami biorącymi udział w regulacji replikacji, na przykład z białkiem RP-A. Oddziaływanie p53 z białkiem RP-A uniemożliwia jego wiązanie z jednoniciowym DNA (co jest niezbędne do powstania kompleksu replikacyjnego) [26].

Wydaje się, iż białko p53 gra centralną rolę w przekazywaniu sygnału inicjującego zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, przynajmniej w komórkach z uszkodzonym DNA (schemat niektórych powiązań prawidłowego białka p53 przedstawiony jest na rycinie 1). Możliwe jest również, że niektóre typy uszkodzeń DNA inicjują zatrzymanie cyklu w fazie G1 niezależnie od p53 [27]. Co ciekawe, w komórkach drożdży gdzie wydajnie funkcjonuje punkt kontrolny G1/S, nie stwierdzono obecności białka p53 (ale ekspresja ludzkiego p53 w komórkach drożdży hamuje ich proliferację [28]). Niektóre dane sugerują, że białko p53 mogłoby brać udział w kontroli cyklu komórkowego w fazie G2 i M [29, 30]. Jest również prawdopodobne, że p53 (za pośrednictwem p21) bierze udział w regulacji następstwa faz S i M [31]. Szczegółowe dane na temat roli białka p53 w regulacji cyklu komórkowego można znaleźć w innych pracach przeglądowych [17, 32-34].

III. Blokada cyklu komórkowego w fazie G2

Powstanie hipotezy dotyczącej mechanizmów "cell cycle checkpoints" związane jest z odkryciem genu RAD9. Gen ten odpowiada za indukowaną promieniowaniem jonizującym blokadę cyklu komórkowego drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w fazie G2. Stwierdzono, że produkt genu RAD9 kontroluje rozpoczęcie fazy M w komórkach, w których nie zakończyła się prawidłowo synteza DNA. Sygnałem do blokady cyklu mogą być zaburzenia replikacji będące wynikiem uszkodzeń DNA oraz braku ligazy DNA [35, 2]. Sugeruje się, że białko Rad9 bierze udział w blokadzie cyklu również w fazie G1 [36]. Funkcja białka Rad9 zależna jest od produktów genów RAD17, RAD24, MEC1 i RAD53, jednak nie jest znany szczegółowy mechanizm działania wszystkich tych białek [przeg. w: 37]. Do tej pory nie jest również znany homolog białka Rad9 w komórkach kręgowców. Do genów zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego w fazie G2 u drożdży *Schizosaccharomyces pombe* należą między innymi *rad1* i *rad3* [przeg. w: 38]. Stwierdzono,



Ryc. 1. Schemat opisanych w tekście związków prawidłowego białka p53 z regulacją cyklu komórkowego (i innymi procesami metabolicznymi). Odpowiednimi symbolami zaznaczono: (→) — mechanizmy aktywacji, (—) — mechanizmy inaktywacji, (?) — mechanizmy potencjalne lub o niejasnym znaczeniu. Skrótów nazw tak jak w tekście.

że produkt genu *rad1* blokuje cykl komórkowy poprzez inaktywację mitotycznego kompleksu kinazy Cdc2, działając za pośrednictwem kinazy Weel i fosfatazy Cdc25 [39]. Również w komórkach ssaków inaktywacja kompleksu MPF poprzez deregulację fosforylacji kinazy Cdc2 jest jednym z mechanizmów blokady cyklu komórkowego w fazie G2 [40, 41]. Wydaje się, że ten mechanizm blokady cyklu komórkowego jest niezależny od białka p53 [42].

IV. Mechanizmy rozpoznawania uszkodzeń

Mechanizmy regulujące przebieg cyklu komórkowego w komórkach zawierających uszkodzony DNA można podzielić (przynajmniej formalnie) na trzy grupy: 1) rozpoznające uszkodzenie DNA; 2) przekazujące sygnał; 3) mające bezpośredni udział w regulacji cyklu (efektorowe). W tej chwili stosunkowo najmniej wiadomo o tym, jak rozpoznawane są uszkodzenia i jak przepływa sygnał inicjujący blokadę cyklu. Wydaje się, że uszkodzenia DNA mogą być rozpoznawane przez „czujniki” specyficzne dla cyklu komórkowego. Możliwe jest również, że sygnał inicjujący pochodzi spoza wąsko rozumianego układu regulacji cyklu; takim sygnałem mogłoby być zablokowanie transkrypcji (lub replikacji) wywołane obecnością uszkodzeń, czy też rozpoczęcie naprawy DNA. Na korzyść

tej hipotezy przemawia fakt, że uszkodzenia obecne w genach transkrybowanych stymulują akumulację białka p53 silniej niż uszkodzenia DNA nie transkrybowanego [43].

Większość danych o tym jak przebiega przekazanie sygnału dotyczy blokady cyklu komórkowego zależnej od białka p53. Wydaje się, że uniwersalnym (niezbędnym i wystarczającym) czynnikiem inicjującym akumulację białka p53 są pęknięcia nici DNA (ang.: *strand brake*). Akumulację białka p53, niezależną od replikacji i naprawy DNA, wywołują czynniki bezpośrednio powodujące pęknięcia DNA (promieniowanie jonizujące, inhibitory topoiizomerazy II, bleomycyna, a także nukleazy). Inne czynniki indukują akumulację p53 w sposób pośredni, zależny od replikacji i naprawy DNA (na przykład produkty naprawy uszkodzeń indukowanych przez UV). Dodatkowym powodem pęknięć DNA mogą być procesy przebiegające w jądrze naturalnie (np.: rekombinacja) [44]. Mechanizm detekcji uszkodzeń jest bardzo czuły, umożliwia reakcję na śladowe ilości czynników genotoksycznych (na przykład promieniowanie jonizujące w dawkach wywołujących jedno lub kilka uszkodzeń na komórkę [45]).

Zakłada się, że detektorami pęknięć nici DNA są enzymy, których aktywność zależna jest od tego typu struktur, i które mogłyby modyfikować białko p53. Jednym z enzymów aktywowanych przez pęknięcia

nici i wolne końce DNA jest polimeraza poliADP-rybozy (PARP). Stwierdzono jednak, że u zwierząt transgenicznym z wyłączonym genem PARP funkcjonuje indukowana czynnikami genotoksycznymi blokada cyklu komórkowego. Tak więc, aktywność tego białka prawdopodobnie nie jest związana z regulacją cyklu komórkowego [przeg. w: 46, 47]. Innym enzymem aktywowanym przez przerwane nici i wolne końce DNA jest kinaza białkowa zależna od DNA (DNA-PK), której jednym z substratów (przynajmniej *in vitro*) jest p53 [przeg. w: 48]. Obecnie wiadomo, że białko DNA-PK bierze udział w rekombinacji i naprawie pęknięć nici DNA. Nie ma natomiast bezpośrednich dowodów na jego związek z regulacją cyklu komórkowego [przeg. w: 47, 49]. Ostatnio wykryto liczne białka drożdży i kręgowców o dużej homologii do DNA-PK, co pozwoliło na identyfikację odrębnej rodziny białek. Wiele z nich związanych jest z regulacją cyklu komórkowego. Jednym z takich białek jest produkt genu ATM, zmutowanego w większości przypadków syndromu *ataxia telangiectasia*. Do tej pory (druga połowa roku 1996), nie jest jednak znany szczegółowy mechanizm działania białka ATM i innych białek należących do tej rodziny [przeg. w: 50, 51].

Białko p53 również wiąże się z DNA. Domena odpowiedzialna za wiązanie ze specyficznymi sekwencjami DNA zlokalizowana jest w centralnej części białka. Natomiast w części C-końcowej zlokalizowana jest domena odpowiedzialna za „niespecyficzne” wiązanie DNA [przeg. w: 52]. Wykazano, że C-końcowa domena p53 wiąże się preferencyjnie z jedno- i dwuniciowymi końcami DNA (również indukowanymi promieniowaniem jonizującym), oraz katalizuje renaturację DNA [53, 54]. Stwierdzono również, że C-końcowa domena p53 wiąże się specyficznie ze źle sparowanymi fragmentami DNA (błędy typu “*insertion/deletion mismatches*”) [55]. Dane te wskazują, że białko p53 mogłoby uczestniczyć w szlaku prowadzącym do blokady cyklu komórkowego nie tylko jako element przekazujący sygnał, ale również jako czynnik rozpoznający uszkodzenia DNA. Hipotezę tę potwierdza obserwacja, że wiązanie krótkich jednoniciowych fragmentów DNA przez C-końcową domenę p53 zwiększa wydajność wiązania centralnej domeny białka ze specyficznym “*p53-response element*” genu GADD45 [56].

V. Cykl komórkowy a naprawa DNA

Generalnie zakłada się, że odwracalne zablokowanie cyklu komórkowego ułatwia naprawę DNA poprzez wydłużenie czasu jaki komórki mają na usunięcie uszkodzeń (zanim nastąpi powielenie i podział materiału genetycznego). W związku z tym, blokadę cyklu komórkowego przedstawia się czasem jako integralny składnik mechanizmów naprawy DNA. Wiadomo, że procesy naprawy zahamowane są w trakcie mitozy. Jednak dane dotyczące wydajności naprawy w po-

szczególnych fazach cyklu komórkowego są jedynie fragmentaryczne. Stwierdzono, że po naświetleniu komórek promieniowaniem UV naprawa DNA aktywnego transkrypcyjnie przebiega na podobnym poziomie w trakcie faz S i G₂, natomiast szybkość naprawy DNA nieaktywnego wzrasta w trakcie fazy S [57]. Może to mieć związek z czasowym zanikiem struktury nukleosomowej w trakcie replikacji, i w konsekwencji ułatwionym dostępem kompleksu naprawczego do uszkodzeń. Wiadomo również, że preferencyjna naprawa nici transkrybowanej funkcjonuje podobnie w fazie G₁ i fazie G₂ [58].

Jest prawdopodobne, że mechanizmy regulujące przebieg cyklu komórkowego mogą bezpośrednio wpływać na przebieg naprawy DNA. Czynnikiem wiążącym mechanizmy regulacji cyklu komórkowego i naprawy DNA jest (jakże inaczej) białko p53. Stwierdzono, że w komórkach ze zmutowanym genem *p53* (na przykład pochodzących od pacjentów z syndromem Li-Fraumeni) upośledzona jest naprawa uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie UV (zależność dotyczy więc mechanizmu naprawy przez wycinanie — NER; ang. *nucleotide excision repair*) [59]. Zaobserwowano, że defekt nie dotyczy preferencyjnej naprawy nici transkrybowanej [60]. Możliwe jest, że białko p53 wpływa na NER poprzez bezpośrednie oddziaływanie z kompleksem naprawczym. Wynika to z faktu, że może ono tworzyć kompleksy z helikazami XPD, XPB i CSB biorącymi udział w naprawie DNA, oraz modulować ich aktywność [59, 61]. Helikazy XPB i XPD są składnikami czynnika transkrypcyjnego TFIIH, aktywnego zarówno w procesach transkrypcji, jak i naprawy DNA. Co ciekawe, składnikami kompleksu TFIIH są również cyklina H i Cdk7, białka tworzące CAK (przeg. w: 62). Defekty NER stwierdzono również w komórkach z nieaktywnym genem WAF1/CIP1 [63]. Jest więc możliwe, że p53 wpływa na naprawę DNA za pośrednictwem białka p21^{WAF1/CIP1} (oraz, o czym była mowa wcześniej, za pośrednictwem białka Gadd45 [23]).

Białko p53 wydaje się być związane również z innymi mechanizmami naprawy DNA. Stwierdzono, że p53 oddziałuje *in vivo* z białkiem Rad51, które jest jednym z białek katalizujących proces rekombinacji. Może to wskazywać na związek p53 z procesami rekombinacji oraz rekombinacyjnej naprawy dwuniciowych pęknięć DNA [64]. Stwierdzono również, że białko p53 wykazuje aktywność 3' → 5' egzonukleazy [65]. Otworzyło to pole do spekulacji na temat udziału p53 w procesie “*mismatch repair*” i w korekcyjnej aktywności polimeraz DNA.

VI. Apoptoza a uszkodzenia DNA

Wiele genotoksycznych czynników środowiskowych może — poza blokadą cyklu komórkowego — inicjować apoptozę, czyli zaprogramowaną śmierć komórki (CPD; ang.: *programmed cell death*) [przeg. w:

66, 67]. Obecność prawidłowego białka p53 jest, przynajmniej w większości typów komórek, niezbędna dla przebiegu apoptozy wywołanej czynnikami uszkadzającymi DNA [68, 69]. Tym niemniej, w niektórych komórkach (np. w stymulowanych do proliferacji limfocytach T) indukowane przez czynniki genotoksyczne blokady cyklu komórkowego lub apoptoza mogą przebiegać niezależnie od p53 [70]. Do tej pory nie są znane szczegóły mechanizmów regulujących apoptozę i rola jaką odgrywa w niej p53. Przypuszcza się, że p53 może działać jako aktywator genów stymulujących apoptozę (na przykład *bax* [71]), lub jako represor genów hamujących apoptozę (na przykład *bcl-2* [72]). Możliwe jest również, że p53 wpływa na apoptozę w sposób niezależny od transkrypcji [73]. Wydaje się, że apoptoza jest sposobem w jaki komórki odpowiadają na uszkodzenia DNA w sytuacji, kiedy niemożliwe jest zablokowanie cyklu komórkowego i efektywna naprawa DNA. Nie wiadomo jednak, czy i w jaki sposób, powiązane są funkcje białka p53 w blokadzie cyklu komórkowego i apoptozie. Jedną z hipotez zakłada, że w odpowiedzi na uszkodzenia DNA białko p53 uruchamiałoby mechanizmy prowadzące do blokady cyklu komórkowego, zaś jednocześnie obecność czynników wymuszających kontynuację cyklu (takich jak onkoproteiny czy brak białka pRB) prowadziłaby do apoptozy [74, 75]. Możliwe jest również, że związane z p53 mechanizmy apoptozy oraz blokady cyklu komórkowego funkcjonują niezależnie od siebie, a wybór jednej z dwu możliwości zależy od rodzaju komórki lub wpływu środowiska [33]. Na korzyść tego drugiego modelu przemawia to, że komórki z niektórymi mutacjami genu *p53* zachowują zdolność do blokady cyklu komórkowego, natomiast tracą zdolność do apoptozy [76].

VII. Uwagi końcowe

Dzielące się komórki eukariotyczne zawierające uszkodzony DNA realizują strategię polegającą na zablokowaniu cyklu komórkowego do czasu usunięcia uszkodzenia, lub uśmierceniu komórki jeśli nie da się zapobiec powieleniu i podziałowi uszkodzonego materiału genetycznego. Taka strategia umożliwia zachowanie integralności materiału genetycznego, pomimo powstających stale uszkodzeń DNA. Przebieg procesu nowotworzenia uzależniony jest od nagromadzenia się licznych niezależnych mutacji. Każda zmiana metabolizmu komórki zwiększająca tempo powstawania i nagromadzenia mutacji zwiększa więc prawdopodobieństwo powstania nowotworu. Dotyczy to również zaburzeń regulacji cyklu komórkowego, a szczególnie mechanizmów związanych z „punktami kontrolnymi”. Większość białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego (w tym białek CDK, CDKI i cyklin) kodowana jest przez geny wykazujące cechy onkogenów lub genów supresorowych nowotworów. Genem supresorowym jest również gen kodujący białko p53,

centralny element mechanizmów blokady cyklu komórkowego w obecności czynników uszkadzających DNA. Uszkodzenia genu *p53* stwierdzono w ponad połowie przypadków nowotworów u ludzi. Większość mutacji genu *p53* znosi funkcje białka związane z blokadą cyklu komórkowego i apoptozą. Prawdopodobnie ta cecha p53 sprawia, że utrata lub uszkodzenie genu *p53* jest czynnikiem silnie stymulującym proces nowotworzenia. Jednocześnie, wskazuje to na znaczenie jakie dla ochrony informacji genetycznej mają mechanizmy uniemożliwiające powielenie i podział uszkodzonego DNA. Przegląd współzależności pomiędzy regulacją cyklu komórkowego a procesami nowotworzenia można znaleźć między innymi w: [11, 77-79].

Artykuł otrzymano 10 czerwca 1996 r.
Zaakceptowano do druku 2 stycznia 1997 r.

Piśmiennictwo

- Howard A, Pelc SC (1953) *Heredity (Suppl)* 6: 261-273
- Hartwell LH, Weinert TA (1989) *Science* 246: 629-634
- Kaufmann WK, Paules RS (1996) *FASEB J* 10: 238-247
- Sherr CJ (1993) *Cell* 73: 1059-1065
- Weinberg RA (1995) *Cell* 81: 323-330
- Morgan DO (1995) *Nature (Lond)* 374: 131-134
- Sherr CJ (1994) *Cell* 79: 551-555
- King RW, Jackson PK, Kirschner MW (1994) *Cell* 79: 563-571
- Nurse P (1994) *Cell* 79: 547-550
- Heichman KA, Roberts JM (1994) *Cell* 79: 557-562
- Hunter T, Pines J (1994) *Cell* 79: 573-582
- Wójcik C (1993) *Post Biol Kom* 20: 331-352
- Maltzman W, Czyżyk L (1984) *Mol Cell Biol* 4: 1689-1694
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) *Cancer Res* 51: 6304-6311
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7491-7495
- Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ (1992) *Cell* 71: 587-597
- Cox LS, Lane DP (1995) *BioEssays* 17: 501-508
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) *Cell* 75: 817-825
- El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer E, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) *Cancer Res* 54: 1169-1174
- Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI (1994) *Cell* 76: 1013-1023
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994) *Nature (Lond)* 369: 574-578
- Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994) *Nature (Lond)* 371: 534-537
- Smith ML, Chen I-T, Zhan Q, Bae I, Chen C-Y, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ (1994) *Science* 266: 1376-1380
- Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine AJ, Shenk T (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12028-12032
- Liu X, Miller CW, Koeffler PH, Berk AJ (1993) *Mol Cell Biol* 13: 3291-3300
- Dutta A, Rupert JM, Aster JC, Winchester E (1993) *Nature (Lond)* 365: 79-82

27. Zhan Q, Carrier F, Fornace AJ (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 4242-4250
28. Nigro JM, Sikorski R, Reed SI, Vogelstein B (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 1357-1365
29. Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M (1995) *Oncogene* **10**: 109-115
30. Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind WH, Reid BJ (1995) *Science* **267**: 1353-1356
31. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1996) *Nature (Lond)* **381**: 713-716
32. Elledge RM, Lee WH (1995) *BioEssays* **17**: 923-930
33. Bates S, Vousden KH (1996) *Curr Opin Genet Dev* **6**: 12-19
34. Szumiel I (1996) *Post Biol Kom* **23**: 49-61
35. Weinert TA, Hartwell LH (1988) *Science* **241**: 317-322
36. Siede W, Friedberg AS, Friedberg EC (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7985-7989
37. Lydall D, Weinert T (1996) *Curr Opin Genet Dev* **6**: 4-11
38. Murray AW (1995) *Curr Opin Genet Dev* **5**: 5-11
39. Rowley R, Subramani S, Young PG (1992) *EMBO J* **11**: 1335-1342
40. Lock RB, Ross WE (1990) *Cancer Res* **50**: 3761-3766
41. O'Connor PM, Ferris DK, White GA, Pines J, Hunter T, Longo DL, Kohn KW (1992) *Cell Growth Differ* **3**: 43-52
42. Herzinger T, Funk JE, Hillmer E, Eick D, Wolf DA, Kind P (1995) *Oncogene* **11**: 2151-2156
43. Yamaizumi M, Sugano T (1994) *Oncogene* **9**: 2775-2784
44. Nelson WG, Kastan MB (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 1815-1823
45. DiLeonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994) *Genes Dev* **8**: 2540-2551
46. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 405-411
47. Jackson SP (1996) *Curr Opin Genet Dev* **6**: 19-25
48. Anderson CW (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 433-437
49. Jackson SP, Jeggo PA (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 412-415
50. Zakian VA (1995) *Cell* **82**: 685-687
51. Keith CT, Schreiber SL (1995) *Science* **270**: 50-51
52. Prives C (1994) *Cell* **78**: 543-546
53. Bakalkin G, Yakovleva T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekely L, Kiseleva E, Klein G, Terenius L, Wiman KG (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 413-417
54. Reed M, Woelker B, Wang P, Wang Y, Anderson ME, Tegtmeyer P (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9455-9459
55. Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J (1995) *Cell* **81**: 1013-1020
56. Jayaraman L, Prives C (1995) *Cell* **81**: 1021-1029
57. Russev G, Boulikas T (1992) *Eur J Biochem* **204**: 267-272
58. Petersen LN, Orren DK, Bohr VA (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 3731-3737
59. Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG, Bohr VA, Weeda G, Hoeijmakers JHJ, Forrester K, Harris CC (1995) *Nat Genet* **10**: 188-195
60. Ford JM, Hanawalt PC (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8876-8880
61. Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu J-R, Harris CC (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2230-2234
62. Nigg EA (1996) *Cur Opin Cell Biol* **8**: 312-317
63. McDonald ER, Wu GS, Waldman T, El-Deiry WS (1996) *Cancer Res* **56**: 2250-2255
64. Sturzbecher HW, Donzelmann B, Henning W, Knippschild U, Buchhop S (1996) *EMBO J* **15**: 1992-2002
65. Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Grosse F (1996) *Cell* **85**: 1089-1099
66. Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ, Wyllie AH (1995) *Sem Canc Biol* **6**: 3-16
67. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B (1995) *FASEB J* **9**: 1277-1287
68. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH (1993) *Nature (Lond)* **362**: 849-852
69. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993) *Cell* **74**: 957-967
70. Strasser A, Harris AW, Jacks T, Cory S (1994) *Cell* **79**: 329-339
71. Miyashita T, Reed JC (1995) *Cell* **80**: 293-299
72. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC (1994) *Cancer Res* **54**: 3131-3135
73. Caelles C, Helmbert A, Karin M (1994) *Nature (Lond)* **370**: 220-223
74. Fisher DE (1994) *Cell* **78**: 539-542
75. White E (1994) *Nature (Lond)* **371**: 21-22
76. Rowan S, Ludwig RL, Haupt Y, Bates S, Lu X, Oren M, Vousden KH (1996) *EMBO J* **15**: 827-838
77. Lane DP (1992) *Nature (Lond)* **358**: 15-16
78. Kamb A (1995) *Trends Genet* **11**: 136-140
79. Harper JW, Elledge SJ (1996) *Curr Opin Genet Dev* **6**: 56-64

Przypominamy o zmianie numeru konta prenumeraty **POSTĘPÓW BIOCHEMII**

Nowy numer: PBK XIII O/Warszawa, 370044-1225-2720-3-69

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

Od kwietnia br. w poniedziałki i czwartki odbywać się będą w godz. 14⁰⁰-16⁰⁰ w siedzibie Zarządu Głównego P.T.Bioch., pokój nr 632, dyżury naszej Redakcji, tel. 659-8571 w. 441.

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

System ubikwitynacji i jego rola u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

The ubiquitin conjugation system and its role in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

ANNA TOBIASZ¹,
TERESA ŻOŁĄDEK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Geny ubikwityny i ich ekspresja
- III. Sposoby wiązania ubikwityny z białkami
- IV. Enzymy systemu ubikwitynacji u drożdży
 - IV-1. Enzymy aktywujące — E1
 - IV-2. Enzymy koniugujące — E2
 - IV-3. Ligazy ubikwitynowo-białkowe — E3
- V. Degradacja białek i recykulacja ubikwityny
- VI. Rola modyfikacji białek ubikwityną
- VII. Uwagi końcowe

I. Wstęp

Ubikwityna, zbudowana z 76 aminokwasów białko, wchodzi w skład uniwersalnego systemu modyfikowania białek u eukariontów. System ten, zwany systemem ubikwitynacji składa się, oprócz ubikwityny, z układu enzymatycznego katalizującego proces przyłączenia jej do białek. Ubikwityna odgrywa podstawową rolę w proteolizie białek nieprawidłowych oraz białek regulacyjnych o krótkim okresie półtrwania. Zaangażowana jest także w regulację ekspresji genów, replikację DNA, transformację nowotworową, regulację cyklu komórkowego, wpływa na aktywność chromatyny, bierze także udział w powstawaniu rybosomów i peroksysomów [1-3]. Jednakże nie jest jasne czy we wszystkich tych procesach modyfikacja ubikwityną służy jako sygnał do degradacji czy też pełni inne funkcje nie związane bezpośrednio z proteolizą [4].

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są idealnym modelem w badaniach nad funkcją i mechanizmem ubikwitynacji, ze względu na łatwość stosowania metod genetyki klasycznej i molekularnej [5]. Wprawdzie są one organizmami jednokomórkowymi, ale pod względem złożoności budowy nie różnią się od komórek wyższych organizmów. Natomiast charakteryzuje je krótki czas generacji. Ponadto porównanie sekwencji aminokwasowej ubikwityny drożdży i człowieka wykazało identyczność 73 z 76 jej reszt aminokwasowych.

Contents:

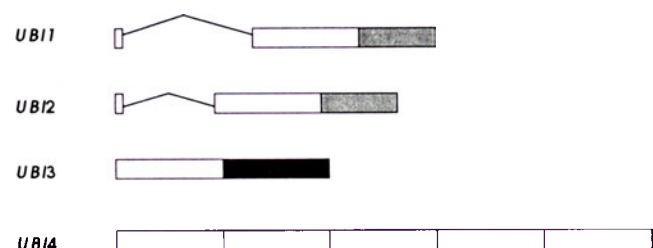
- I. Introduction
- II. Ubiquitin genes and their expression
- III. Types of ubiquitin-protein conjugates
- IV. Enzymes of ubiquitin-conjugation system of the yeast
 - IV-1. Ubiquitin-activating enzymes — E1
 - IV-2. Ubiquitin-conjugating enzymes — E2
 - IV-3. Ubiquitin-protein ligases — E3
- V. Protein degradation and ubiquitin recycling
- VI. Function of ubiquitin conjugation
- VII. Concluding remarks

Ubikwityna jest zatem najbardziej konserwatywnym z białek. Częsteczka ubikwityny ma globularną budowę, odporną na wysoką temperaturę, zmiany pH i zmiany polarności. Jej obecność, w formie wolnej lub związanej z białkami, stwierdzono w cytoplazmie, jądrze i na powierzchni komórki u wszystkich organizmów eukariotycznych [2].

W artykule przedstawiono informacje na temat mechanizmu degradacji białek przy udziale ubikwityny oraz procesów, w które zaangażowana jest ubikwitynacja. Bliższe informacje o cząsteczce ubikwityny są opublikowane w *Postęпах Biochemii* [6].

II. Geny ubikwityny i ich ekspresja

U drożdży istnieją cztery geny — *UBI*, kodujące ubikwitynę, wśród których wyróżnia się dwie ich



Ryc. 1. Organizacja genów kodujących ubikwitynę
Opis ryciny: białymi prostokątami oznaczono elementy kodujące ubikwitynę, czarnymi i szarymi prostokątami — elementy kodujące białka fuzyjne lub aminokwas ochronny. Geny *UBI1* i *UBI2* zawierają identycznie usytuowane introny, zaznaczone linią łamaną, wewnątrz elementów kodujących ubikwitynę.

¹ Mgr, ² dr Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

podstawowe klasy (Ryc. 1) [7]. Do pierwszej klasy zaliczono poligen — *UBI4*, w którym jednostka kodująca 76 aminokwasów ubikwityny powtarza się pięciokrotnie. Na końcu 3' genu znajduje się kodon aminokwasu, nie występującego w dojrzałej ubikwitynie. Zadaniem tego aminokwasu jest ochrona C-końca niedojrzałej ubikwityny przed koniugacją z białkiem. W procesie dojrzewania zostaje on odcięty. Na końcu 5' poligeny znajduje się nieulegająca transkrypcji sekwencja regulatorowa, odpowiedzialna za ekspresję w warunkach stresu termicznego.

Do drugiej klasy należą geny fuzyjne: *UBI1*, *UBI2*, *UBI3*, które składają się z pojedynczej sekwencji DNA kodującej ubikwitynę, przedłużonej na końcu 3' sekwencjami nukleotydowymi kodującymi białka rybosomalne. Zidentyfikowano dwa rodzaje białek rybosomalnych występujących w fuzji z ubikwityną [8]. Pierwsze — to białko o 52 aminokwasach, które w dojrzałej (pozbawionej ubikwityny) formie wchodzi do większej podjednostki rybosomu. Białko drugiego rodzaju ma długość 76 aminokwasów i jest elementem mniejszej podjednostki rybosomu.

Ekspresja genów obu klas jest w cyklu życiowym ściśle regulowana. W warunkach szybkiego wzrostu i podziałów komórkowych, a więc w okresach wzmożonej biosyntezy białka, indukowane są przede wszystkim geny kodujące ubikwitynę połączoną z białkami rybosomalnymi. W warunkach głodu, w szoku cieplnym i w okresach stacjonarnego wzrostu komórek w hodowli, ekspresji ulega głównie gen poliubikwitynowy [9].

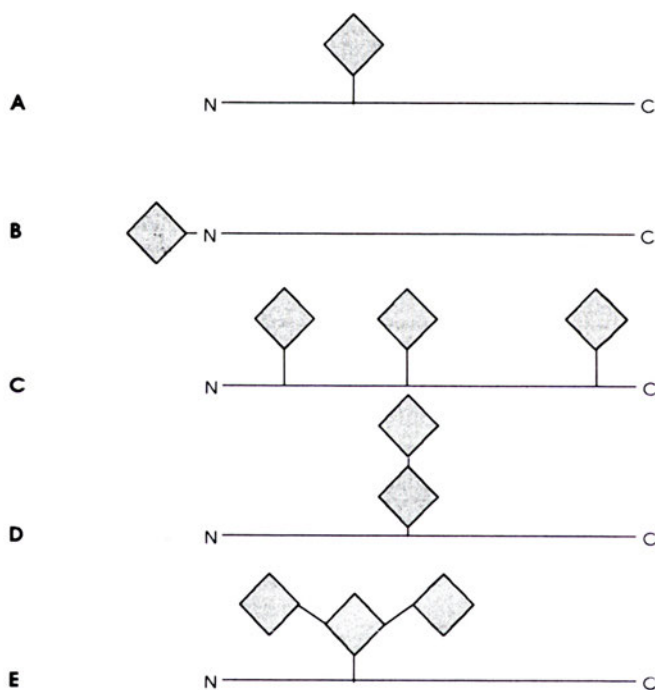
Nie stwierdzono obecności w komórkach poliubikwityny, to jest białka, w którym C-koniec jednego monomeru łączyłby się z N-końcem następnego. Najprawdopodobniej tworząca się poliubikwityna jest szybko, być może równocześnie z translacją, hydrolizowana do ubikwityny. Podobnie rzecz się ma z ubikwityną sprzężoną z genami kodującymi białka rybosomalne [9].

III. Sposoby wiązania ubikwityny z białkami

Centrum aktywne ubikwityny znajduje się na jej karboksylowym końcu. W procesie modyfikacji białek ubikwityną (patrz roz. IV) grupa karboksylowa glicyny z C-końca ubikwityny łączy się wiązaniem izopeptydowym z grupą ε-aminową lizyny koniugowanego białka. Obiektem modyfikacji może też być sama ubikwityna, która *in vivo* jest już połączona z białkiem. Głównym miejscem akceptorowym w cząsteczce ubikwityny jest jedna z siedmiu reszt lizynowych, Lys-48 [10]. Zaobserwowano jednak, że w sytuacjach gdy lizyna-48 jest związana lub zamieniona na inny aminokwas, reszty Lys-29 i Lys-63 też mogą tworzyć koniugaty. Takie wiązanie poprzez Lys-63 jest ważne w odpowiedzi komórki na stres [11] oraz w procesie naprawy DNA [12]. W ten sposób powstają struktury ubikwitynowe prostoliniowe i prawdopodobnie także

rozgałęzione, połączone z białkiem, które nazwano multiubikwityną.

Znanych jest wiele rozmaitych białek modyfikowanych jedną cząsteczką ubikwityny (Ryc. 2A). Rola monoubikwitynacji nie jest do końca jasna. Przyłączenie ubikwityny do N-końca białka rybosomalnego (Ryc. 2A), pełni rolę regulatorową — zwiększa wydajność wbudowywania białka rybosomalnego do podjednostki rybosomu [8]. Białka multiubikwitynowane możemy podzielić na kilka grup (Ryc. 2C, 2D, 2E). Niektóre histony i receptory w błonie komórkowej, nie podlegające proteolizie, zawierają kilka pojedynczo podstawionych cząsteczek ubikwityny (Ryc. 2C). Przyłączenie multiubikwitynowego łańcucha nierozgałęzionego do białka jest sygnałem do jego degradacji (Ryc. 2D). Multiubikwitynacja łańcuchami rozgałęzionymi (Ryc. 2E), z udziałem Lys-29 i Lys-63 prawdopodobnie występuje w odpowiedzi komórki na stres [11].



Ryc. 2. Sposoby wiązania się ubikwityny z białkiem.

Opis ryciny: linią prostą oznaczono cząsteczkę białka, z zaznaczeniem jego N- i C-końca, uczestniczącego w procesie ubikwitynacji, szarymi kwadratami cząsteczki ubikwityny. Dalszy opis w tekście.

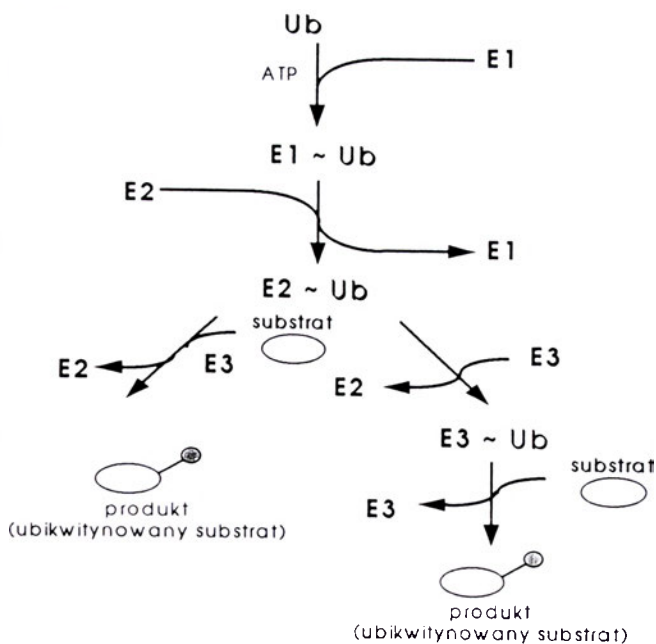
IV. Enzymy systemu ubikwitynacji u drożdży

Przyłączenie ubikwityny do białek przebiega wieloetapowo. Jest to kaskada transestryfikacji (Ryc. 3), w której powstają wysokoenergetyczne tioestry przy udziale cząsteczki cysteiny w centrum aktywnym enzymów i C-końcowej glicyny w cząsteczce ubikwityny [13]. Proces ligacji ubikwityny z białkiem katalizują trzy klasy enzymów:

E1 lub Uba — enzymy aktywujące (ang. *Ubiquitin-activating enzyme*)

E2 lub Ubc — enzymy koniugujące (ang. *Ubiquitin-conjugating enzyme*)

E3 lub Ubr — enzymy rozpoznające, ligazy ubi-



Ryc. 3. Przyłączenie ubikwiny do białka.

Opis ryciny: Ubikwina (Ub) jest aktywowana przy udziale enzymu aktywującego — E1 w obecności ATP. W wyniku tej reakcji powstaje tioester E1~Ub. Zaktywowana ubikwina jest przekazana z E1 na specyficzną grupę tiolową enzymu koniugującego — E2. Efektem tej reakcji jest powstanie następnego tioestru E2~Ub. E2 albo bezpośrednio przenosi ubikwinę na substrat, albo za pośrednictwem E3 — właściwej ligazy ubikwiny-białkowej. Enzym E3 tworzy kolejny tioester z ubikwiną. Substrat może być mono- lub multiubikwinywany.

kwitynowo-białkowe (ang. *Ubiquitin recognition, Ubiquitin-protein ligase*) [14].

Proces rozpoczyna połączenie ubikwiny z enzymem aktywującym — E1. Jest to reakcja dwuetapowa. Najpierw C-terminalna glicyna ubikwiny jest aktywowana przez ATP z utworzeniem adenylo-ubikwiny i uwolnieniem AMP a następnie przenoszona jest na grupę tiolową cysteiny w centrum aktywnym E1 z utworzeniem wiązania tioestrowego [1]. W procesie ubikwinytacji białka jest to jedyny etap, który wymaga energii.

Z E1 ubikwina zostaje przekazana na białko koniugujące — E2. E2 przenosi ubikwinę bezpośrednio na substrat, w obecności albo za pośrednictwem białka E3, ligazy ubikwiny-białkowej. Enzymy E2 i E3 występują w komórce jako rodziny białek i wydaje się, że różne kombinacje kompleksu E2-E3 determinują ich specyficzność substratową.

IV-1. Enzymy aktywujące — E1

Enzymy E1 odznaczają się dużym stopniem konserwatywności w obrębie miejsca aktywacji, w pobliżu cysteiny niezbędnej do tworzenia wiązania tioestrowego oraz w obrębie miejsca wiązania ATP [15, 16]. Enzymy E1 mogą tworzyć kompleks z E2. Dotychczas sklonowano u drożdży gen *UBA1* kodujący enzym E1 [15] oraz gen *UBA2* wysoce homologiczny do *UBA1*. Wprowadzie *UBA2* koduje białko zawierające sekwencję wiążącą ATP i posiadające konserwatywną cys-

teinę, która jest niezbędna do jego funkcjonowania to jednak dotychczas nie udało się wykazać dla niego aktywności E1 [16]. Geny *UBA1* i *UBA2* są niezbędne dla życia komórki. Białko Uba1 jest zlokalizowane w cytoplazmie i jądrze a białko Uba2 w jądrze. Uba2p nie komplementuje braku Uba1p w komórce, i odwrotnie, nawet gdy lokalizacja komórkowa tych białek zostanie zmieniona przez mutagenzę [16].

IV-2. Enzymy koniugujące — E2

U drożdży jest znanych 12 genów kodujących enzymy E2 (Tab. 1) [2, 3, dane nieopublikowane]. Porównanie sekwencji wszystkich znanych enzymów E2 wykazało istnienie konserwatywnej, centralnie położonej domeny (UBC), złożonej z ~150 aminokwasów, zawierającej resztę cysteinową w centrum aktywnym, niezbędną do wytworzenia wiązania tioestrowego z ubikwiną. Zgodność sekwencji różnych E2 osiąga w tym rejonie co najmniej 35% [2]. Enzymy E2 można podzielić na trzy klasy: jedne zbudowane są prawie wyłącznie z domeny UBC, inne przedłużone są na końcu karboksylowym lub aminowym domeny centralnej dodatkowymi odcinkami łańcucha białkowego [2]. Rola tych końcowych odcinków polega na interakcji enzymu E2 z E3, rozpoznawaniu substratu białkowego bez udziału E3 [17] oraz na lokalizacji enzymów E2 w różnych kompartmentach komórki [18]. Wydaje się, że regulacja aktywności enzymów E2 oraz ich interakcja z białkami jest kontrolowana przez odwracalną fosforylację [19].

Enzymy E2 determinują specyficzność substratową ubikwinytacji. Mutacje w różnych genach kodujących E2 powodują różne fenotypy mutantów. Cztery enzymy E2 (*Ubc4*, *Ubc5*, *Ubc6*, *Ubc7*) biorą udział w degradacji czynnika transkrypcyjnego *MATα2* drożdży [20], a niektóre z nich biorą także udział w innych procesach. Różne E2 mogą tworzyć heterooligomeryczne kompleksy co prowadzi do zmiany ich specyficzności [20]. Dalsze rozszerzenie specyficzności zachodzi przypuszczalnie na skutek interakcji z E3 [3].

IV-3. Ligazy ubikwiny-białkowe — E3

U drożdży pierwszym poznany genem kodującym ligazę ubikwiny-białkową jest *UBR1* (Tab. 1) [21]. Białko *Ubr1* ma zdolność rozpoznawania aminokwasu na N-końcu substratu i tworzenia połączonego z substratem łańcucha multiubikwinykowego. Badania nad β-galaktocydazą, w której N-końcową metioninę zastąpiono innymi aminokwasami wykazały, że rodzaj aminokwasu N-końcowego decyduje o długości okresu półtrwania białka w komórce. Prawidłowość tę nazwano zasadą N-końca (ang. *N-end rule*) [22]. Mutanty, w których brak jest genu *UBR1* rosną normalnie ale nie degradują syntetycznych substratów podlegających zasadzie N-końca [21] oraz nie są zdolne do importu dwu- i trójpeptydów [23]. *Ubr1p*

Tabela 1.

Komponenty systemu ubikwinyowego u drożdży

Enzymy	Geny	Funkcja i regulacja
E1	<i>UBA1</i>	— aktywacja C-końcowej reszty ubikwiny — gen niezbędny do życia komórki
	<i>UBA2</i>	— gen niezbędny do życia komórki — przypuszczalnie pełni funkcję E1 lub E2
E2	<i>UBC1</i>	— uczestniczy w regulacji cyklu życiowego komórki wraz z <i>UBC4</i> i <i>UBC5</i> , szczególnie w sporulacji i rozwoju — indukuje fazę G_0
	<i>UBC2/RAD6</i>	— uczestniczy w reperacji DNA, indukowany przez mutagenезę — wiąże się z histonami przez kwaśny koniec — niezbędny w sporulacji — represja retrotranspozonów — uczestniczy wraz z <i>UBR1</i> w degradacji białek podlegających zasadzie N-końca (ang. <i>N-end rule pathway</i>) — indukowany przez czynniki uszkadzające DNA
	<i>UBC3/CDC34</i>	— niezbędny w regulacji cyklu komórkowego $G_1 \rightarrow S$, replikacji DNA, kształtowaniu wrzeciona podziałowego — współdziała z <i>CDC4</i> i <i>CDC53</i>
	<i>UBC4</i> <i>UBC5</i>	— degradacja białek o krótkim okresie życia i białek nieprawidłowych — uczestniczy w cyklu życiowym komórki wraz z <i>UBC1</i> — niezbędny w warunkach stresu (termicznego, obecności kadmu, analogów aminokwasowych) — degradacja fuzji ubikwiny- β -galaktozydaza — niezbędny w sporulacji — degradacja $MAT\alpha 2$, receptora Ste2 — supresor wielokopijny mutacji sekrecyjnej <i>sec61</i> — indukowany w warunkach stresu termicznego i obecności kadmu — gen zawiera introny
	<i>UBC6</i>	— białko wchodzące w skład błony retikulum endoplazmatycznego — degradacja $MAT\alpha 2$ i białka błony retikulum endoplazmatycznego Sec61 — supresor wielokopijny mutacji sekrecyjnej <i>sec61</i>
	<i>UBC7</i>	— powoduje oporność na kadm — degradacja $MAT\alpha 2$ i białka błony retikulum endoplazmatycznego Sec61 — indukowany w obecności kadmu
	<i>UBC8</i>	— gen zawiera introny
	<i>UBC9</i>	— niezbędny w regulacji cyklu komórkowego $G_2 \rightarrow M$ — degradacja cyklin CLB2, CLB5 — gen zawiera introny
	<i>UBC10/PAS2</i>	— biogeneza peroksyosomów
	E3	<i>UBR1</i>
<i>RSP5</i>		— uczestniczy w degradacji permeaz (Gap1p, Fur4p) — wpływ na lokalizację komórkową Mod5p-I
enzym deubikwinyujący	<i>DOA4</i>	— recyrkulacja ubikwiny — reperacja DNA — kontrola wzrostu komórki

kontroluje aktywność plazmatycznego transportera peptydów Ptr2p, przypuszczalnie między innymi poprzez kierowanie go do degradacji [24]. Jedynym znanym fizjologicznym substratem u drożdży, którego degradacja zależy od Ubr1 jest podjednostka α białka G kodowana przez *GPA1* [25]. Działanie Ubr1 wymaga obecności Ubc2, Ubr1 współdziała również i fizycznie łączy się z enzymami zmieniającymi N-koniec białek: N-terminalną amidazą kodowaną przez *NTA1* i transferazą Arg-tRNA-białkową kodowaną przez *ATE1* [24].

Genem kodującym ligazę ubikwitynowo-białkową jest również *RSP5* [26]. Białko Rsp5 jest wysoce homologiczne do ludzkiej ligazy ubikwitynowo-białkowej E6-AP, niezbędnej do degradacji białka p53. Homologia występuje w C-końcu, w obrębie domeny wielkości ~ 350 aminokwasów, która jest odpowiedzialna za aktywność enzymatyczną. W domenie tej znajduje się cysteina, niezbędna do tworzenia wiązania tioestrowego z ubikwityną [26]. Białko Rsp5 efektywnie oddziałuje z enzymem UbcH5, który jest ludzkim homologiem drożdżowego Ubc4, a słabo z innymi badaniami E2 [27]. Rsp5p występuje w komórce zasocjowane z innymi białkami (jednym z nich jest Bul1) tworząc duże kompleksy [28].

Ligaza ubikwitynowo-białkowa Rsp5 jest niezbędna do ubikwitynacji, inaktywacji, endocytozy i degradacji permeazy aminokwasowej Gap1p oraz permeazy uracylowej Fur4p [29, 30]. Permeazy te, odmiennie od większości ubikwitynowanych białek degradowanych przez proteasom 26S, są degradowane przez proteazy wakuolarne (patrz poniżej). Białko Rsp5 jest również niezbędne do prawidłowej cytoplazmatyczno-mitochondrialnej lokalizacji Mod5p-I, enzymu modyfikującego tRNA [31]. W mutantach *mdp1/rsp5* pula mitochondrialna Mod5p-I jest zmniejszona przy wyższym poziomie całkowitym [32], co potwierdza wniosek z badań *in vitro* nad mitochondriami szczura [33, 34], że ubikwitynacja ma wpływ na import białek do mitochondriów. Interesujące jest, że Rsp5p jest również aktywatorem transkrypcji a funkcja ta nie zależy od zdolności wiązania ubikwityny przez cysteinę [35].

V. Degradacja białek i recykulacja ubikwityny

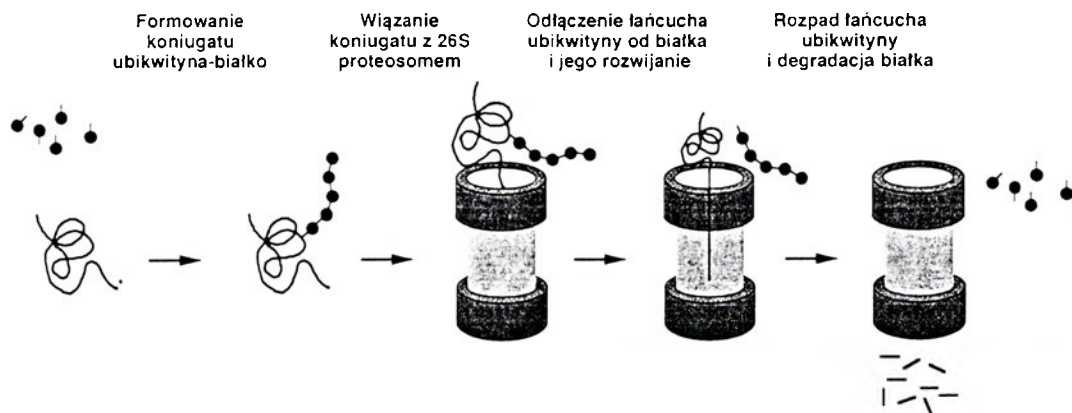
Ubikwitynowane białka mogą wejść na jeden z kilku szlaków metabolicznych. Częstocząsteczki ubikwityny mogą być usunięte z koniugatu przez hydrolazy C-końca ubikwityny zwane też proteazami ubikwityno-specyficznymi (Ubp, ang. *ubiquitin-specific processing protease*). Jeżeli ubikwityna nie zostanie usunięta białka mogą zostać zdegradowane przy udziale proteasomu 26S lub trwale pozostać w komórce. Ubikwitynowane białka błony plazmatycznej mogą ulec endocytozie i zostać skierowane do wakuoli (odpowiednik lizosomów u wyższych eukariontów) gdzie są degradowane przez proteazy wakuolarne.

Nadal nie jest jasne, co decyduje o losie ubikwitynowanego białka. Postulowano, że białko zawierające jedną lub kilka pojedynczo ubikwitynowanych reszt lizynowych, takie jak histony, kalmomodulina i niektóre receptory w błonie komórkowej, są trwałe i nie podlegają proteolizie [2]. Degradacji ulegają natomiast białka podstawione prostym lub rozgałęzionym łańcuchem cząsteczek multiubikwityny. Coraz częściej podkreśla się, że decydująca o losach koniugatu jest konformacja łańcucha multiubikwityny. Poza tym sama sekwencja aminokwasowa i konformacja substratu białkowego decyduje o budowie koniugatu i jego dalszych losach [36]. Na przykład, w N-końcu łańcucha polipeptydowego cyklin mitotycznych B, wykazano obecność fragmentu destrukcyjnego (ang. *destruction box*), niezbędnego do proteolitycznej degradacji cyklin, przy udziale systemu ubikwitynacji [37, 38]. Permeaza uracylowa także zawiera sekwencję podobną do fragmentu destrukcyjnego. Mutacja w jego obrębie powoduje odporność na degradację w warunkach stresu [39]. Inne cykliny: CLN1, CLN2, CLN3, akumulujące się pod koniec fazy G1, zawierają sekwencję PEST (bogata w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę) [40], obecną również w innych szybko degradowanych białkach, np. czynnika transkrypcyjnym Gcn4 [41]. Usunięcie jej powoduje stabilizację białek, brak degradacji i ich akumulację.

Proces ubikwitynacji białek jest procesem bardzo precyzyjnym. Bezpośrednio przed ubikwitynacją może zajść fosforylacja cząsteczki białka katalizowana przez kinazy białkowe, co stwierdzono dla receptora Ste2p u drożdży [42] oraz białek z komórek ludzkich [43]. Fosforylacja może wpływać na przyłączenie ubikwityny, poprzez zmianę konformacji białek np. przez odsłonięcie domen rozpoznawanych przez właściwe enzymy katalizujące proces ubikwitynacji.

W przemiany jakim może podlegać koniugat ubikwitynowo-białkowy zaangażowane są też hydrolazy C-końca (Ubp). U drożdży znane są trzy Ub-specyficzne proteazy Ubp1-Ubp3 [44] oraz znaleziono dalszych kilkanaście genów, które przypuszczalnie kodują białka o tej funkcji [3]. Usuwanie ubikwityny z koniugatu zmienia prawdopodobieństwo rozpoznawania go przez proteasom 26S. Przypuszcza się, że szybkość degradacji specyficznych białek może być ściśle regulowana przez enzymy usuwające ubikwitynę [3].

Koniugaty, które weszły na szlak prowadzący do degradacji, ulegają proteolizie przy udziale zależnego od ATP kompleksu proteazowego, proteasomu 26S. To wielkie białko zbudowane jest z trzech zasocjowanych czynników: dwóch o stałej sedymentacji 19S (u wyższych eukariontów CF-1 i CF2) i jednego o stałej sedymentacji 20S (u wyższych eukariontów CF-3) [45, 46]. Do degradacji białka związanego z ubikwityną konieczna jest asocjacja wszystkich trzech czynników. Hydroliza ATP towarzyszy dwóm odrębnym reakcjom: połączeniu się składników kompleksu proteazowego w formę aktywną i samej proteolizie. Na szcze-



Ryc. 4. Hipotetyczny mechanizm degradacji białka przy udziale proteasomu.

Opis ryciny: Proces degradacji białka przy udziale proteasomu rozpoczyna się od formowania koniugatu ubikwityny (oznaczono czarnymi kulkami) z białkiem. Następnie, zmodyfikowane ubikwityną białko wiąże się z 26S proteosomem (rdzeń katalityczny 20S oznaczono jasnoszarym cylindrem, czynniki o stałej sedymentacji 19S na końcach katalitycznego rdzenia 20S oznaczono ciemnoszarymi cylindrami). Po związaniu się koniugatu z proteosomem następuje odłączenie łańcucha ubikwityny, rozwinięcie białka i jego wejście do rdzenia katalitycznego, gdzie następuje degradacja białka. (wg [48] za pozwoleniem *Cell Press*)

gólną uwagę zasługuje kompleks białkowy o stałej sedymentacji 20S stanowiący rdzeń katalityczny kompleksu, nazwanym w literaturze proteasomem 20S [47]. Jego obecność stwierdzono w jądrze i cytoplazmie. Jest to cylindryczna cząsteczka zbudowana z 4 współosiowych pierścieni, z których każdy składa się z 7 podjednostek białkowych [48]. Na obu końcach rdzenia katalicznego znajdują się czynniki o stałej sedymentacji 19S. Każdy z nich składa się co najmniej z 15 podjednostek [45]. Większość genów kodujących podjednostki proteasomu *S. cerevisiae* jest zidentyfikowana i większość jest niezbędna do życia komórki [2, 45, 49]. Hipotetyczny mechanizm degradacji białka przy udziale proteasomu przedstawiono na rycinie 4.

Składnikiem systemu ubikwitynowego jest także enzym deubikwitynujący, u drożdży Doa4p, który jest związany z proteasomem 26S [50]. Jego rolą jest odcinanie od degradowanego białka cząsteczek ubikwityny, która ponownie służy do ubikwitynacji innych białek. Delecja genu *DOA4* powoduje zahamowanie proteolizy niektórych substratów podlegających ubikwitynacji (np. MAT α 2) i akumulację multiubikwitynowanych białek. Tak więc Doa4p wraz z hydrolazami C-końca odgrywa rolę w recyrkulacji ubikwityny.

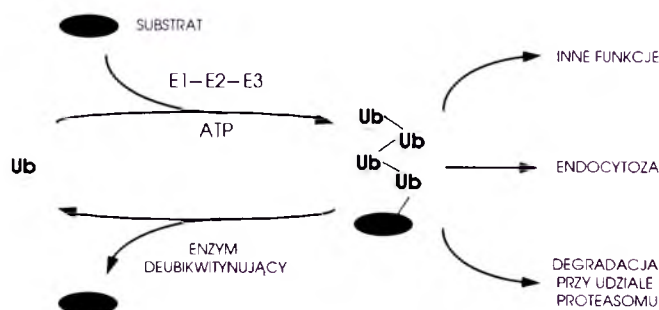
Ostatnie badania nad białkami błony plazmatycznej u drożdży wskazują na nową rolę jaką może pełnić modyfikacja ubikwityną. Związanie czynnika α do jego receptora, białka Ste2, stymuluje endocytozę kompleksu receptor-ligand co kieruje go do wakuoli, gdzie ulega degradacji. Równocześnie stymulowana jest ubikwitynacja końca cytoplazmatycznego Ste2p. Ubikwitynacja ta jest niezbędna do zajścia endocytozy kompleksu [42]. Ubikwitynacja służy więc jako sygnał do endocytozy i degradacji białka w wakuoli. Podobną rolę odgrywa ubikwitynacja transportera aminokwasów Gap1 [29], permeazy uracylu [30], transportera Pdr5 [51] i transportera Ste6 [52]. Badania na innych organizmach dostarczają dowodów, że modyfikacja ubikwityną może pełnić jeszcze inne funkcje, takie jak

regulacja aktywności enzymu [53], czy translokacja białka z cytoplazmy do błony [54].

VI. Rola modyfikacji białek ubikwityną

Enzymy uczestniczące w modyfikowaniu białek ubikwityną, kodujące je geny oraz ich funkcje przedstawiono w tabeli 1 [2, 4, 11, 16, 18, 29, 31, 37, 52, 55-57]. Rolę procesu ubikwitynacji przedstawiono na rycinie 5. Podsumowując zauważyć można, że ubikwitynacja białek towarzyszy wielu procesom metabolicznym.

1. Kieruje białka o krótkim czasie życia oraz białka nieprawidłowe do degradacji przez proteasom 26S.
2. Modyfikacja ubikwityną niektórych białek błonowych jest sygnałem do ich endocytozy i kierowania do wakuolarnego systemu degradacji [42, 51].
3. Bierze udział w tworzeniu organelli komórkowych oraz wpływa na lokalizację komórkową białek, poprzez udział w transporcie przez błonę peroksysomalną [56], błonę retikulum endoplazmatycznego [18]



Ryc. 5. Rola procesu ubikwitynacji białka.

Opis ryciny: Substrat białkowy jest modyfikowany ubikwityną (Ub) przy udziale enzymów: E1, E2, E3 (patrz Ryc. 3). Substrat może być monoubikwitynowany lub multiubikwitynowany. Ubikwityna jest odcinana od substratu przy udziale enzymu deubikwitynującego. Modyfikacja białek ubikwityną jest sygnałem do degradacji przy udziale proteasomu, albo sygnałem do endocytozy, albo odgrywa inną funkcję metaboliczną. (wg [36] za pozwoleniem *Cell Press*)

oraz w imporcie białek do mitochondriów [31, 33, 34].
 4. Ubikwitynacja jest zaangażowana w reperację DNA [12], w procesy uruchamiane w czasie stresu [11], w oporności na różne związki chemiczne, transkrypcję, kontrolę cyklu komórkowego a u ssaków także transformację nowotworową, spermatogenezę i infekcje wirusowe.
 5. Rola monoubikwitynacji białek, takich jak np. histony czy receptory błonowe jest nieznaną.

VII. Uwagi końcowe

Modyfikacja białek ubikwityną, odgrywa kluczową rolę w procesach regulacyjnych komórki. Mimo znacznego postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w zrozumieniu roli ubikwitynacji białek, nadal jej funkcja biologiczna jest znana tylko fragmentarycznie. Najlepiej poznanym procesem, w którym uczestniczy ubikwityna jest proces degradacji białek. Jednak przytoczone przykłady uzmysławiają ogromną złożoność procesów, towarzyszących degradacji białek. Ważną staje się odpowiedź na pytanie, co decyduje o wejściu ubikwitynowanego białka na określony szlak metaboliczny. Czy ubikwityna, która jest zaangażowana w tak wiele procesów, odgrywa w nich tylko rolę degradacyjną, czy też regulacyjną? Ostatnie badania wskazują, że rola degradacyjna ubikwityny jest tylko jedną z wielu możliwych ról jaką pełni to białko.

Praca autorów jest wspierana przez Komitet Badań Naukowych — grant nr 6PO4A 026028.

Artykuł otrzymano 18 grudnia 1996 r.
 Zaakceptowano do druku 14 lutego 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Finley D (1992 W: Jones EW, Pringle JR, Broach JR (red) The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, str. 539-581
2. Jentsch S (1992) *Annu Rev Genet* **26**: 179-207
3. Hochstrasser M (1995) *Curr Opin Cell Biol* **7**: 215-223
4. Ciechanover A (1994) *Cell* **79**: 13-21
5. Rytka J, Palamarczyk G (1993) *Post Biochem* **39**: 152-155
6. Piotrowska U (1993) *Post Biochem* **39**: 8-16
7. Özkaynak E, Finley D, Solomon MJ, Varshavsky A (1987) *EMBO J* **6**: 1429-1439
8. Finley D, Bartel B, Varshavsky A (1989) *Nature (Lond)* **338**: 394-401
9. Monia BP, Ecker DJ, Crooke ST (1990) *Bio/technology* **8**: 209-215
10. Chen Z, Pickart CM (1990) *J Biol Chem* **265**: 21835-21842
11. Arnason T, Ellison MJ (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7876-7883
12. Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 1265-1273
13. Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) *Nature (Lond)* **373**: 81-83
14. Hershko A (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 265-268
15. McGrath JP, Jentsch S, Varshavsky A (1991) *EMBO J* **10**: 227-236
16. Dohmen RJ, Stappen R, McGrath JP, Forrova H,

- Kolarov J, Goffeau A, Varshavsky A (1995) *J Biol Chem* **270**: 18099-18109
17. Gosink MM, Vierstra RD (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9117-9121
18. Sommer T, Jentsch S (1993) *Nature (Lond)* **365**: 176-179
19. Goebel MG, Goetsch L, Byers B (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 3022-3029
20. Chen P, Jonson P, Sommer T, Jentsch S, Hochstrasser M (1993) *Cell* **74**: 357-369
21. Bartel B, Wunning I, Varshavsky A (1990) *EMBO J* **9**: 3179-3189
22. Varshavsky A (1992) *Cell* **69**: 725-735
23. Alagramam K, Naider F, Becker JM (1995) *Mol Microbiol* **15**: 225-234
24. Varshavsky A (1995) W: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, t. LX, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str. 461-478
25. Madura K, Varshavsky A (1994) *Science* **265**: 1454-1458
26. Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2563-2567
27. Nuber U, Schwarz S, Kaiser P, Schneider R, Scheffner M (1996) *J Biol Chem* **271**: 2795-2800
28. Yashiroda H, Oguchi T, Yasuda Y, Toh-e A, Kikuchi Y (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 3255-3263
29. Hein C, Springael J-Y, Volland C, Haguenaer-Tsapis R, André B (1995) *Mol Microbiol* **18**: 77-87
30. Galan JM, Moreau V, André B, Volland C, Haguenaer-Tsapis R (1996) *J Biol Chem* **271**: 10946-10952
31. Żołądek T, Tobiasz A, Vaduva G, Boguta M, Martin NC, Hopper AK (1997) *Genetics* **145**: 595-603
32. Żołądek T, Vaduva G, Hunter LA, Boguta M, Go BD, Martin NC, Hopper AK (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 6884-6894
33. Zhaung Z, McCauley R (1989) *J Biol Chem* **264**: 14594-14596
34. Zhaung Z, Marks B, McCauley R (1989) *J Biol Chem* **267**: 591-596
35. Imhof MO, McDonnell DP (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 2594-2605
36. Hochstrasser M (1996) *Cell* **84**: 813-815
37. Schwob E, Nasmyth K (1993) *Genes Develop* **7**: 1160-1175
38. Grzelakowska-Sztabert B (1993) *Post Biochem* **39**: 16-25
39. Galan JM, Volland C, Urban-Grimal D, Haguenaer-Tsapis R (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **201**: 769-775
40. Barral Y, Jentsch S, Mann C (1995) *Genes Develop* **9**: 399-409
41. Kornitzer D, Raboy B, Kulka RG, Fink GR (1994) *EMBO J* **13**: 6021-6030
42. Hicke L, Riezman H (1996) *Cell* **84**: 277-287
43. DiDonato J, Mercurio F, Karin M (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 1302-1311
44. Baker RT, Tobias JW, Varshavsky A (1992) *J Biol Chem* **267**: 23364-23375
45. Fischer M, Hilt W, Richter-Ruoff B, Gonen H, Ciechanover A, Wolf DH (1994) *FEBS Lett* **355**: 69-75
46. Wójcik C (1995) *Post Biol Kom* **22**: 295-315
47. Eytan E, Ganoth D, Armon T, Hershko A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7751-7755
48. Jentsch S, Schlenker S (1995) *Cell* **82**: 881-884
49. De Marini DJ, Papa FR, Swaminathan S, Ursic D, Rasmussen TP, Culbertson MR, Hochstrasser M (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 6311-6321
50. Papa FR, Hochstrasser M (1993) *Nature (Lond)* **366**: 313-319
51. Egner R, Kuchler K (1996) *FEBS Lett* **378**: 177-181
52. Kölling R, Hollenberg CP (1994) *EMBO J* **13**: 3261-3271
53. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T (1996) *Cell* **84**: 833-862
54. Wang Y, Yeung YG, Langdon WY, Stanley ER (1996) *J Biol Chem* **271**: 17-20
55. Seufert W, Futscher G, Jentsch S (1995) *Nature (Lond)* **373**: 78-81
56. Wiebel FF, Kunau WH (1992) *Nature (Lond)* **359**: 73-76
57. Biederer T, Volkwein C, Sommer T (1996) *EMBO J* **15**: 2069-2076

Koordinacja syntezy nici prowadzącej i opóźnionej DNA w widełkach replikacyjnych

Coordination of the leading and lagging DNA strand synthesis

IWONA J. FIJAŁKOWSKA¹,
PIOTR JONCZYK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Polimerazy prokariotyczne
 - II-1. Budowa holoenzymu polimerazy III DNA
 - II-2. Koordinacja replikacji nici prowadzącej i opóźnionej
- III. Porównanie holoenzymu polimerazy III DNA z innymi replikazami
- IV. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: PCNA — jądrowy antygen proliferujących komórek; Pol III — Polimeraza III DNA; RF-C — czynnik replikacyjny C; SSB — białka wiążące się do jednoniciowego DNA.

I. Wstęp

Podstawowe mechanizmy replikacji DNA, podobnie jak inne mechanizmy syntezy makrocząsteczek są wysoce konserwowane wśród organizmów żywych. Dotyczy to reakcji chemicznych i kierunku syntezy DNA, udziału primerów RNA, mechanizmu nieciągłej replikacji DNA na nici opóźnionej przy użyciu fragmentów Okazaki [1]. Replikacja chromosomalnego DNA rozpoczyna się w ściśle określonym miejscu, zwanym miejscem startu (ang. *origin of replication*). Molekularne mechanizmy inicjacji replikacji DNA w bakteriach *E. coli* były tematem niedawno opublikowanego w *Postęпах Biochemii* artykułu przeglądowego [2]. W miejscu startu syntezy DNA, rozdzielające się łańcuchy rodzicielskiego DNA tworzą widełki replikacyjne. Dwie nici rodzicielskie zorientowane są w przeciwnych kierunkach. Przeciwna orientacja nici DNA w duplesie powoduje różny mechanizm syntezy obu nici potomnych. Wszystkie znane replikazy DNA wymagają do rozpoczęcia polimeryzacji wolnego końca 3'-OH. Synteza DNA obu nici przebiega tylko w kierunku 5'→3'. Powoduje to, że jedna z nici potomnych jest kopiowana w sposób ciągły, zgodnie z ruchem widełek, natomiast druga jest syntetyzowana w kierunku przeciwnym do ruchu

Contents:

- I. Introduction
- II. The prokaryotic polymerases
 - II-1. The structure of DNA polymerase III holoenzyme
 - II-2. Coordination of leading and lagging strand synthesis
- III. Comparison of DNA polymerase III holoenzyme to other replicases
- IV. Conclusions

widełek, w postaci krótkich fragmentów (tzw. fragmenty Okazaki) łączonych następnie w jedną, ciągłą nić. Nić potomna syntetyzowana w sposób ciągły, zgodnie z ruchem widełek nosi nazwę nici prowadzącej (ang. *leading strand*), a nić syntetyzowana w sposób nieciągły — nici opóźnionej (ang. *lagging strand*) [1] (Ryc. 1). Tematem tego artykułu jest przedstawienie mechanizmów umożliwiających równoczesną syntezę obu nici DNA w widełkach replikacyjnych.

Dane genetyczne, biochemiczne, krystalograficzne oraz analiza komputerowa sekwencji aminokwasowej polimeraz prokariotycznych i eukariotycznych wskazują, że większość polimeraz posiada charakterystyczne, wysoce konserwowane motywy tworzące centra aktywne polimeraz [3]. Badania te wykazały podobny plan budowy polimeraz, opisywany jako zgodny z regułą „prawej ręki” [4]. Replikazy często zbudowane są z wielu podjednostek i oddziałują podczas syntezy nici potomnej z wieloma białkami [1].

Najlepiej poznanymi genetycznie i biochemicznie replikazami są: polimeraza III DNA z *Escherichia coli* oraz polimeraza faga T4. Holoenzym polimerazy III z *Escherichia coli* służy jako prototyp kompleksu replikacyjnego biorącego udział w syntezie DNA. Stanowi on znakomity obiekt badań, pozwalający na zrozumienie zasad replikacji również w innych organizmach.

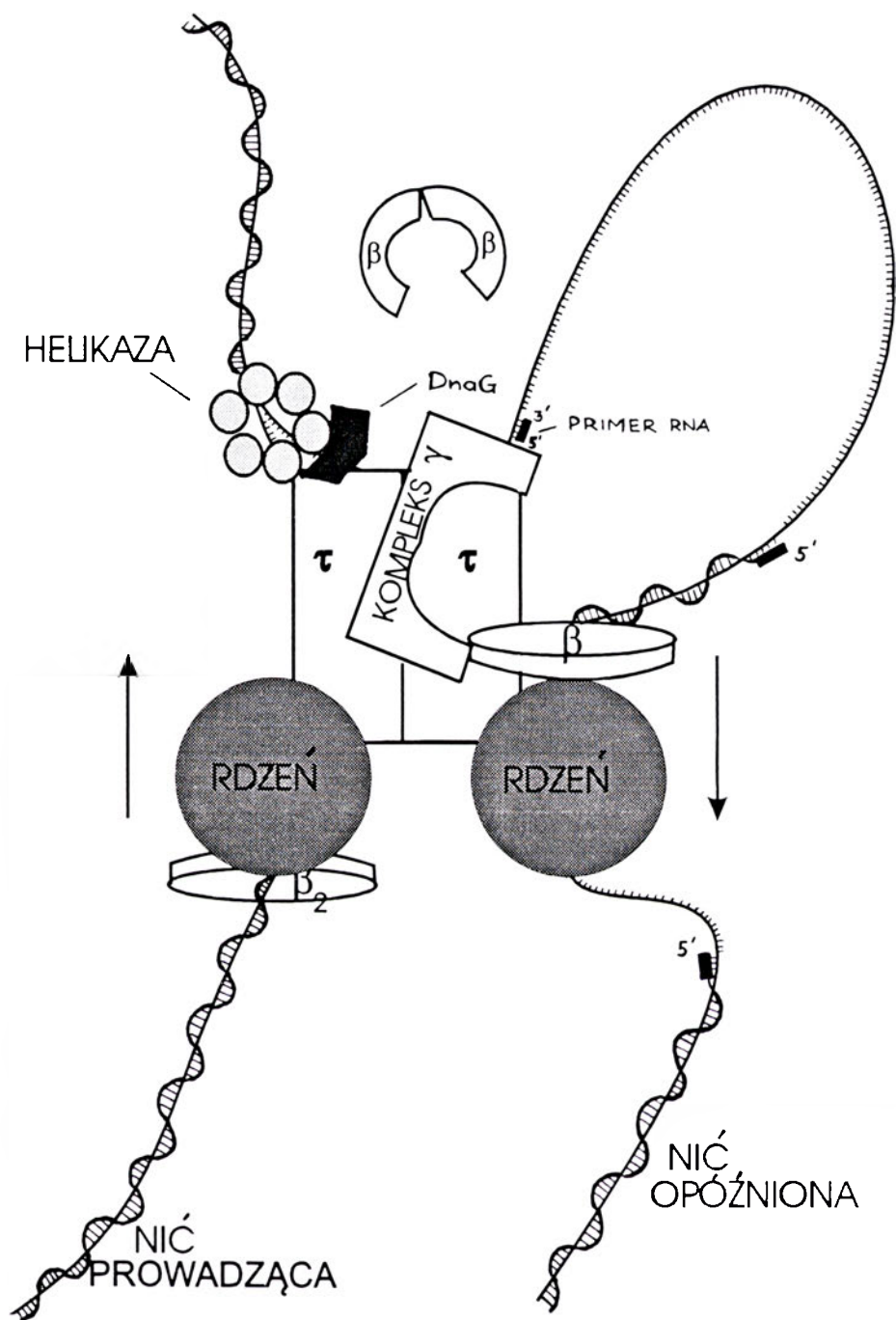
II. Polimerazy prokariotyczne

II-1. Budowa holoenzymu polimerazy III DNA

W komórkach *Escherichia coli*, holoenzym polimerazy III DNA jest głównym enzymem odpowiadza-

¹ Dr, ² dr, Pracownia Mutagenyzy i Reperacji DNA, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Ryc. 1. Schemat budowy widełek replikacyjnych w komórce *E. coli*. Strzałkami oznaczono kierunek syntezy DNA na nici prowadzącej i opóźnionej.



inym za syntezę potomnego DNA. [1]. Uważa się że holoenzym polimerazy III DNA składa się co najmniej z 10 podjednostek [5, 6]. Badania biochemiczne i fizykochemiczne wskazują na dimeryczną, asymetryczną budowę polimerazy (Ryc. 2). Również wielkość holoenzymu (1MDa) i dane stechiometryczne wskazują na tworzenie asymetrycznego dimeru: $(\alpha\epsilon\theta)_2\tau_2\gamma_2\delta\delta'\chi\psi(\beta_2)_2$ [7, 8]. Dimeryczna budowa holoenzymu umożliwia zsynchronizowaną replikację nici prowadzącej i opóźnionej [1, 9].

Rola poszczególnych podjednostek w procesie replikacji jest wciąż tematem badań. Poznane są geny kodujące poszczególne podjednostki (Tab. 1). Na przykład podjednostka α , kodowana przez gen *dnaE*, zawiera aktywność polimerazy DNA [10], a podjednostka ϵ , kodowana przez gen *dnaQ* (inna nazwa *mutD*), jest 3' → 5' egzonukleazą i odpowiedzialna jest

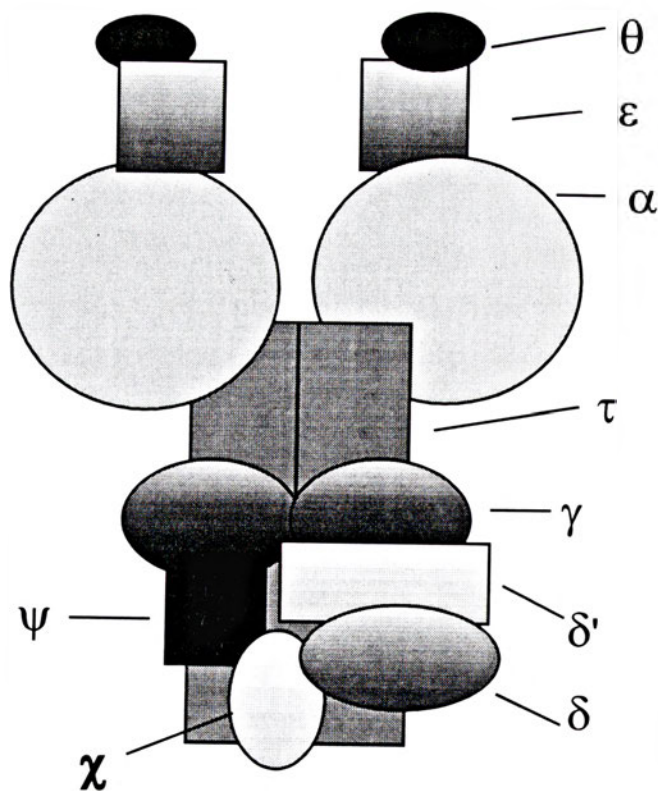
za funkcję korektorską (ang. *proofreading*). Egzonukleaza 3' → 5' usuwa z końca 3'OH włączone w trakcie syntezy DNA nieprawidłowe zasady [11, 12]. Białka kodowane przez poszczególne geny zostały oczyszczone i podjęte zostały próby rekonstrukcji holoenzymu polimerazy III DNA *in vitro*. Holoenzym polimerazy III DNA w zależności od składu podjednostkowego można podzielić na kilka strukturalnych form. Rdzeń polimerazy zbudowany jest z 3 podjednostek, które są połączone ze sobą liniowo α - ϵ - θ [13]. Dwa rdzenie połączone są dimerem τ tworząc Pol III' [14]. Taka struktura umożliwia zsynchronizowaną replikację obu nici DNA (prowadzącej i opóźnionej) [9]. Pol III* zawiera Pol III' (rdzeń z τ) i kompleks γ [5], do pełnego holoenzymu brakuje jedynie podjednostki β [15] (Tab. 1). Podjednostka β , zwana „ślizgającą się klamrą” (ang. *sliding clamp*) formuje pier-

ścię otaczający DNA, przez co umożliwia efektywniejsze przyłączenie holoenzymu do DNA. Powoduje to znaczne zwiększenie procesywności polimerazy [16]. Procesywność polimerazy określa ilość nukleotydów replikowanych podczas jednokrotnego przyłączenia się polimerazy do matrycy DNA. Procesywność samego rdzenia polimerazy III DNA wynosi jedynie 10-15 nukleotydów, natomiast procesywność całego holoenzymu Pol III określa się na kilkaset tysięcy nukleotydów [1]. Kompleks γ [5, 6], składa się z 5 różnych podjednostek ($\gamma_2\delta\delta'\chi\psi$) [17, 18]. Umożliwia on w obecności ATP, ulokowanie pierścienia β w miejscu startu nowego fragmentu Okazaki.

II-2. Koordynacja replikacji nici prowadzącej i opóźnionej

W widelkach replikacyjnych *E. coli* duplex DNA jest progresywnie rozwijany przez helikazę DNA (białko DnaB) [1]. Helikaza DnaB jest heksamerem zbudowanym z sześciu identycznych podjednostek. *In vitro*, wolna helikaza odwija DNA z szybkością 35 nukleotydów na sekundę. Wiadomo natomiast, że szybkość syntezy DNA w widelkach replikacyjnych wynosi około 1000 nukleotydów na sekundę. Musi więc istnieć mechanizm koordynujący szybkość odwijania DNA z szybkością replikacji. Ostatnio wykazano, że istnieje interakcja pomiędzy podjednostką τ holoenzymu polimerazy III DNA, a białkiem DnaB [19]. Interakcja τ -DnaB powoduje prawdopodobnie zmianę konformacji DnaB, co zwiększa ponad 10-krotnie szybkość odwijania DNA przez DnaB [20]. Podjednostka τ jest odpowiedzialna za połączenie obu rdzeni wchodzących w skład holoenzymu polimerazy III DNA. Dzięki temu następuje połączenie polimerazy syntetyzującej DNA na nici prowadzącej z polimerazą nici opóźnionej [14, 21, 22].

Budowa widełek replikacyjnych i stały kierunek 5' → 3' replikacji wymusza dwa różne mechanizmy replikacji nici prowadzącej i nici opóźnionej (Ryc. 1). Ponieważ polimeryzacja nici prowadzącej zachodzi zgodnie z kierunkiem przesuwania się widełek re-



Ryc. 2. Schemat asymetrycznej budowy dimeru holoenzymu polimerazy III DNA *E. coli*.

plikacyjnych, konieczny jest tylko jeden startujący primer RNA, który podlega ciągłej elongacji przez polimerazę III DNA. Na nici opóźnionej syntetyzowanych jest wiele primerów zapoczątkujących syntezę fragmentów Okazaki. Krótkie primery RNA (10-14 zasad) syntetyzowane są przez primazę (białko DnaG) [1]. Długość fragmentów Okazaki zależy od częstości powstania primerów RNA. Natomiast częstość powstawania primerów zależy od interakcji pomiędzy primazą DnaG i helikazą DnaB [23]. Tak więc, helikaza jest białkiem oddziałującym zarówno z primazą jak i z podjednostką τ holoenzymu. Znaczenie tej interakcji DnaB- τ prawdopodobnie polega na przekazywaniu informacji polimerazie nici opóźnionej, że primer został zsyntetyzowany i można rozpoczynać syntezę nowego fragmentu Okazaki. Model taki po-

Tabela 1.

Podjednostki holoenzymu polimerazy III DNA

Podjednostka	Kodujący gen	Funkcja	
α	<i>dnaE</i>	polimeraza DNA	$(\alpha + \epsilon + \theta)$ rdzeń polimerazy
ϵ	<i>dnaQ(mutD)</i>	3'—5' egzonukleaza funkcja edytorska	
θ	<i>holE</i>	funkcja nieznaną	
τ	<i>dnaX</i>	łączy dwie cząsteczki rdzenia dimeryzacja holoenzymu, oddziałuje z helikazą, osłania połączenie α z β w trakcie polimeryzacji	kompleks γ ($\gamma + \delta + \delta' + \chi + \psi$)
γ	<i>dnaX</i>	wiązanie ATP, łączy się z τ	
δ	<i>holA</i>	łączy się z β	
δ'	<i>holB</i>	stymuluje umiejscowienie β na końcu primera	
χ	<i>holC</i>	łączy się z SSB	
ψ	<i>holD</i>	łączy χ z γ	
β	<i>dnaN</i>	zwiększa procesywność polimerazy oddziałuje z α i kompleksem γ , przyłącza się do 3'OH końca primera	pierścień β

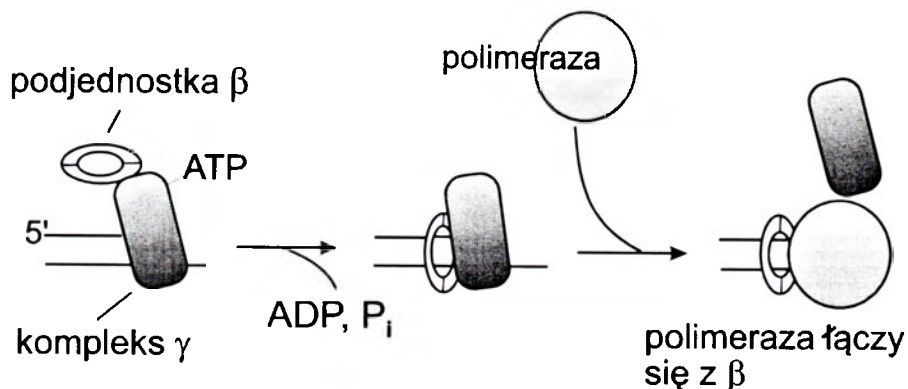
twierdząc wyniki z pracowni O'Donnella [19], wskazujące na interakcję pomiędzy DnaB a podjednostką τ wchodzącą w kontakt z częścią holoenzymu polimerazy III DNA syntetyzującą nic opóźnioną.

Replikacja nici ciągłej następuje z wysoką procesywnością [21]. Wysoka procesywność jest spowodowana oddziaływaniem rdzenia polimerazy ze „ślizgającą się klamrą” (zbudowaną z dwóch podjednostek β), utrzymującą polimerazę na matrycy DNA. Replikacja w *Escherichia coli* przeprowadzona jest z szybkością ~ 1000 zasad na sekundę [24]. Replikacja nici opóźnionej zachodzi w kierunku przeciwnym do kierunku przesuwania się widełek replikacyjnych, dlatego też, synteza nici opóźnionej wymaga ciągłych dysocjacji i reasocjacji polimerazy. Chromosom *E. coli* zawiera 4,4 miliony par zasad. Przyjmując, że długość fragmentu Okazaki wynosi około 1-2 Kb [1], można obliczyć, że polimeraza DNA musi ulegać dysocjacji i reinicjować około 2 do 4-ech tysięcy razy na nici opóźnionej [25]. W komórce znajduje się około 10 do 20 cząsteczek holoenzymu Pol III DNA [26, 27], dlatego też, w trakcie replikacji genomowego DNA każda cząsteczka jest używana wielokrotnie. Po ukończeniu syntezy jednego fragmentu Okazaki jest przenoszona na miejsce rozpoczęcia następnego fragmentu [15, 28, 29] (Ryc. 1).

W ciągu ostatnich lat opublikowano szereg prac [30-35] mających na celu wyjaśnienie mechanizmu umożliwiającego jednoczesną replikację obu nici DNA. Badano mechanizm przemieszczania się polimerazy do nowego primera RNA, po ukończeniu syntezy poprzedniego fragmentu Okazaki w trakcie replikacji nici opóźnionej [36, 37, 20, 22].

Jak wspomnieliśmy, holoenzym pol III DNA ma budowę asymetryczną (Ryc. 2). Wchodzący w skład holoenzymu kompleks γ umieszcza przy nowopowstałym primerze RNA pierścień β , który zamyka się wokół DNA jak koralik [38, 39]. Po zamknięciu pierścienia wokół DNA, oddziaływanie β z kompleksem γ maleje, natomiast wzrasta oddziaływanie z podjednostką α rdzenia i następuje replikacja nowego fragmentu Okazaki (Ryc. 3). Po zakończeniu replikacji fragmentu Okazaki, następuje odłączenie holoenzymu od pierścienia β . Ilość podjednostek β w komórce jest ściśle określona (około 300 dimerów), dlatego też aby mogły być ponownie wykorzystane, pierścienie β są

uwalniane z końca 3' zsyntetyzowanego fragmentu Okazaki. Uwolniony pierścień β może znów przyłączyć się do kompleksu γ i wziąć udział w replikacji następnego fragmentu Okazaki [8, 25]. Przedstawiony powyżej mechanizm, zaproponowany przez O'Donnella [8], nie jest w pełni udowodniony, jednakże wiele wyników doświadczeń wskazuje, że jest on wysoce prawdopodobny. Wykazano, że kompleks γ specyficznie rozpoznaje koniec 3' primera RNA i umieszcza tam pierścień β , w reakcji, w której następuje hydroliza ATP. Ustalono, że podjednostką odpowiedzialną za oddziaływanie pierścienia β z kompleksem γ jest podjednostka δ wchodząca w skład kompleksu γ [31]. Wykazano, że kompleks γ ma aktywność DNA-zależnej ATPazy [6, 18]. Wciąż nie jest znany mechanizm umieszczania pierścienia β na DNA. Następnym etapem wymagającym wyjaśnienia jest połączenie rdzenia polimerazy z pierścieniem β . W nieobecności DNA rdzeń wykazuje niskie powinowactwo do pierścienia β . Po przyłączeniu do końca primera RNA, powinowactwo pomiędzy rdzeniem a β znacznie wzrasta [35]. Jest to związane ze zmianą konformacji części C-terminalnej podjednostki α w obecności DNA [35, 40]. Miejsce wiązania β z rdzeniem i kompleksem γ zachodzą na siebie (C-terminalna część podjednostki β), tak więc, rdzeń i kompleks γ nie mogą równocześnie oddziaływać z pierścieniem β . Dlatego też, podczas syntezy DNA, stabilny i wysoce procesywny kompleks β - α nie pozwala na połączenie β z kompleksem γ i przerwanie syntezy DNA [8, 41]. Funkcję ochraniającą połączenie β - α pełni również podjednostka τ . Podjednostka τ przeciwdziała usuwaniu z DNA podjednostki β przez kompleks γ . Przy braku podjednostki τ , długość zsyntetyzowanego DNA na nici prowadzącej jest proporcjonalna do stężenia podjednostki β , a odwrotnie proporcjonalna do stężenia kompleksu γ . Wskazuje to, że τ jest wymagane do tworzenia wysoce procesywnego kompleksu nici prowadzącej [22]. Na nici opóźnionej, silne oddziaływanie pomiędzy polimerazą a podjednostką β , słabnie po ukończeniu fragmentu Okazaki i polimeraza oddysocjowuje, pozostawiając pierścień β [25]. Nieznany jest mechanizm dysocjacji polimerazy od matrycy po ukończeniu fragmentu Okazaki. Niejasny jest również, mechanizm uwalniania pier-



Ryc. 3. Schemat umieszczenia pierścienia β na końcu 3'-OH primera.

ścienia β od DNA po zakończeniu syntezy fragmentu Okazaki. Badania *in vitro* wskazują, że odłączenie pierścienia β od DNA może nastąpić w obecności kompleksu γ [22, 25, 35].

To, czy kompleks γ umieszcza, czy odłącza pierścień β od DNA jest prawdopodobnie zależne od danej struktury DNA i od oddziaływania pomiędzy pierścieniem β , podjednostką τ a rdzeniem polimerazy.

III. Porównanie holoenzymu polimerazy III DNA *Escherichia coli* z innymi replikazami

Jak opisano wyżej, efektywne funkcjonowanie holoenzymu polimerazy III DNA podczas replikacji chromosomu bakteryjnego zależy od współdziałania trzech funkcjonalnych elementów: 1) rdzenia polimerazy, odpowiedzialnego za syntezę DNA, 2) pierścieni β zwiększających procesywność holoenzymu poprzez utrzymywanie stałego kontaktu pomiędzy polimerazą DNA a matrycą, oraz z 3) kompleksu γ , odpowiedzialnego za umieszczanie pierścienia β na DNA. Okazuje się, że te same funkcjonalne elementy biorą udział podczas replikacji DNA zarówno w organizmach prokariotycznych jak i w eukariotycznych.

W polimerazie faga T4, rdzeniem polimerazy DNA jest produkt genu 43 (g43p), a funkcję pierścienia β pełni białko genu 45 (g45p). Za ukierunkowywanie i przyłączanie g45p do matrycy DNA odpowiedzialny jest kompleks dwóch białek g44p i g62p — funkcjonalny odpowiednik kompleksu γ [42]. W *E. coli* te trzy składniki replikazy są łączone razem poprzez podjednostkę τ . Wiadomo, że podjednostka τ odgrywa istotną rolę koordynując szybkość replikacji DNA z szybkością rozwijania DNA przez helikazę, utrzymując w ten sposób ciągłość syntezy DNA. Do tej pory nie odnaleziono analogu podjednostki τ w replikacji faga T4. Jednakże, polimeraza faga T4, podobnie jak faga T7, oddziałuje bezpośrednio z helikazą. Dlatego też wydaje się, że nie potrzebna jest obecność analogu białka τ , w replikacji faga T4 [43, 44].

Organizmy eukariotyczne, od drożdży do człowieka, replikują DNA według tej samej strategii. (Tab. 2). Opracowano [45, 46] system *in vitro*, do badania replikacji plazmidów DNA zawierających miejsce star-

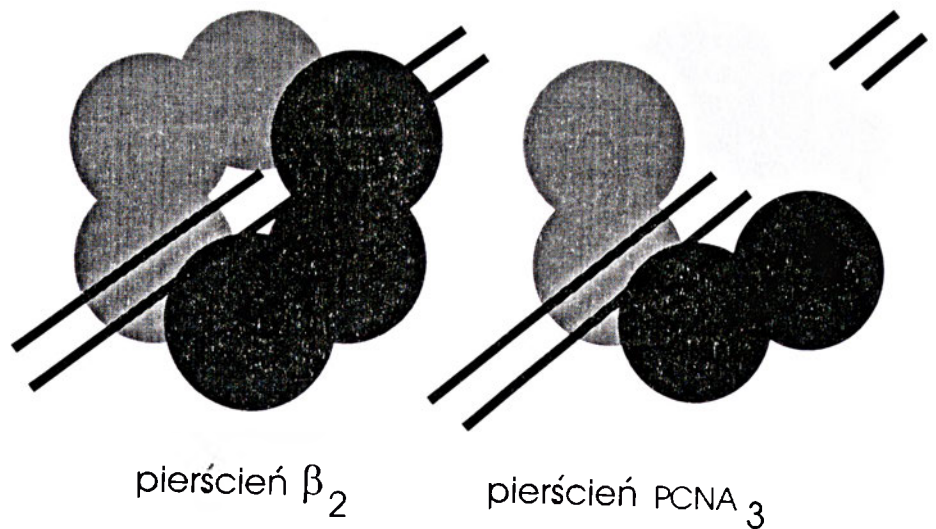
tu replikacji wirusa SV-40. Jest to modelowy system pozwalający prześledzić udział poszczególnych białek w replikacji organizmów eukariotycznych. Wiadomo, że do inicjacji replikacji DNA potrzebny jest antygen T i cały kompleks białek inicjacyjnych. Antygen T posiada również funkcję helikazy. Kompleks Antygen T-RP-A (komórkowe białko replikacyjne A), łączy się z polimerazą α [47]. Polimeraza α posiada dwie aktywności: polimerazy i primazy [1]. Polimeraza α syntetyzuje w miejscu startu replikacji primer RNA. Również polimeraza α rozpoczyna z primera RNA syntezę krótkiego (około 34 nukleotydów) odcinka DNA. Następnie RF-C (ang. *replication factor C*) [48, 49], odpowiednik kompleksu γ , przyłącza się do końca 3'OH nowopowstającego DNA i umieszcza tam pierścień PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), odpowiednik pierścienia β [50]. Dalszą syntezę DNA przejmuje inna polimeraza replikacyjna. Dwie polimerazy eukariotyczne, polimeraza δ i polimeraza ϵ uważane są za polimerazy replikacyjne [patrz artykuł przeglądowy 51, 52]. Jednakże dane uzyskane *in vitro*, przy użyciu systemu replikacji wirusa SV40 wskazują, że polimeraza δ może syntetyzować obie nici DNA, prowadzącą i opóźnioną [53, 54]. W przeciwieństwie do holoenzymu polimerazy III DNA, polimeraza δ nie tworzy dimeru łączącego replikację obu nici w widelkach replikacyjnych. Nie posiada również odpowiednika podjednostki τ . Uważa się, że RF-C nie jest związany z polimerazą δ , choć ostatnio [55], wyizolowano z komórek grasicy cielęcej kompleks zawierający polimerazę α , polimerazę δ i białka RF-C. Badania przeprowadzone przez T s u r i m o t o i S t i l l m a n a [56] wskazują, że przełączenie z replikacji przez polimerazę α , na replikację prowadzoną przez polimerazę δ następuje w wyniku zmiany stężenia białek RP-A (odpowiednik prokariotycznego SSB) wiążących się z jednoniciowym DNA. Badania te wskazują, że wysokie stężenie RP-A, oraz obecność RF-C i PCNA powodują zablokowanie ponownego przyłączenia się polimerazy α po rozpoczęciu syntezy fragmentu Okazaki [56, 57]. Długość fragmentu, syntetyzowanego przez polimerazę α jest więc określona jedynie procesywnością tej polimerazy [58]. Tak więc, krótki fragment DNA syntetyzowany przez polimerazę α jest następnie wydłużany przez polimerazę δ przy współdziałaniu RF-

Tabela 2.

Trzy główne komponenty struktury różnych replikaz

Komponent	<i>E. coli</i>	Fag T4	Eukarionty
I. rdzeń polimeraza 3'—5' egzonukleaza	3 podjednostki ($\alpha + \epsilon + \theta$)	1 podjednostka	2 podjednostki g43p polimeraza δ (polimeraza ϵ ?)
II. kompleks ładujący pierścień	kompleks γ 5 podjednostek γ δ' δ χ ψ	kompleks g44 62p 2 podjednostki g44p g62p	kompleks RF-C 5 podjednostek p128 p37 p40 p38, p36 PCNA
III. pierścień	β	g45p	

Ryc. 4. Schemat budowy pierścieni β i PCNA. Pierścień β składa się z dwóch protomerów natomiast pierścień PCNA tworzą trzy protomery PCNA. Wielkość obu pierścieni jest identyczna [61].



-C i PCNA [45]. Fakt, że *in vitro* replikacja wirusa SV40 zachodzi bez udziału polimerazy ϵ , a jedynie w obecności polimerazy δ sugeruje, że polimeraza δ jest główną polimerazą, przynajmniej w systemie wirusowym. Jednakże, synteza chromosomalna jest znacznie bardziej skomplikowanym procesem, w którym polimeraza ϵ może odgrywać ważną rolę.

Kompleks RF-C [59, 49], składa się z 5-ciu podjednostek podobnie jak kompleks γ z *E. coli*. Podjednostki γ i δ z *E. coli* wykazują homologię z podjednostkami ludzkiego kompleksu RF-C jak również z białkami g44/62p faga T4 [60].

Pomimo, że nie wykazano podobieństwa sekwencji aminokwasowej pomiędzy β , g45p czy PCNA jednakże pokazano, że struktura przestrzenna tych trzech białek jest szalenie podobna [61]. W przypadku *E. coli* pierścień zbudowany jest z dwóch podjednostek β . W podjednostce β można wyróżnić trzy charakterystyczne domeny o identycznej topologii (Ryc. 4). Podjednostki pierścienia PCNA i g45p są o 1/3 mniejsze od podjednostki β . Dlatego też, aby zachować podobieństwo struktury pierścienia nie tworzą dimeru lecz trimer. Badania biochemiczne i krystalograficzne β i PCNA potwierdziły podobieństwo struktury oraz podobieństwo funkcjonowania pierścieni.

IV. Podsumowanie

Proces replikacji chromosomalnego DNA wymaga koordynacji przestrzennej i czasowej wydarzeń zachodzących w widełkach replikacyjnych. Następuje to dzięki odpowiedniej sekwencji interakcji białko-białko jakie mają miejsce w trakcie syntezy obu nici matrycy DNA przez kompleks replikacyjny. Około 20 białek uczestniczy w procesie replikacji DNA w komórce *E. coli*. Ich wzajemne interakcje indukują określone aktywności, rekrutują odpowiednie białka do kompleksu replikacyjnego oraz powodują rearanżacje architektury tego kompleksu. Obecnie znamy główne etapy umożliwiające szybką, wierną i skoordynowaną syntezę DNA nici prowadzącej i opóźnionej. Jednakże, molekularne mechanizmy tego procesu, szczególnie

w organizmów eukariotycznych wymagają dalszych, intensywnych badań. Choć powszechnie przyjęty jest mechanizm nieciągłej syntezy DNA na nici opóźnionej oraz ciągłej na nici prowadzącej, jednakże, publikowane były również prace postulujące, że synteza DNA na obu niciach może być nieciągła tak jak proponował w swoich pracach Okazaki [62, 63].

Podziękowanie

Serdecznie dziękujemy Panu Prof. dr hab. Zygmuntowi Cieśli za wnikliwe przeczytanie i wszystkie uwagi dotyczące tej pracy. Praca finansowana w ramach grantu KBN 6 PO4A 043 09.

Artykuł otrzymano 10 stycznia 1997 r.

Zaakceptowano do druku 12 stycznia 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Kornberg A, Baker TA (1992) DNA replication. New York, Freeman. 2ed
2. Marszałek J (1994) *Post Biochem* **40**: 200-210
3. Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D, Argos P (1990) *Protein Eng.* **3**: 461-467
4. Joyce CM, Steitz TA (1994) *Annu Rev Biochem* **63**: 777-822
5. McHenry CS, Kornberg A (1977) *J Biol Chem* **252**: 6478-6484
6. Maki S, Kornberg A (1998) *J Biol Chem* **263**: 6561-6569
7. Maki H, Maki S, Kornberg A (1988) *J Biol Chem* **263**: 6570-6578
8. Kelman Z, O'Donnell M (1995) *Annu Rev Biochem* **64**: 171-200
9. Sinha NK, Morris CF, Alberts BM (1980) *J Biol Chem* **225**: 4290-4303
10. Maki H, Kornberg A (1985) *J Biol Chem* **260**: 12987-12992
11. DeFrancesco R, Bhatnagar S K, Brown A, Besman MJ (1984) *J Biol Chem* **259**: 5567-5573
12. Scheuermann RH, Echols H (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7747-7751
13. McHenry CS, Crow W (1979) *J Biol Chem* **254**: 1748-1753
14. McHenry CS (1982) *J Biol Chem* **257**: 2657-2663
15. Burgers PM J, Kornberg A (1982) *J Biol Chem* **257**: 11474-11478
16. Stukenberg P T, Studwell-Vaughan P S, O'Donnell M (1991) *J Biol Chem* **266**: 7550-7557
17. Wickner S (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 3511-3515
18. O'Donnell M (1987) *J Biol Chem* **262**: 16558-16565
19. Yuzhakov A, Turner J, O'Donnell M (1996) *Cell* **86**: 877-886

20. Kim S, Dallmann HG, McHenry CS, Marians K J (1996) *Cell* **84**: 643-650
21. Studwell-Vaughan PS, O'Donnell M (1991) *J Biol Chem* **266**: 19833-19841
22. Kim S, Dallmann HG, McHenry CS, Marians K H (1996) *J Biol Chem* **271**: 4315-4318
23. Taugu K, Peng H, Marians K J (1994) *J Biol Chem* **269**: 4675-4682
24. Chandler M, Bird R E, Caro L (1975) *J Mol Biol* **94**: 127-131
25. Stukenberg PT, Turner I, O'Donnell M (1994) *Cell* **78**: 877-887
26. McHenry CS, Kornberg A (1981) *Enzymes*, vol 14 (ed. Boyer, P.D.) pp 39-50 Academic Press, Orlando, FL
27. Wu YH, Franden MA, Hawker JR, McHenry C S (1984) *J Biol Chem* **259**: 12117-12122
28. O'Donnell M, Kornberg A (1985) *J Biol Chem* **260**: 12875-12883
29. Johanson KO, McHenry CS (1982) *J Biol Chem* **257**: 12310-12315
30. Ornust R, Finkelstein J, Naktinis V, Turner J, Fang L, O'Donnell M (1995) *J Biol Chem* **270**: 13348-13357
31. Naktinis V, Ornust R, Fang L, O'Donnell M (1995) *J Biol Chem* **270**: 13358-13365
32. Ornust R, Finkelstein J, Turner J, Naktinis V, O'Donnell M (1995) *J Biol Chem* **270**: 13366-13377
33. Xiao H, Naktinis V, O'Donnell M (1995) *J Biol Chem* **270**: 13378-13383
34. Stukenberg PT, O'Donnell M (1995) *J Biol Chem* **270**: 13384-13391
35. Naktinis V, Turner J, O'Donnell M (1996) *Cell* **84**: 137-145
36. Reems JA, Wood S, McHenry CS (1995) *J Biol Chem* **270**: 5606-5613
37. Dallmann HG, Thimming R L, McHenry CS (1995) *J Biol Chem* **270**: 29555-29562
38. Stuckenbergt PT, Studwell-Vaughan PS, O'Donnell M (1991) *J Biol Chem* **266**: 11328-11334
39. Kong X-P, Ornust R, O'Donnell M, Kuriyan J (1992) *Cell* **69**: 425-437
40. Kim DR, McHenry CS (1996) *J Biol Chem* **271**: 20699-20704
41. Herendeen DR, Kelly TJ (1996) *Cell* **84**: 5-8
42. Young MC, Redd MK, von Hippel PH (1992) *Biochemistry* **31**: 8675-8690
43. Nakai H, Richardson CC (1986) *J Biol Chem* **261**: 15208-15216
44. Richardson CC, Nosal NG (1989) *J Biol Chem* **264**: 4732-4739
45. Waga S, Stillman B (1994) *Nature* (London) **369**: 207-212
46. Waga S, Hannon G J, Beach D, Stillman B (1994) *Nature* (London) **369**: 574-578
47. Conzen SD, Cole CN (1994) *Semin Virol* **5**: 349-356
48. Burgers PM J (1991) *J Biol Chem* **266**: 22698-22707
49. Uhlmann F, Cai J, Flores-Rozas H, Dean F B, Finkelstein J, O'Donnell M, Hurwitz J (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6521-6526
50. Kuriyan J, O'Donnell M (1993) *J Mol Biol* **234**: 915-925
51. Sugino A (1995) *TIBS* **20**: 319-323
52. Siedlecki JA, Nowak R (1995) *Post Biochem* **41**: 326-331
53. Weinberg DH, Kelly TJ (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9742-9746
54. Lee S-H, Kwong AD, Pan Z-Q, Hurwitz J (1991) *J Biol Chem* **266**: 594-602
55. Maga G, Hubscher U (1996) *Biochemistry* **35**: 5764-5777
56. Tsurimoto T, Stillman B (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1023-1027
57. Lee MYW T, Jiang Y, Zhang SJ, Toomey NL (1991) *J Biol Chem* **266**: 2423-2429
58. Matsumoto T, Eki T, Hurwitz J (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9712-9716
59. Downey K M, Tan C-K, So AG (1990) *BioEssays* **12**: 231-236
60. O'Donnell M, Ornust R, Dean FB, Chen M, Hurwitz J (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 1-3
61. Kelman Z, O'Donnell (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 3613-3620
62. Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K, Sigino A (1968) *Proc Natl Acad Sci USA* **59**: 598-605
63. Wang T-Ch V, Chen S-H (1994) *Bioch Bioph Res Commun* **198**: 844-849



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”.

„X” — ostatnia niewiadoma wirusa zapalenia wątroby typu B? Transaktywujące i onkogenne własności białka X HBV

„X” — the last unknown of hepatitis B virus? Transactivating and oncogenic properties of X protein

MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. ORF X a onkogeny retrowirusów
- III. Białko X jako transaktywator
III-1. Mechanizm transaktywacji
- IV. Własności onkogenne białka X
IV-1. Modele biologiczne
IV-2. Integracja genu X z genomem gospodarza
IV-3. pX kontra p53
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. ORF X and retroviral oncogens
- III. X protein as transactivator
III-1. Mechanism of transactivation
- IV. Oncogenic properties of X protein
IV-1. Biological models
IV-2. Integration of X gene into host genome
IV-3. pX contra p53
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: HBV — wirus zapalenia wątroby typu B; ORF — otwarta ramka odczytu; pX — białko X; CAT — acetylotransferaza chloramfenikolowa; ENH — enhancer; XRE — sekwencja odpowiadająca na białko X.

I. Wstęp

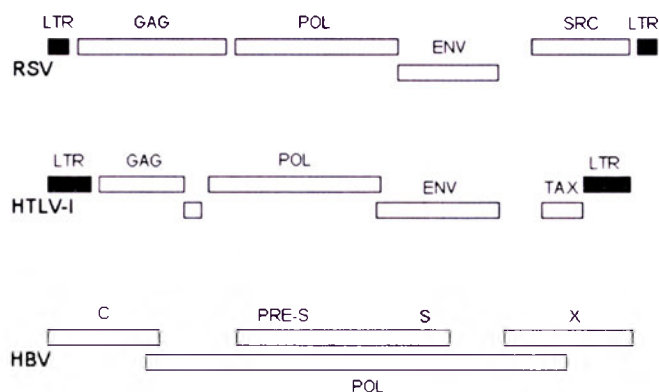
Większość wirusów onkogennych zawiera geny kodujące transaktywatory transkrypcji. W czasie infekcji wirusowej produkty tych genów wpływają na regulację transkrypcji zarówno genów własnych jak i komórkowych. Ma to istotne znaczenie dla przebiegu zakażenia. W przypadku wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) czynnikiem wykazującym własności transaktywujące jest białko X, będące produktem ekspresji genu X HBV [1].

Specyficzną cechą zakażenia HBV jest możliwość rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby, które charakteryzuje się różnym stopniem uszkodzenia wątroby oraz stałą obecnością antygenów wirusowych w surowicy zakażonych osób. Podobny obraz utrzymuje się po integracji HBV DNA z genomem hepatocytów, dzięki której kontynuowana jest transkrypcja antygenów wirusowych. Od dawna obserwuje się ścisłą zależność pomiędzy przewlekłym zapaleniem wątroby a rozwojem pierwotnego raka wątroby. Chorzy z przewlekłym zapaleniem wątroby zapadają na raka wątroby [2] 100 częściej niż osoby niezakażone [3]. Obecnie postuluje się, że funkcje transaktywujące białka X są związane

z transformacją nowotworową komórek wątrobowych, będącą następstwem zakażenia HBV [4].

II. ORF X a onkogeny retrowirusów

Replikacja HBV zachodzi podobnie (choć nie identycznie) jak replikacja retrowirusów, wykazujących zdolność do ekspresji polipeptydów aktywujących transkrypcję. Pewne podobieństwa w sposobie replikacji i organizacji genetycznej (Ryc. 1) retrowirusów i HBV [5] sugerowały, że produkt ekspresji genu X HBV jest analogiczny do produktu genu *tat* pochodzącego z HIV. Jednak w przeciwieństwie do białka *tat*, rola białka X w procesie replikacji nie jest udowodniona, potwierdzona została natomiast w wie-



Ryc. 1. Porównanie organizacji genetycznej HBV i retrowirusów. Przedstawiono schematy zlinearyzowanych genomów wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) i dwóch retrowirusów: silnie onkogenego wirusa mięsaka Rousa (RSV) i słabo onkogenego wirusa ludzkiej białaczki limfocytów T. Gen X zajmuje pozycję analogiczną do onkogeny *src* RSV oraz do kodującego aktywator transkrypcyjny genu *tax* HTLV.

* Dr, I Zakład Biochemii, IFiB Akademii Medycznej w Łodzi, 90-131 Łódź, ul. Lindleya 6

lu badaniach jego rola w procesie aktywacji transkrypcji [1, 6].

Porównanie sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej wykazało, że ORF X, podobnie jak onkogeny wirusowe, zawiera kodony charakterystyczne dla genów komórek eukariotycznych, a nie wirusów atakujących te komórki. Wydaje się, że podobnie jak onkogeny retrowirusowe gen X mógł zostać przeniesiony stosunkowo niedawno z genomu komórkowego [5].

Białko X nie działa tak jak białka onkogenów retrowirusowych. W swym działaniu przypomina ono bardziej transaktywatory kodowane przez wirusy ludzkiej białaczki limfocytów T (HTLV) typu I i II. Białka te nie zachowują się jak klasyczne białka onkogenne, ale zakażenie produkującymi je wirusami jest związane z procesem nowotworzenia.

III. Białko X jako transaktywator

Oddziaływanie aparatu transkrypcyjnego HBV i białka X przedstawiono w I części artykułu pt.: „Gen X i produkty jego ekspresji”. W obrębie enhancera I HBV zidentyfikowana została krótka sekwencja reagująca na białko X tzw. XRE (ang. *X-response element*). Mutacja typu zmiany ramki odczytu w rejonie ORF X genomu HBV powoduje zmniejszenie poziomu transkrypcji genów wirusowych zależnych od enhancera I [7, 8]. Wrażliwość na białko X wykazują też sekwencje innych wirusów np. sekwencje wiążące czynnik AP1 i AP2 w enhancerze SV40 [9] czy też, pochodząca z rejonu LTR HIV1, sekwencja wiążąca czynnik NFκB, [10]. Podobną wrażliwość wykazują komórkowe sekwencje promotorowe genów: β-interferonu, [1], MHC I [11], MHC II [12] c-myc [13], c-jun [14], c-fos [15]. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że białko X transaktywuje geny w różnych typach komórek poprzez różne sekwencje typu XRE. Przykładem takiego zróżnicowania może być sekwencja wiążąca AP2, która odpowiada na białko X w komórkach CV-1 [9], ale nie w komórkach HepG2 [16]. Z kolei sekwencja wiążąca NFκB funkcjonuje jako XRE dla LTR HIV 1 w komórkach HepG2 [10, 16], ale nie dla enhancera SV40 w komórkach CV-1 [9]. Wynika z tego, że w stosunku do danego genu podatność na transaktywację białkiem X zależy w dużej mierze od użytej linii komórkowej [16]. W różnych liniach komórkowych pX oddziałuje prawdopodobnie z różnymi czynnikami komórkowymi [17]. Wyniki badań nad zdolnością białka X do aktywacji transkrypcji w różnych komórkach podsumowano w tabeli 1.

III-1. Mechanizm transaktywacji

Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że białko X, poprzez oddziaływania typu białko-białko z komórkowymi czynnikami regulatorowymi wpływa na aktywację przekaźników sygnału komórkowego [25, 26] oraz na wiązanie czynników transkrypcyjnych do

DNA [27]. Wykazano, że białko X aktywuje transkrypcję poprzez jądrowy czynnik kappa B (NFκB) [11, 16, 21, 28], czynniki C/EPB [28] i AP-1, AP-2 [9]. Promotory zawierające zmutowane miejsce wiązania tych czynników nie są aktywowane przez białko X. Prawdopodobnie pX może oddziaływać poprzez dimeryzację z innymi białkami. W przypadku kilku białek np.: p53 [29], podjednostki RPB5 eukariotycznej polimerazy RNA [30], UV-DDB [31] stwierdzono tworzenie *in vitro* heterodimerów z pX. Nie przesądza to oczywiście faktu czy takie wiązanie ma miejsce *in vivo* i czy rzeczywiście ma wpływ na aktywację transkrypcji.

Zdolność bezpośredniego oddziaływania pX z komórkowymi czynnikami transkrypcyjnymi wykazano w badaniach *in vitro* dla czynników: CREB i ATF2 [32]. Rozpoznają one w DNA element CRE o charakterystycznej sekwencji TGACGTC A. Bardzo zbliżoną sekwencję do powyższej (TGACGCAA) zawiera enhancer I HBV. W normalnych warunkach wymienione czynniki nie rozpoznają jednak tej sekwencji i nie wiążą się z nią. W obecności pX zarówno CREB jak i ATF-2 w postaci kompleksu z białkiem X [32] rozpoznają tę sekwencję. Wynika z tego, że białko X może zmieniać specyficzność wiązania tych czynników i prawdopodobnie innych czynników transkrypcyjnych w komórkach zakażonych przez HBV. Dzięki temu zwiększa się liczba genów komórkowych, które mogą zostać zaktywowane przez wirusowy transaktywator w następstwie zakażenia HBV.

Skomplikowany mechanizm transaktywacji dobrze ilustrują wzajemne oddziaływania pomiędzy białkiem X i czynnikiem NFκB. NFκB związany jest z ekspresją genów, które zwykle tylko przejściowo są aktywowane w komórce w odpowiedzi na zewnętrzną stymulację (czynniki wzrostu, estry forbolu). Jednym z takich genów jest gen interleukiny-8 (IL-8). IL-8 jest cytokiną związaną z odpowiedzią zapalną. Nie jest produkowana konstytutywnie lecz po indukcji przez inne cytokiny albo pod wpływem estrów forbolu. Wykazano, że gen IL-8 jest również aktywowany w komórkach transfekowanych genem X [28]. Estry forbolu i niektóre cytokiny uczestniczą również w aktywacji czynników transkrypcyjnych (NFκB, AP-1) poprzez bezpośrednią aktywację kinazy białkowej C (PKC). Stosując inhibitory PKC udowodniono, że aktywacja NFκB może odbywać się pod wpływem białka X bez udziału PKC [33]. W innych badaniach okazało się jednak, że białko X może także aktywować kinazę C, co wykazano na przykładzie genów, których ekspresja jest zależna od czynnika transkrypcyjnego AP-1 [25]. Wynika z tego, że aktywacja czynników transkrypcyjnych przez białko X może odbywać się na drodze zależnej i niezależnej od kinazy białkowej C (Ryc. 2). W przypadku omawianej wcześniej aktywacji NFκB niezależnej od PKC ważną rolę odgrywać może aktywność kinazy serynowo-treoninowej przypisywana białku X [34]. Aktywacja NFκB wymaga bowiem oddysocjowania

Tabela 1.

Wpływ białka X na sekwencje regulatorowe pochodzenia wirusowego i komórkowego w różnych komórkach. Przypadki braku aktywacji oznaczono znakiem minus

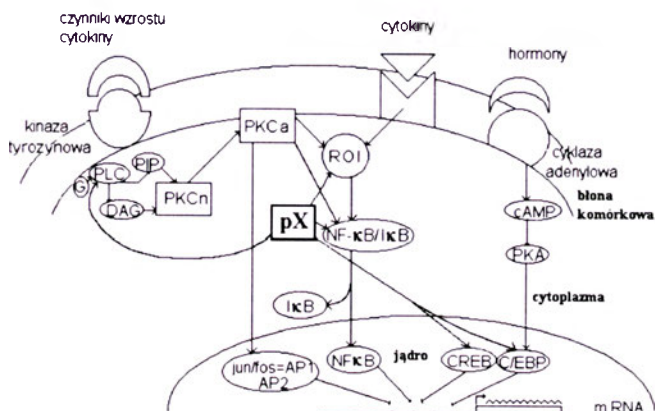
lp.	Docelowy rejon regulatorowy	Gen reporterowy	Rodzaj komórek	Efekt	Piśmiennictwo			
1	HBV promotor rdzeniowy/ENH II	CAT (RNA)	HuH7	+	Colgrove i wsp. [7]			
2	HBV promotor preS1/ENH I+ENH II	CAT (RNA)	HepG2 HuH7	+	+	Koike i wsp. [8] Rossner i wsp. [18] Levrero i wsp. [19]		
3	HBV promotor X/ENH I	X	CC113 HepG2 HeLa Vero	+	+	+	-	Wollersheim i wsp. [4] Siddiqui i wsp. [10] Balsano i wsp. [13] Twu i Schlomer [1]
4	SV40 wczesny promotor/enhancer	CAT	HepG2 COS	+	-	Takada i Koike [20] Koike i wsp. [8] Siddiqui i wsp. [10] Spandau i Lee [6]		
5	SV40 późny promotor/HBV ENH I	CAT	HepG2	+	Levrero i wsp. [21]			
6	RSV LTR	CAT	CV1 Vero	+	-	Spandau i Lee [6] Twu i Schloemer [22]		
7	HIV I LTR	CAT CAT, lucyferaza	H-9 HepG2 HepG2	+	+	+	Twu i wsp. [16] Seto i wsp. [17] Twu i Robinson [23] Siddiqui i wsp. [10]	
8	HTLV I LTR	CAT	HepG2 CC113 Vero	+	+	-	Levrero i wsp. [19] Wollersheim i wsp. [4] Twu i Schloemer [1]	
9	sekw. wiążąca AP2	CAT	CV1 HepG2	+	-	Seto i wsp. [9] Twu i wsp. [16]		
10	promotor α 1-antytrypsyny/ENH I	CAT	HepG2	+	Lee i wsp. [24]			
11	promotor β -INF	CAT	Vero HepG2	+	-	Twu i Schloemer [1] Zhou i wsp. [11]		
12	promotor MHC I	CAT	HepG2	+	Zhou i wsp. [11]			
13	promotor MHC II	CAT (RNA)	HepG2 HuH7	+	+	Hu i wsp. [12]		
14	promotor c-myc	CAT	HepG2 HeLa	+	+	Balsano i wsp. [13]		

inhibitora I κ B z nieaktywnego kompleksu (Rys. 2), co zachodzi pod wpływem fosforylacji inhibitora.

Inny mechanizm, który może wyjaśniać transaktywujące działanie białka X związany jest z jego podobieństwem do inhibitorów proteaz serynowych [35]. Białko X zmutowane w obrębie domen przypominających domenę Kunitz'a inhibitorów proteaz se-

rynowych traci własności transaktywujące. Białko X bezpośrednio oddziałuje z wątrobowymi proteazami serynowymi: tryptazą TL1 i TL2 i jest ich inhibitorem [36]. Wskazuje to na możliwość aktywacji transkrypcji poprzez inhibicję proteaz serynowych, które normalnie uczestniczą w procesie degradacji czynników transkrypcyjnych. Zahamowanie proteolizy tych czyn-

Ryc. 2. Potencjalne możliwości wpływu białka X na transkrypcję. Oddziaływanie odbywać się może poprzez aktywację wtórnych przekaźników sygnału w komórce i/lub przez bezpośrednie oddziaływanie pX z czynnikami transkrypcyjnymi. Zastosowane oznaczenia: G — białko G, PCL — fosfolipaza C, PIP — fosfatydyloinozytolo-bisfosforan, DAG — diacyloglicerol, PKC n/a (nie-) aktywna forma kinazy białkowej C, ROI — reaktywne formy tlenu, PKA — białkowa kinaza A.



ników prowadzić może do wzrostu ich stężenia w komórce i co za tym idzie wzrostu aktywności transkrypcyjnej.

IV. Własności onkogenne białka X

Prawie dwadzieścia lat temu zaobserwowano zależność pomiędzy występowaniem zapalenia wątroby typu B i raka wątroby w tych samych rejonach geograficznych [2]. Bardziej przekonujące dowody na związek między HBV i rakiem wątroby uzyskano dzięki szeroko zakrojonym badaniom epidemiologicznym [3], które wykazały, że ryzyko rozwoju raka wątroby u nosicieli wirusa jest ponad 100 razy wyższe niż u nienosicieli oraz, że to właśnie przewlekła postać zapalenia wątroby, a nie samo zakażenie HBV zwiększa ryzyko rozwoju raka (następuje to często po 30-40 latach od rozwoju zapalenia przewlekłego).

Dodatkowym potwierdzeniem roli HBV w rozwoju raka wątroby było wykrycie w większości wątrobowych nowotworów i pochodzących od nich linii komórkowych zintegrowanego DNA HBV. O znaczeniu białka X w transformacji nowotworowej wnioskować można z obserwacji, że jest ono jedynym spośród białek HBV, które zawsze ulega ekspresji w nowotworach związanych z wcześniejszym zakażeniem HBV.

IV-1. Modele biologiczne

Wyniki licznych badań biologicznych wskazują, że HBV ma zdolność transformacji komórkowej. DNA HBV transformuje nienowotworowe fibroblasty (NIH3T3) w taki sposób, że komórki te użyte do szczepienia bezgranicznych myszy powodują u nich powstanie nowotworu [37]. W hodowli hepatocytów pochodzących od transgenicznych myszy zawierających gen dla antygeny T SV40, transfekowanych genomem HBV [38], komórki wykazywały zmieniony typ wzrostu, a przeszczepione na bezgraniczne myszy powodowały powstanie u nich nowotworu. Taki sam efekt uzyskano transformując tę linię komórkową fragmentem wirusowego DNA zawierającym tylko gen X i sekwencję enhancerową pochodzącą z genomu HBV [39].

W bezpośrednich badaniach nad onkogenym potencjałem białka X wykorzystano transgeniczne myszy zawierające gen X HBV pod kontrolą własnego promotora. U myszy tych w ciągu 3-4 miesięcy rozwinęły się różnorodne zmiany hepatocytarne typu gruczolaków, a w ciągu 15 miesięcy u 80% myszy stwierdzono powstanie nowotworu [40]. Białko X nie uległo ekspresji we wszystkich hepatocytach, co sugeruje, że ekspresja tego białka *in vivo* może być ograniczona do komórek będących prawdopodobnie w określonym stanie zróżnicowania. W przewlekłych zapaleniach

wątroby białko X jest również wykrywane immunologicznie tylko w niektórych hepatocytach [41]. Przeciwnie wyniki, czyli brak zmian nowotworowych uzyskano w innych badaniach, w których wykorzystywano transgeniczne myszy zawierające gen X pod kontrolą wątrobowo-specyficznego promotora dla $\alpha 1$ -anty-trypsyny [24]. Główna różnica między opisywanymi doświadczeniami dotyczyła promotorów, które regulowały ekspresję białka X. Endogeny promotor genu X jest dodatkowo auto-regulowany przez białko X [42] co wpływało w doświadczeniu na stały, wysoki poziom pX. W drugim przypadku, w którym zastosowano promotor $\alpha 1$ -anty-trypsyny, poziom pX zmniejszył się wraz ze wzrostem myszy. Wyniki te wskazują, że do transformacji komórkowej niezbędna jest stała, wysoka ekspresja białka X.

IV-2. Integracja genu X z genomem gospodarza

Zintegrowane DNA HBV wykrywa się w ponad 90% przypadków raka wątroby związanych z zakażeniem HBV. W postaci zintegrowanej najczęściej znajdowane są sekwencje DNA HBV obejmujące gen X (2/3 analizowanych próbek pierwotnego raka wątroby) i często preS/S [20, 43]. Praktycznie nie obserwuje się specyficznych, stałych miejsc integracji DNA HBV [44]. Analiza miejsc integracji DNA HBV wskazuje, że ma ona charakter przypadkowy. Każdy z chromosomów może zawierać zintegrowany genom wirusowy. Integracja DNA HBV następuje z udziałem krótkich (11 pz), powtórzonych sekwencji DR1 i DR2, które położone są w obrębie genu X, przy 5' końcu genomowych nici DNA. Insercji DNA HBV towarzyszy rearanżacja zarówno wirusowego jak i komórkowego DNA, co objawia się w postaci inwersji, duplikacji, delekcji oraz translokacji chromosomalnych [45]. Porównanie zintegrowanego DNA HBV z komórek nowotworowych i z normalnych hepatocytów pochodzących od tych samych pacjentów wykazało obecność w komórkach nowotworowych odwróconych, powtórzonych sekwencji złożonych z fragmentów genomu HBV oraz komórkowego α -satelitarnego DNA [46]. Sugeruje się, że taka integracja DNA HBV może wpływać na stabilność struktury chromosomów, gdyż tandemowo powtarzające się sekwencje α -satelitarnego DNA są za nią odpowiedzialne. Bardzo rzadko dochodzi do spowodowanej insercją DNA HBV aktywacji protoonkogenów lub genów związanych ze wzrostem komórek. Jest to natomiast charakterystyczna cecha zakażeń wywoływanych przez WHV (Hepadanawirus zakażający świstaki), w których specyficzna integracja DNA WHV występuje w sekwencjach regulatorowych lub kodujących genów c-myc i N-myc [47]. W przeciwieństwie do modelu WHV, tylko w kilku przypadkach zakażenia HBV zaobserwowano insercję DNA HBV w sąsiedztwie genów komórkowych, które mogą mieć wpływ na proliferację hepatocytów. W jednym przypadku integracja dotyczyła

sekwencji homologicznej do genu receptora steroidowego, która okazała się kodować receptor dla kwasu retinowego [48]. W innym przypadku zintegrowane DNA HBV znaleziono w sekwencji genu kodującego cyklinę A, białko odpowiedzialne za regulację mitozy [49]. Integracja DNA HBV w rejon genu cykliny A odpowiedzialny za degradację tego białka może mieć bezpośredni wpływ na regulację podziałów komórkowych. Pojedyncze przypadki *cis* aktywacji genów komórkowych przez insercję DNA HBV nie tłumaczą jednak wszystkich przypadków transformacji nowotworowej komórek zakażonych HBV.

Inne światło na znaczenie integracji genomu HBV w rozwoju raka wątroby rzuciło odkrycie transaktywujących własności białka X [1]. Wykazano, że wiele promotorów wirusowych i komórkowych ulega transaktywacji przez białko X *in vitro*. Potwierdzeniem możliwości analogicznego działania białka X *in vivo* jest wynik badania aktywności białkowego produktu genu X pochodzącego ze zintegrowanego z genomem gospodarza DNA HBV. W większości wypadków zintegrowana z genomem sekwencja genu X pozbawiona jest 3' końca, czyli fragmentu kodującego karboksylowy koniec białka. Mimo to ekspresja tej sekwencji prowadzi do powstania funkcjonalnego transaktywującego białka X [43]. Jeśli obcięty gen X ulega ekspresji ze zintegrowanego DNA HBV to powinien powstawać fuzyjny transkrypt, w którym właściwy koniec karboksylowy podstawiony jest przez domenę pochodzenia komórkowego. Wykazano, że sekwencje zintegrowanego DNA HBV wyizolowane z komórek nowotworowych i sklonowane są zdolne do stymulacji transkrypcji [4, 20]. Wskazuje to, że ten rodzaj zmiany strukturalnej daje w efekcie funkcjonalny aktywator. Zmiana C-końcowej domeny zwiększa często aktywność białka X powyżej aktywności „dzikiego” genu X. Obserwacja ta sugeruje, że proces integracji genomu HBV z genomem gospodarza może stanowić mechanizm zwiększający aktywność białka X.

IV-3. pX kontra p53

Aktywność produktów genów supresorowych takich jak: p53 czy pRB105 jest często hamowana przez powstawanie mutantów lub przez interakcje z białkami transaktywującymi pochodzącymi od wirusów onkogennych. Antygen T wirusa SV40, białka E1a, E1b adenowirusa czy też E6, E7 wirusów z grupy brodawczaków wiążą się i unieczynnają p53 i pRB105 w zakażonych komórkach lub aktywują mechanizm ich degradacji. Białko p53 pełni w komórce szereg istotnych funkcji takich jak: kontrola transkrypcji (poprzez wiązanie się do specyficznych sekwencji DNA lub do czynników transkrypcyjnych), udział w procesie replikacji i naprawy DNA [50]. Mutacje w obrębie genu p53 znaleziono w wielu typach ludzkich nowotworów. Wykazano, że gen p53 ulega często mutacji w trzeciej pozycji kodonu 249 w przypadkach pierw-

otnego raka wątroby [51], szczególnie u osób eksponowanych na aflatoksynę. Dodatkowo wykazano *in vitro*, że taka mutacja tj. transwersja G → T może być indukowana przez aflatoksynę. Jednak u pacjentów z rakiem wątroby związanym HBV i nie eksponowanych na aflatoksynę, nie stwierdza się tego typu mutacji, co sugeruje, że mutacje p53 nie odgrywają pierwszoplanowej roli w rozwoju pierwotnego raka wątroby związanego z samym zakażeniem HBV [52, 53]. Wydaje się natomiast, że dla transformacji nowotworowej istotne może być wzajemne oddziaływanie pomiędzy p53 i pX. Białko p53 powoduje zahamowanie transkrypcji genu X [54], przy czym represja ta znoszona jest w przypadku jednoczesnej ekspresji białka X. Wynika z tego, że obecność białka X może likwidować supresorowe funkcje p53. Również obserwowane *in vitro* w obecności p53 zahamowanie replikacji HBV i aktywności promotora genu C, który odpowiada za tworzenie pregenomowego RNA, znoszone jest w obecności białka X. Stosunek pX do p53 wydaje się być istotnym czynnikiem określającym szybkość replikacji HBV [55]. W badaniach *in vitro* wykazano, że białko X wiąże się bezpośrednio z p53 [29] i hamuje jego swoiste wiązanie z DNA oraz wiązanie z czynnikami transkrypcyjnymi. Białko X blokuje również związany z p53 proces apoptozy komórek [56]. W obecności pX zahamowana zostaje zależna od p53 ekspresja genów związanych z procesem apoptozy (p21^{WAF1}, Bax, Fas). Ponieważ gen X ulega integracji i ekspresji, zahamowanie apoptozy zależnej od p53 może prowadzić we wczesnej fazie rozwoju raka wątroby do klonalnej selekcji hepatocytów zdolnych do ekspresji genów wirusowych.

V. Uwagi końcowe

Z różnego rodzaju badań zaprezentowanych powyżej wynika, że na rozwój raka wątroby w populacji osób zakażonych HBV mogą mieć wpływ różne czynniki, ale podstawową rolę w tym procesie odgrywa prawdopodobnie integracja genomu wirusa z genomem hepatocytów. Mutacje insercyjne związane z integracją zachodzą w przypadku HBV sporadycznie i nie mają większego znaczenia klinicznego. Obecnie wydaje się, że aktywacja ekspresji genów komórkowych przez produkt zintegrowanego genu X HBV ma podstawowe znaczenie w transformacji nowotworowej, przy czym transaktywacyjne działanie białka X jest niezależne od miejsca integracji. Aktywacja transkrypcji przez produkt genu X może być z jednej strony związana z uruchamianiem wtórnych przekazników na terenie cytoplazmy, z drugiej zaś, z bezpośrednim wpływem pX na wiązanie czynników transkrypcyjnych do miejsc regulujących ekspresję genów w jądrze komórkowym.

Artykuł otrzymano 30 grudnia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 6 marca 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Two JS, Schloemer RH (1987) *J Virol* **61**: 3448-3453
2. Szmuness W (1978) *Prog Med Virol* **24**: 40-69
3. Beasley RP (1982) *Hepatology* **2**: 21-26
4. Wollersheim M, Debelka U, Hofschneider PH (1988) *Oncogene* **3**: 545-552
5. Miller RH, Robinson WS (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2531-2535
6. Spandau FD, Lee CH (1988) *J Virol* **62**: 427-434
7. Colgrove R, Simon G, Gamem D (1989) *J Virol* **63**: 4019-4026
8. Koike K, Shirikata Y, Yaginuma K, Arii M, Takada S, Nakamura I, Hayashi Y, Kawada M, Kobayashi M (1989) *Mol Biol Med* **6**: 151-160
9. Seto E, Mitchell PJ, Yen TSB (1990) *Nature (Lond)* **344**: 72-74
10. Siddiqui A, Gayner R, Srinivasan A, Mapoles J, Farr RW (1989) *Virology* **169**: 479-484
11. Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, Yen TS (1990) *J Virol* **64**: 4025-4028
12. Hu KQ, Vierling JM, Siddiqui A (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7140-7144
13. Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marcio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **176**: 985-9992
14. Twu JS, Lai MY, Chen DS, Robinson WS (1993) *Virology* **192**: 346-350
15. Avantaggiati ML, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, DeM, Collepardo D, Levrero M (1993) *Oncogene* **8**: 1567-1574
16. Twu JS, Chu K, Robinson WS (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5168-5172
17. Seto E, Zhou DX, Peterlin BM, Yen TSB (1989) *Virology* **173**: 764-766
18. Rossner MT, Jackson RJ, Murray K (1990) *Pro R Soc Lond B Biol Sci* **241**: 51-58
19. Levrero M, Jean Jean O, Balsano C, Will H (1990) *Virology* **174**: 299-304
20. Takada S, Koike K (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5628-5632
21. Levrero M, Balsano C, Natoli G, Avantaggiati ML, Elfassi E (1990) *J Virol* **64**: 3082-3083
22. Twu JS, Schloemer RH (1989) *J Virol* **63**: 3065-3071
23. Twu JS, Robinson WS (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2046-2050
24. Lee TH, Finegold MJ, Shen RF, DeMayo JL, Woo SL, Butel JS (1990) *J Virol* **64**: 5939-5947
25. Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Lubner B, Hofschneider PH (1993) *Nature (Lond)* **361**: 742-745
26. Benn J, Schneider RJ (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10350-10354
27. Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, Costanzo A, Artini M, Balsano C, Levrero M (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 989-998
28. Mahe Y, Mukaida N, Kuno K (1991) *J Biol Chem* **266**: 13759-137632
29. Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2230-2234
30. Cheong JH, Yi MK, Li Y, Murakami S (1995) *EMBO J* **14**: 143-150
31. Lee TH, Elledge SJ, Butel JS (1995) *J Virol* **69**: 1107-1114
32. Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A (1991) *Science* **252**: 842-844
33. Lucito R, Schneider RJ (1992) *J Virol* **66**: 938-991
34. Wj J, Zhou ZY, Judd A, Cartwright CA, Robinson WS (1990) *Cell* **63**: 687-695
35. Takada S, Koike K (1990) *Jpn J Cancer Res* **81**: 1191-1194
36. Takada S, Kido H, Fukutomi A, Mori T, Koike K (1994) *Oncogene* **9**: 341-348
37. Shirakata Y, Kawada M, Fujiki Y, Sano H, Oda M, Yaginuma K, Kobayashi M, Koike K (1989) *Jpn J Cancer Res* **80**: 617-621
38. Hohne M, Schaefer S, Scifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH (1990) *EMBO J* **9**: 1137-1145
39. Seifer M, Hohne M, Schaefer S, Gerlich WH (1991) *J Hepatol* **13**(s.4): s61-s65
40. Kim C, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G (1991) *Nature (Lond)* **351**: 317-320
41. Wang WL, London WT, Lega L, Feitelson MA (1991) *Hepatology* **14**: 29-37
42. Blum HE, Zhang ZS, Galun E, von Waizsacker F, Garner B, Liang TJ, Wands JR (1992) *J Virol* **66**: 1223-1227
43. Schluter V, Meyer M, Hofschneider PH, Koshy R, Caselmann WH (1994) *Oncogene* **9**: 3335-3344
44. Tokino T, Matsubara K (1991) *J Virol* **65**: 6761-6764
45. Tokino T, Fukushige T, Nakamura T, Nagaya T, Muritsu T, Shiga N, Aoki N, Matsubara K (1987) *J Virol* **61**: 3848-3854
46. Ogata N, Tokino T, Kamimura T, Asakura H (1990) *Hepatology* **11**: 1017-1022
47. Buendia MA (1992) *Semin Cancer Biol* **3**: 309-320
48. Dejean A, Bougueleret I, Grzeschik KH, Tiollais P (1986) *Nature (Lond)* **322**: 70-72
49. Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Brechot C (1990) *Nature (Lond)* **343**: 555-557
50. Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine A, Shenk T (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 12028-12032
51. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC (1991) *Nature (Lond)* **350**: 427-428
52. Hayward NK, Walker GJ, Graham W, Cooksley E (1991) *Nature (Lond)* **352**: 764
53. Hosono S, Chou M-J, Lee C-S, Shih C (1993) *Oncogene* **8**: 491-496
54. Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K (1996) *Virology* **216**: 80-89
55. Lee H, Lee Y-H, Huh Y-S, Moon H, Yun Y (1995) *J Biol Chem* **270**: 31405-31412
56. Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher H-W, Hoeijmakers JHJ, Harris CC (1995) *Cancer Res* **55**: 6012-6016

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

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

Wewnątrzkomórkowe białka wiążące ATP

Intracellular ATP-binding proteins

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA¹

SŁAWOMIR PIKUŁA²

Spis treści:

- I. ATP jako wewnątrzkomórkowy ligand
- II. Klasyfikacja białek wiążących nukleotydy adeninowe
- III. Czy aneksyny wiążą nukleotydy?
- IV. Kanały jonowe regulowane przez ATP
- V. Aktyna, heksokinaza i białka pokrewne białkom szoku termicznego
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. ATP as an intracellular ligand
- II. Classification of adenine nucleotide-binding proteins
- III. Do annexins bind nucleotides?
- IV. ATP-regulated ion channels
- V. Actin, hexokinase and heat shock cognate proteins
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ADP — adenozyndifosforan; ATP — adenozyntrifosforan; cAMP — cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane regulator*) — produkt genu zwłóknienia torbielowatego (mukowiscydozy); CDP — cytydynodifosforan; CTP — cytydynotrifosforan; dADP, dATP, dGDP, dGTP — deoksynukleotydy; ER(SR) — retikulum endo(sarko)plazmatyczne; FAD — dinukleotyd flawino-adeninowy; GDP — guanozyndifosforan; GTP — guanozyntrifosforan; Hsc (ang. *heat shock cognate protein*) — białko pokrewne białkom szoku termicznego; IP₃ — inozytolotrisfosforan; K_{ATP} — kanał potasowy regulowany przez ATP; NAD — dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy; NADP — fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego; PLC — fosfolipaza C; PS — fosfatydyloseryna; RyR — receptor rianodynowy; TNP-ATP — trinitrofenyloadenozyntrifosforan; UDP — urydynodifosforan; UTP — urydynotrifosforan.

One of a cell biologist's favorite occupations is to discover the proteins that perform newly described functions in the cell.

Ken C. Holmes i wsp., 1993 [1]

I. ATP jako wewnątrzkomórkowy ligand

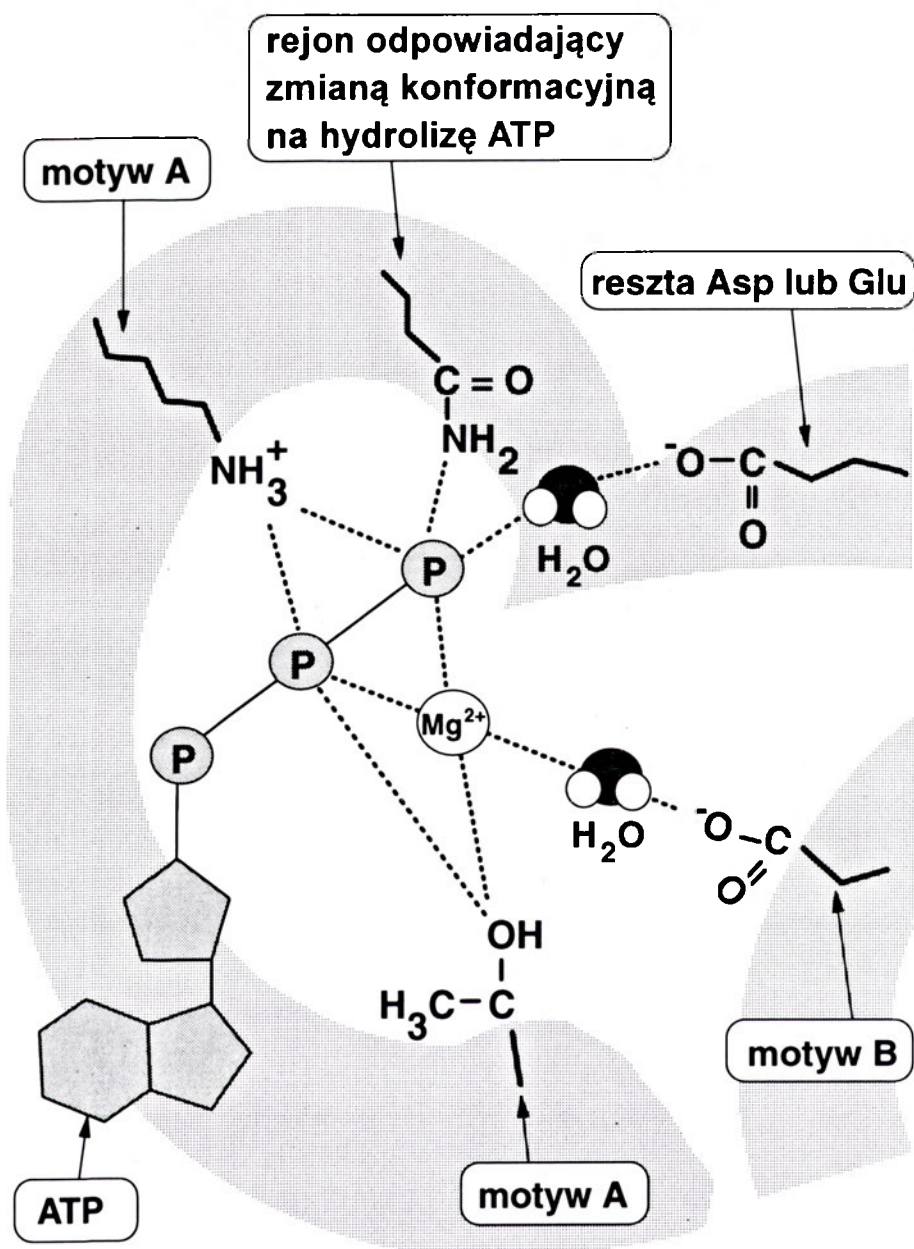
Adenozyntrifosforan, stanowiący uniwersalne źródło energii, występuje powszechnie w świecie ożywionym łącząc procesy oddychania, w których energia jest wytwarzana, z procesami takimi jak aktywny transport lub skurcz mięśni, w których energia jest zużywana. W komórkach występują wprawdzie związki fosforanowe bardzo podobne pod względem budowy do ATP, lecz obecność w ATP i jego pochodnych adenozyny nadaje tej grupie związków właściwości unikalne (Ryc. 1). Końcowe grupy fosforanowe ATP mogą być przekazywane na 5'-difosforany nukleozydów w reakcjach

katalizowanych przez specyficzne difosfokinazy. W wyniku tych reakcji z ATP i przykładowo GDP powstaje ADP i GTP. Wynienione reakcje oraz fakt, że w cząsteczce ATP występują dwa bezwodnikowe wiązania fosforanowe sprawia, że nukleotyd jest znakomitym nośnikiem energii w komórkach [2]. Podczas hydrolizy ATP z każdego wiązania fosforanowego uwalnia się znaczna ilość wolnej energii (ΔG° — 50 kJ/mol), wykorzystywanej w innych reakcjach biochemicznych. W stanie normy stężenie ATP w cytoplazmie (2-10 mM) jest kilkukrotnie wyższe niż innych nukleotydów zawierających rybozę (0,05-2 mM), co zależy od stanu metabolicznego i typu tkanki [3]. W wyniku uszkodzenia komórek, na skutek głodzenia, niedotlenienia lub obecności związków toksycznych, poziom ATP w cytoplazmie może znacznie spaść. Co więcej, zmiany stężenia nukleotydów lub odpowiednich zasad w płynach ustrojowych również wpływają na stężenie nukleotydów wewnątrz komórki. Do znacznych zmian stężenia trifosfodeoksyrybonukleotydów dochodzi także w trakcie cyklu komórkowego, szczególnie w fazie S [3].

Oprócz wymienionych funkcji, ATP może odgrywać rolę zewnątrzkomórkowego przekąźnika informacji, działając za pośrednictwem purynoreceptorów P2. ATP uwalniany jest z zakończeń komórek nerwowych, w czasie agregacji płytek krwi, z komórek kory nadnerczy oraz komórek nabłonkowych i z komórek, w których zachodzą procesy zapalne [4]. W tym przypadku jego stężenie na zewnątrz komórki może być regulowane przez specyficzną hydrolazę ATP, tzw. ektoATPazę, której centrum aktywne znajduje się po ekstracytoplazmatycznej stronie błony komórkowej [5, 6].

Adeninowe i rybozylowe grupy funkcyjne ATP pozwalają na jego wiązanie z różnymi białkami enzymatycznymi, regulacyjnymi i strukturalnymi, dzięki czemu związek ten okazał się być ważnym wewnątrz-

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



Ryc. 1. Domena wiążąca ATP (lub GTP) w białkach oddziałujących z nukleotydami. Motyw Walkera A: B-X₄-G-X₄-G-K-T-X₅-L (lub V); Motyw B: R (lub K)-X₃-G-X₃-L-H₄-D, gdzie X oznacza dowolny aminokwas, B — aminokwas zasadowy, H — aminokwas hydrofobowy, G — glicynę, K — lizynę, T — treoninę, L — leucynę, V — walinę i D — kwas asparaginowy.

komórkowym ligandem. Sprzyja temu stosunkowo wysoka stabilność chemiczna w środowisku wodnym, dzięki czemu ulega on jedynie powolnej hydrolizie.

Białka wiążące ATP (w tym ATPazy biorące udział w aktywnym transporcie jonów nieorganicznych, białka oporności wielolekowej, niektóre białka aparatu kurczliwego i kinazy białkowe) odznaczają się obecnością w ich cząsteczkach domeny wiążącej ATP o sekwencji aminokwasowej, określanej w literaturze przedmiotu mianem motywu Walkera A i B [7-9] (Ryc. 1). Białka takie hydrolizują ATP. Znane są również białka, które wiążą ATP, ale nie jest to w każdym przypadku połączone z hydrolizą nukleotydu. Są to: mitochondrialna translokaza nukleotydów adeninowych i transporter ATP-Mg/P_i [10], F-aktyna [11], regulowane przez ATP kanały jonowe [12], transporter CFTR [13, 14], żelzolina [15], białka szoku termicznego [1] i aneksyny [16, 17]. Niektóre z wymienionych białek nie zawierają w cząsteczce motywu Walkera. W niniejszym artykule przeglądowym szcze-

gółowiej omówione zostaną aneksyny, kanały jonowe regulowane przez ATP oraz aktyna, heksokinaza i białko Hsc70.

II. Klasyfikacja białek wiążących nukleotydy adeninowe

Wykrycie w strukturze pierwszorzędowej białek powtarzających się motywów czy domen, będących rodzajem znaków rozpoznawczych tych makrocząsteczek, pozwoliło na funkcjonalne wyodrębnienie grup białek oddziałujących z nukleotydami [8, 9]. Wśród nich jako pierwsze opisano dehydrogenazy, które wiążą dinukleotyd NAD oraz białka wiążące NADP i FAD [18]. Obecność innego motywu stwierdzono w cząsteczkach cykazy adenyłowej i białek wiążących mononukleotydy, takich jak kinaza adenyłowa, mitochondrialna F₀F₁-ATPaza, miozyna, dyneina, oraz białka wiążące GTP (czynnik wzrostowy EF-Tu i produkt genu H-ras-białko p21^{ras}) [7]. Jeszcze inny typ

motywu, zidentyfikowany najwcześniej w cząsteczce heksokinazy, został rozpoznany dzięki metodom analizy krystalograficznej między innymi w cząsteczkach aktyny [19] i białka Hsc70 [20]. Wydaje się, że do tej samej grupy można zaliczyć również kinazę glicerolową [1].

III. Czy aneksyny wiążą nukleotydy?

Aneksyny stanowią przykład grupy białek rozpuszczalnych, które oddziałują z ATP nie hydrolizując tego związku [17]. Aneksyny tworzą zróżnicowaną funkcjonalnie rodzinę makrocząsteczek wiążących się z fosfolipidami błon komórkowych. Wiązanie aneksyn z błonami zależy od stężenia jonów wapnia i jest specyficzne w stosunku do fosfolipidów anionowych. Dotychczas wyizolowano 13 białek należących do tej rodziny oraz wiele swoistych gatunkowo lub tkanekowo izoform [21-23]. Wszystkie aneksyny charakteryzuje podobny schemat budowy, składają się bowiem z rejonu rdzeniowego o zachowanej w ewolucji sekwencji aminokwasowej i regulatorowej domeny N-końcowej. Rejon rdzeniowy tworzą powtarzające się domeny zbudowane z 72 reszt aminokwasowych, w obrębie których znajdują się siedemnastoaminokwasowe sekwencje odpowiedzialne za wiązanie aneksyn z fosfolipidami i Ca^{2+} . Aneksyny oznaczone liczbami porządkowymi I-V i VII-XIII mają cztery takie domeny, a aneksyna VI osiem [21, 22] (Ryc. 2). W cząsteczce aneksyn brak jest klasycznych miejsc o strukturze "EF-hand", które występują w takich białkach wiążących Ca^{2+} , jak kalmodulina, parwalbumina i troponina C [24]. Rejon N-końcowy w cząsteczce aneksyn ma różną długość i zróżnicowaną sekwencję. Znajdują się w nim reszty aminokwasowe ulegające fosforylacji przez różne kinazy białkowe oraz miejsce odpowiedzialne za wiązanie aneksyn z innymi białkami, np. aktyną [22].

W wielu organach ssaków, jak łożysko, mózg, wątroba lub nadnercza, obserwuje się wysoki poziom ekspresji aneksyn (1-2% wszystkich białek). Ich funkcja nie jest jednak dokładnie poznana. Wśród badaczy przeważa opinia, że aneksyny ulegają przekształceniu z formy nieaktywnej, występującej w cytosolu, w formę aktywną biologicznie, po związaniu z błonami w odpowiedzi na zmiany stężenia Ca^{2+} w komórce z 50-100 nM w stanie spoczynku do 1-10 μ M w pobudzonej komórce [25]. Wiązanie aneksyn z fosfolipidami błonowymi w obecności Ca^{2+} wywołuje różne zmiany strukturalne w błonie [26, 27], modyfikujące jej właściwości, np. wzrost przepuszczalności dla Ca^{2+} [25]. Zaobserwowano również, że aneksyny *in vitro* tworzą kanały wapniowe w błonach [22-25]. Aneksyny biorą ponadto udział w fuzji błon w procesach endo- i egzocytozy, w wydzielaniu hormonów np. insuliny, neurotransmiterów i żółci oraz w inicjacji syntezy DNA, modulują oddziaływania składników cytoszkieletu z błoną plazmatyczną i regulują aktywność enzymów, w tym fosfolipazy A_2 [23, 28].

Niektóre izoformy aneksyn pozostają związane z błonami, nawet jeśli stężenie jonów wapnia w cytoplazmie spadnie do poziomu spoczynkowego [29, 30]. A zatem nie tylko zmiany stężenia Ca^{2+} , ale być może inne czynniki wpływają na charakter oddziaływań aneksyn z błoną. Wydaje się, że takim czynnikiem mogłyby być nukleotydy. Na korzyść takiej hipotezy przemawiają następujące obserwacje. W obecności ATP w stężeniach milimolowych wzrasta wiązanie aneksyny VI z błoną hepatocytu [31]. ATP i cAMP wiążą się *in vitro* z aneksyną I, co wpływa na zdolność tego białka do agregacji liposomów i granul sekrecyjnych z komórek chromochłonnych oraz na właściwości kanałów wapniowych tworzonych przez aneksynę I [16]. Wykazano również, że aneksynę VI można oczyścić stosując chromatografię powinowactwa na ATP-agarozie [17, 32]. Ponadto, aneksyny z komórek

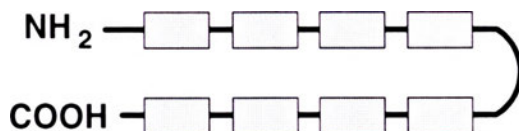
Aneksyny I - V, VIII - X, XII i XIII

m.cz. 32 - 36 kDa



Aneksyna VI

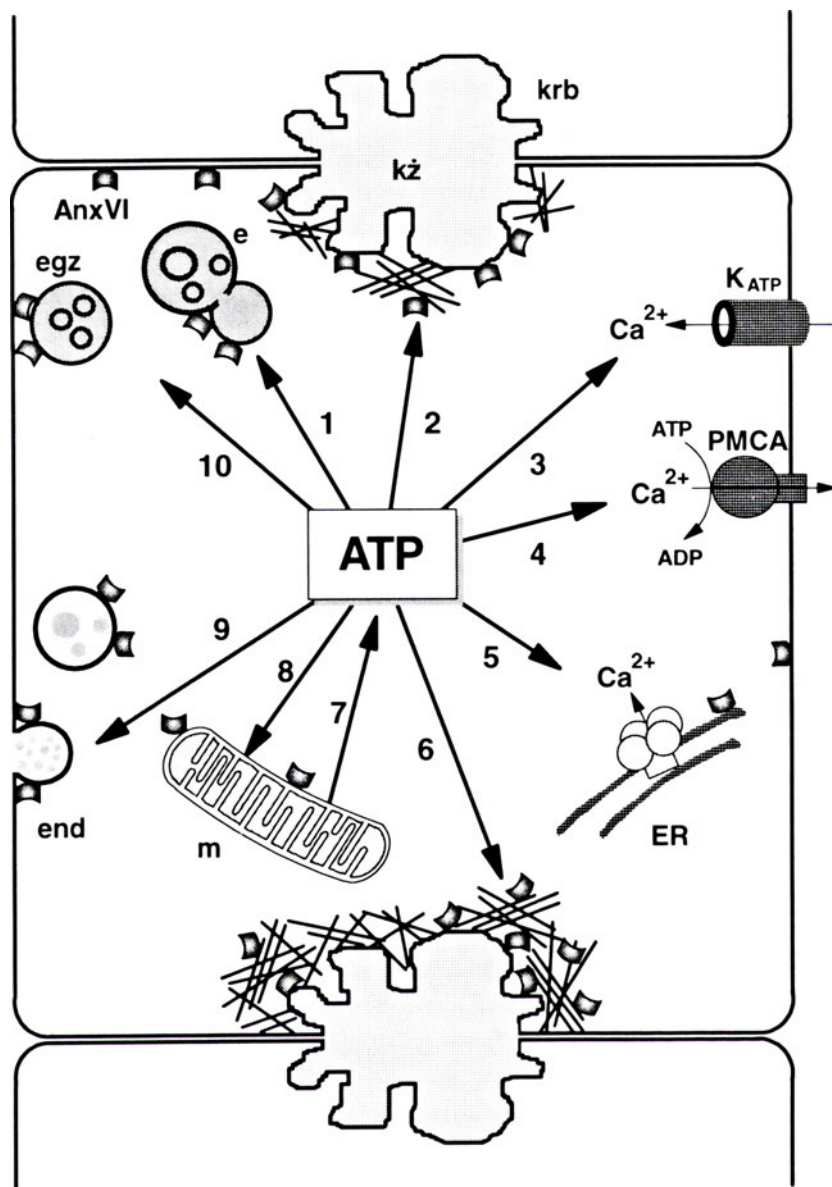
m.cz. 68 kDa



Aneksyny VII i XI

m.cz. 47 - 56 kDa

Ryc. 2. Porównanie domenowej budowy aneksyn I-XIII. Prostokąty odpowiadają domenom wiążącym jony wapnia i fosfolipidy w cząsteczkach aneksyn.



Ryc. 3. Wpływ ATP na procesy zachodzące w hepatocytach, w których zaangażowana jest aneksyna VI.

1 — nukleotyd moduluje agregację i fuzję endosomów (e) wywołaną przez aneksynę (AnxVI); 2 — ATP stymuluje wiązanie aneksyny z rejonem błony plazmatycznej (kz) otaczającym kanalik żółciowy (krb); 3 — ATP moduluje aktywność kanałów K_{ATP} ; 4 — nukleotyd stymuluje aktywność Ca^{2+} -ATPazy z błony plazmatycznej (PMCA); 5 — ATP i AnxVI regulują aktywność kanałów uwalniających Ca^{2+} z błon endoplazmatycznego retikulum (ER); 6 — ATP moduluje oddziaływanie aneksyny z F-aktyną; 7 — ATP powstaje w mitochondriach (m); 8 — aneksyna może wpływać na homeostazę wapnia w matrix mitochondriów, a tym samym regulować metabolizm tych organelli; ATP moduluje aktywność mitochondrialnych kanałów K_{ATP} ; 9 — nukleotyd wpływa na procesy endocytozy (end), w których biorą również udział aneksyny; 10 — ATP reguluje procesy egzocytozy (egz).

kukurydzy okazały się zdolne do hydrolizy ATP. Warunki reakcji były odmienne od warunków wymaganych przez ATPazy transportujące kationy (Ca^{2+} -ATPaza, ATPaza mitochondrialna i ATPaza z błony wakuoli), zaś podobne do warunków optymalnych dla ATPazy miozynowej [33]. Aneksyny z komórek pomidora wykazują aktywność fosfodiesterazy nukleotydów o szerokiej specyficzności substratowej. Zaobserwowano, że po związaniu aneksyn przez fosfolipidy w obecności jonów wapnia, aktywność ta ulegała zahamowaniu [34]. Porównanie sekwencji aminokwasowych pewnych rejonów w cząsteczce aneksyn z odpowiednimi sekwencjami rejonów w cząsteczkach białek wiążących cAMP i transporterów błonowych (CFTR), odpowiedzialnych za wiązanie nukleotydów [16, 35], potwierdziło, że aneksyny są białkami wiążącymi nukleotydy. W badaniach z zastosowaniem fotoczułych i fluorescencyjnych pochodnych ATP wykazano, że niektóre aneksyny wiążą nukleotydy. Białka wiążące nukleotydy w obecności fotoczułej pochodnej ATP, 8-azydo- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, ulegają po naświetleniu UV kowalencyjnemu wyznako-

waniu. Pozwala to na autoradiograficzną identyfikację właściwych peptydów. W ten sposób zbadano oddziaływanie ATP z Na^+ , K^+ -ATPazą, cyklazą adenylową oraz zależną od kalmoduliny i Ca^{2+} kinazą białkową typu II [36-38], a także z aneksynami z wątroby wieprzowej [17]. W tym ostatnim przypadku okazało się, że znakowaniu ulega tylko aneksyna VI. Pochodna fluorescencyjna ATP, TNP-ATP, również wiązała się z tym białkiem [17]. TNP-ATP po wzbudzeniu światłem o długości fali 412 nm, charakteryzuje się widmem emisyjnym z maksimum przy długości fali 550 nm [39]. W obecności aneksyny VI intensywność fluorescencji TNP-ATP znacznie wzrosła, czemu towarzyszyło przesunięcie maksimum widma emisyjnego nukleotydu ku falom krótszym (535 nm) [17]. Podobnymi właściwościami odznaczają się ATPazy [31], transportery zależne od ATP [40, 41], kinazy białkowe [42] i F-aktyna [11]. Jest bardzo prawdopodobne, że ATP gra rolę ligandu, który *in vivo* wpływa na funkcje także aneksyny VI (Ryc. 3). Aneksyna VI po związaniu ATP zmienia swoje właściwości, jak wiązanie z fosfolipidami błonowymi i oddziaływa-

nie z F-aktyną [17, 27, 43, 44]. Jest ona wprawdzie białkiem wiążącym jony wapnia, ale różni się od białek, które zdolne są do odpowiedzi na zmiany stężenia Ca^{2+} w komórce w zakresie 0.1-1 μM , takich jak kalmodulina, izoformy kinazy białkowej C lub zależne od Ca^{2+} enzymy proteolityczne — kalpajny [24, 45, 46].

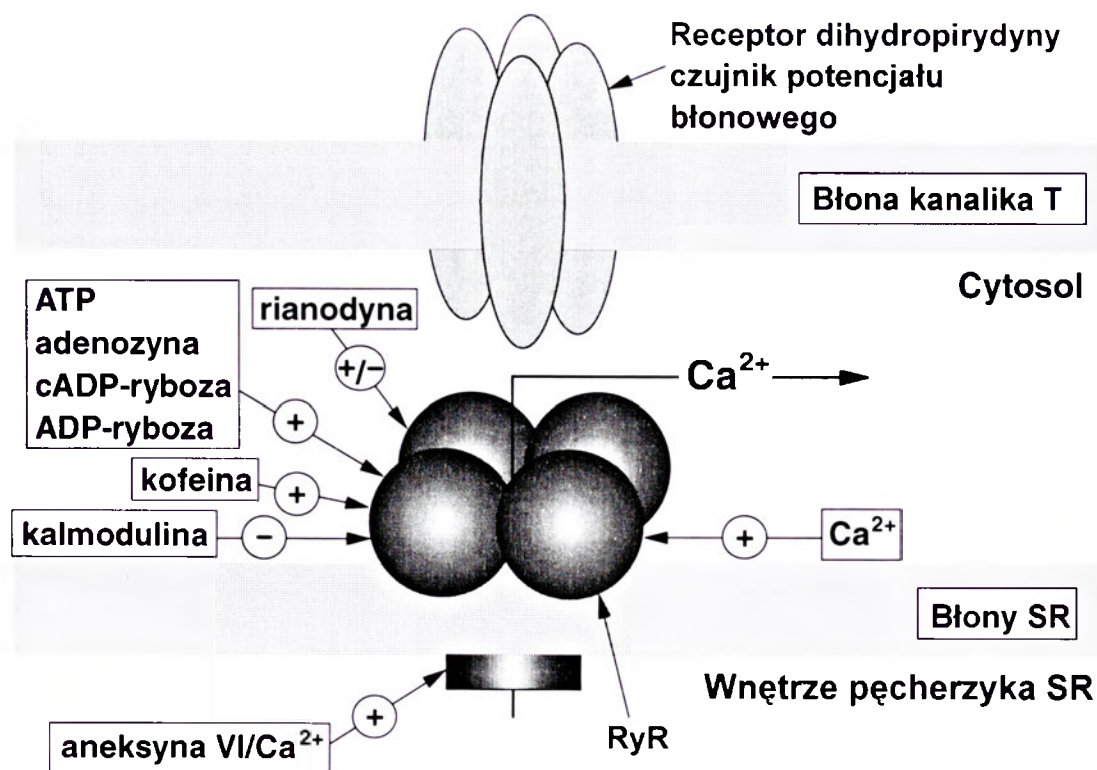
Wyniki badań wskazują, że oddziaływania aneksyny VI z ATP odgrywają ważną rolę w chondrocytach [47]. Komórki te pobierają jony wapnia i gromadzą je w specjalnych pęcherzykach wydzielniczych, biorących udział w mineralizacji tkanki łącznej. Z błoną pęcherzyków wydzielniczych wiążą się wewnątrz komórki cząsteczki kolagenów II i X, które w niepoznany dotąd sposób stymulują akumulację jonów wewnątrz pęcherzyków. Wiązanie kolagenów z błoną pęcherzyków jest modulowane przez aneksyny II, V i VI, występujące w dużych ilościach w chondrocytach [48, 49]. Komórki te wydzielają także ATP, który determinuje rodzaj związków mineralnych produkowanych przez te komórki [50]. Jeśli, jak wspomniano wcześniej, aneksyny tworzą kanały wapniowe oraz wiążą kolageny i kwaśne fosfolipidy, to można przypuszczać, że proces egzocytozy pęcherzyków wydzielniczych zawierających fosforany wapnia w chondrocytach, prowadzący do mineralizacji tkanki łącznej, regulowany jest, być może, przez aneksyny [47]. ATP z kolei miałby odgrywać rolę dodatkowego czynnika wpływającego na wiązanie aneksyn z białkami i kwaśnymi fosfolipidami [51].

IV. Kanały jonowe regulowane przez ATP

Przeżywalność komórek i regulacja ich podstawo-

wych funkcji zależą od ścisłej kontroli stężenia jonów wapnia w cytosolu [52, 53], w której biorą udział różne białka transportujące i regulatorowe. W komórkach niebudliwych, jak erytrocyty, hepatocyty i komórki nabłonkowe, obecne są układy transportujące Ca^{2+} zależne od IP_3 . W komórkach tych są obecne receptory o różnej strukturze i właściwościach. Jedne oddziałują z białkami G, inne zawierają domeny o aktywności kinazy tyrozynowej. Receptory związane z białkami G aktywują fosfolipazę PLC_β , zaś receptory o aktywności kinazy tyrozynowej aktywują fosfolipazę PLC_γ . Wymienione fosfolipazy katalizują rozpad fosfatydylo-inozytolo-4,5-bisfosforanu do IP_3 i diacyloglicerolu. IP_3 wiąże się z receptorem w błonach ER, który jest jednocześnie kanałem uwalniającym jony wapnia z błon ER do cytosolu [54, 55]. Ca^{2+} napływa do komórek niebudliwych przez kanały wapniowe niezależne od potencjału błonowego [55], zaś usuwany jest z cytosolu przez ATPazy transportujące Ca^{2+} , obecne w błonach ER [56] i błonie plazmatycznej [57]. W komórkach budliwych, jak neurony czy komórki mięśniowe, oprócz omówionych układów transportujących występują kanały wapniowe zależne od potencjału błonowego, dzięki którym następują duże zmiany stężenia wapnia w cytosolu. Jony wapnia napływające przez te kanały mogą bezpośrednio aktywować kanały uwalniające Ca^{2+} z błon SR [52, 55].

Wewnątrzkomórkowe kanały uwalniające jony wapnia występują również w błonach SR komórek mięśni szkieletowych (typ 1, RyR1) i mięśnia sercowego (typ 2, RyR2) [58]. Trzeci typ kanałów RyR (RyR3) [59] zlokalizowano w błonach ER komórek wątroby, nerek, płuc, żołądka i trzustki [60]. Kanały te od-



Ryc. 4. Czynniki modulujące aktywność kanału uwalniającego jony wapnia (RyR) z błon sarkoplazmatycznego retikulum. Plussem oznaczono stymulujący wpływ na aktywność kanału, a minusem hamowanie aktywności kanału.

powiedzialne są za wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie po stymulacji komórek (bodźce elektryczne, hormony, neurotransmitery lub inne) [61]. W komórkach mięśni szkieletowych kanał RyR1 jest otwierany prawdopodobnie dzięki elektro-mechanicznemu sprzężeniu białka kanałowego i receptora dihidropirydyny, występującego w błonie kanalika systemu T [62, 63]. Być może jednak działa jakiś inny, dotąd nie wykryty wtórny przekaźnik, który aktywuje kanał (ang. *Ca²⁺-influx factor, CIF*) [64].

Kanały RyR1 i RyR2 są heterotetramerami o m.c. 4×564 kDa [65-67]. Geny *RyR1* i *RyR2* zostały sklonowane, zaś białka kodowane przez te geny wykazują 66% wzajemnego podobieństwa [60]. Kanały te różnią się wrażliwością na działanie efektorów i powinowactwem w stosunku do roślinnego alkaloidu, rianodyny [65]. Po wbudowaniu receptorów do liposomów i ich aktywacji okazało się, że stają się one przepuszczalne dla jonów wapnia [65, 66]. Napływ jonów wapnia przez kanały RyR1 i RyR2 jest stymulowany od strony cytoplazmatycznej błon SR przez kofeinę, jony wapnia i ATP, a hamowany przez jony magnezu i czerwień rutenową [54, 55, 68]. ADP-ryboza, cADP-ryboza, i β -NAD aktywują wypływ jonów wapnia przez wymienione kanały [69] (Ryc. 4). Tylko jeden z poznanych ligandów wiąże się z kanałem RyR1 od strony światła pęcherzyków SR *in vitro*. Jest nim aneksyna VI [70]. Inne ligandy wiążą się do domen kanału eksponowanych po cytoplazmatycznej stronie błon SR [64, 69]. W cząsteczkach kanałów RyR1 i RyR2 występują miejsca wiążące Ca^{2+} i kalmodulinę oraz reszty aminokwasowe fosforylowane przez kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} /kalmoduliny i cAMP. W przypadku RyR2 fosforylacja białka przez kinazę zależną od cAMP aktywuje kanał [71], zaś w przypadku RyR1 hamuje transport Ca^{2+} [72]. Kalmodulina po związaniu z białkami kanałowymi RyR1 i RyR2, hamuje transport Ca^{2+} i zmniejsza prawdopodobieństwo otwarcia kanału [69, 73]. ATP wywołuje wzrost wypływu jonów wapnia z błon SR w komórkach mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego; w fizjologicznych stężeniach nukleotydu wzrasta prawdopodobieństwo otwarcia kanałów RyR1 i RyR2 [65, 74, 75]. Dodatkowo adenozylna i jej analogi aktywują RyR2 [76]. Rejon w pobliżu argininy 615 w cząsteczkach RyR1 i RyR2, odpowiedzialny za wiązanie ATP, jest homologiczny z miejscem wiążącym IP_3 w receptorze IP_3 [77].

Receptory IP_3 stanowią odrębną klasę wewnątrzkomórkowych kanałów uwalniających Ca^{2+} . Występują powszechnie w komórkach wszystkich typów [60, 63, 64]. Są homotetramerami o m.c. 4×315 kDa. Dwa rejonu cząsteczki receptora IP_3 , eksponowanej na stronę cytoplazmatyczną błony, wiążą przekaźniki drugiego rodzaju, dzięki czemu kanał uwalniający Ca^{2+} ulega otwarciu [63]. Receptor IP_3 kodowany jest przez cztery geny, co prowadzi do ekspresji zróżnicowanych izoform kanału [63]. Funkcję recep-

tora IP_3 reguluje właściwy ligand (IP_3) oraz kinazy białkowe zależne od cAMP, od Ca^{2+} /kalmoduliny i kinaza białkowa C [78-80]. Kanał może podlegać również autofosforylacji [81]. Jako najważniejsze modulatory kanału działają jony wapnia, wpływające zarówno od strony cytosolowej, jak i od strony światła kanalika błon ER [81]. Inny ważny ligand, ATP, wiąże się z dwoma miejscami w domenie cytosolowej białka, odpowiedzialnymi za przekazywanie zmian konformacyjnych w cząsteczce kanału po przyłączeniu IP_3 . Wiązanie nukleotydu z receptorem IP_3 zachodzi jednak w niższych stężeniach ATP niż występujące w cytosolu [79, 82, 83]. Fakt ten skłonił badaczy do wysunięcia hipotezy, że stężenie ATP w cytoplazmie spada w wyniku jego hydrolizy przez Ca^{2+} -ATPazę [79]. Ostatecznie stwierdzono, że wpływ ATP na receptor IP_3 jest bardziej złożony: w stężeniach poniżej 2 mM nukleotyd aktywuje kanał, zaś powyżej 4 mM hamuje [54].

Białkiem kanałowym zależnym od ATP jest także kanał transportujący Ca^{2+} i Na^+ w komórkach mięśni gładkich [84] oraz regulowane przez ATP kanały potasowe z błony plazmatycznej [85] i mitochondriów [86, 87]. Kanały K_{ATP} uważa się za odrębną klasę wśród innych kanałów potasowych, ze względu na ich właściwości fizykochemiczne oraz wrażliwość na związki farmakologicznie czynne. Kanały te zidentyfikowano w błonie plazmatycznej komórek mięśni sercowego, szkieletowych i gładkich, w komórkach β wysepek Langerhansa w trzustce oraz w błonie komórek nerwowych [88, 89]. Wewnątrzkomórkowy ATP w stężeniach fizjologicznych hamuje aktywność tych kanałów ($K_i < 70 \mu M$). Oddziaływanie ATP z białkiem kanałowym nie ma związku z procesami fosforylacji oraz hydrolizą nukleotydu. Inne nukleotydy, takie jak GDP i GTP, znoszą jego efekt. ADP w niskich stężeniach aktywuje transport K^+ , zaś w stężeniach $> 500 \mu M$ hamuje go, co można tłumaczyć obecnością dwóch miejsc wiążących nukleotydy w cząsteczce białka kanałowego [88, 89].

Kanałom K_{ATP} w błonie plazmatycznej przypisuje się udział w kontroli potencjału błonowego. Opisano to najlepiej w przypadku wydzielania insuliny w komórkach β . Wzrost poziomu glukozy we krwi prowadzi do wzrostu jej stężenia w tych komórkach i jednocześnie do wzrostu poziomu ATP. ATP, wiążąc się z kanałem K_{ATP} hamuje jego aktywność, co powoduje depolaryzację błony i wzrost potencjału błonowego z wartości -60 - -70 mV w stanie spoczynku do -30 mV. Wzrost ten aktywuje zależne od potencjału błonowego kanały wapniowe, wywołując napływ Ca^{2+} do komórki, wzmożoną fosforylację określonych białek, przesuwanie się pęcherzyków zawierających insulinę i jej wydzielanie w procesie egzocytozy na zewnątrz komórki [90]. Kanały K_{ATP} odgrywają podobną rolę w wydzielaniu niektórych neurotransmiterów i hormonów przysadki mózgowej [85], zaś w komórkach mięśnia sercowego wpływają na czas trwania potencjału czyn-

nościowego [91].

Kanały K_{ATP} zostały również zidentyfikowane w wewnętrznej błonie mitochondriów komórek wątroby i mięśnia sercowego oraz w komórkach drożdży [92-95]. Mitochondrialny kanał K_{ATP} jest hamowany przez ATP (IC_{50} 0,8 mM), a nie jest hamowany przez ADP [92]. GTP i GDP aktywują kanał w obecności 0,5 mM ATP, przypuszcza się więc, że w regulacji aktywności kanału biorą również udział nukleotydy guaninowe [96]. Mitochondrialnym kanałom K_{ATP} przypisuje się podwójną rolę: regulacji poziomu K^+ w matriks, co kontroluje ciśnienie osmotyczne wewnątrz mitochondriów, oraz regulacji objętości mitochondriów [97], co wpływa na ich metabolizm [98] i tworzenie siły protonomotorycznej [99]. Może to tłumaczyć zaangażowanie mitochondrialnych kanałów K_{ATP} w procesach zależnych od potencjału transmembranowego, jak uniport Ca^{2+} i transport nukleotydów adeninowych oraz w procesach zależnych od ΔpH , jak transport fosforanu i pirogronianu [86, 87].

V. Aktyna, heksokinaza i białka pokrewne białkom szoku termicznego

Niektóre białka wiążące ATP katalizują wprawdzie reakcję hydrolizy ATP, ale wiązanie nukleotydów wywołuje w ich cząsteczkach dodatkowo funkcjonalne zmiany konformacyjne. Aktyna jest typowym przykładem takiego białka. Aktyna wiąże jedną cząsteczkę ATP lub ADP, zawiera jedno miejsce wiążące Mg^{2+} lub Ca^{2+} z wysokim powinowactwem oraz szereg miejsc wiążących kationy dwuwartościowe z niskim powinowactwem [93, 94]. Tworzeniu się filamentów aktynowych towarzyszy hydroliza ATP [93, 100, 101]. Polimeryzacja monomerycznej aktyny jest kontrolowana przez wyspecjalizowane białka wiążące aktynę. Te zaś regulowane są przez sygnały docierające z błony plazmatycznej, na skutek pobudzenia określonych receptorów błonowych i zainicjowania całej kaskady zdarzeń wewnątrzkomórkowych [1, 93]. Aktyna oddziałuje również z wieloma innymi białkami jak miozyna, żelzolina, profilina lub kaldesmon [102].

W cząsteczce aktyny występuje charakterystyczne zwinięcie struktury trzeciorzędowej odpowiedzialne za wiązanie nukleotydów. W obecności Ca^{2+} lub Mg^{2+} następuje przeniesienie grupy fosforanowej ATP na grupę hydroksylową odpowiedniej reszty aminokwasowej. Struktura odpowiedzialna za wiązanie nukleotydów składa się z dwóch subdomen α i β . Subdomeny te mają skomplikowaną strukturę, na którą składają się α -heliksy otaczające łańcuchy peptydowe przyjmujące konformację β -zgięcia. Pomiedzy subdomenami znajduje się hydrofobowa kieszeń, gdzie wiążą się grupy adeninowe ATP lub ADP [1, 94], podczas gdy określona sekwencja w subdomenie α odgrywa rolę w wiązaniu grup fosforanowych nukleotydu [1, 94].

Występowanie takiej jak w aktynie struktury trzeciorzędowej wiążącej nukleotydy stwierdzono nie tyl-

ko w białkach biorących udział w skurczu mięśni, ale także w glikolizie i translokacji białek przez błony [1, 93]. Podobne pod względem mechanizmu wiązania nukleotydów co aktyna, są: białka szoku termicznego i pokrewne im białka towarzyszące (np. Hsc70), uczestniczące w procesach przywracania właściwej struktury białkom po szoku termicznym, tworzenia złożonych kompleksów białek oligomerycznych, a także w translokacji białek przez błony w czasie ich syntezy oraz w utrzymywaniu ich natywnej konformacji [103]. Białko Hsc70 wiąże się z innymi polipeptydami przed przyjęciem przez nie właściwej konformacji [104]. Białko to wiąże ATP i katalizuje hydrolizę nukleotydu w obecności tzw. białkowych czynników wymieniających nukleotydy. Białka te stymulują aktywność hydrolityczną Hsc70 i powodują dysocjację kompleksu Hsc70/nukleotyd/inny polipeptyd. Zarówno aktyna, jak i białko Hsc70 przypominają heksokinazę, a także kinazę glicerolową pod względem budowy domeny wiążącej nukleotydy [105]. Przypuszcza się, że „przodkiem” tej grupy białek był polipeptyd posiadający tylko jedną domenę, o strukturze heksokinazy w stanie rozplecionym, charakteryzujący się niewielkim powinowactwem w stosunku do ATP. W wyniku zaś duplikacji genu i fuzji doszło do powstania dimerycznej cząsteczki posiadającej dwie subdomeny, dzięki czemu wiązanie ATP stało się bardziej efektywne [1, 18].

VI. Podsumowanie

Do opublikowania pracy Johna Walkera i w s p . w *EMBO Journal* [7] na temat podobieństw struktury pierwszorzędowej białek wiążących ATP minęło piętnaście lat i, co zrozumiale, poglądy badaczy na ten temat uległy znacznej ewolucji. Stwierdzono przede wszystkim, że istnieją białka wewnątrzkomórkowe, które wprawdzie wiążą nukleotydy adeninowe, ale ich nie hydrolizują. Oprócz klasycznego spojrzenia na ATP jako na nośnik energii niezbędny w procesach metabolicznych i transporcie [106], pojawiły się poglądy przypisujące ATP rolę wtórnego przekaźnika informacji [4-6] lub fizjologicznego ligandu modulującego funkcję białek [9, 16, 17, 92], czemu poświęcony jest również niniejszy artykuł przeglądowy. W miarę wzrostu liczby dostępnych informacji na temat struktury białek i kodujących je genów okazało się, że motyw Walkera A i B występuje wprawdzie bardzo powszechnie, ale w różnych białkach znaleziono co najmniej osiem innych, powtarzających się sekwencji aminokwasowych, które są odpowiedzialne za wiązanie nukleotydów [9]. W dodatku, nie tylko niewielkie odcinki łańcucha polipeptydowego o zachowanej w trakcie ewolucji sekwencji aminokwasowej, ale całe moduły czy domeny o określonej, również zachowanej ewolucyjnie, strukturze trzecio- i czwartorzędowej, odgrywają istotną rolę w wiązaniu nukleotydów [8]. W literaturze przedmiotu moduły te określane są jako „molekularne przełączniki” [107, 108], gdyż ich zna-

czenie dla pełnionej przez białko funkcji jest podstawowe. Zatem badania struktury białek w oparciu o metody krystalograficzne, biologii molekularnej i inne, mogą w przyszłości zaowocować nie tylko określeniem budowy nowych miejsc wiążących nukleotydy w cząsteczce białka i opisaniem mechanizmu ich działania, ale przede wszystkim przypisaniem właściwej funkcji tym białkom.

Podziękowanie

Praca dofinansowana z grantu KBN 4 P05A 065 08.

Artykuł otrzymano 10 marca 1997 r.

Zaakceptowano do druku 1 kwietnia 1997 r.

Piśmiennictwo

- Holmes KC, Sander C, Valencia A (1993) *Trends Cell Biol* 3: 53-59
- Lehninger AL (1965) *Bioenergetics. The molecular basis of biological energy transformation*. WA Benjamin, Inc, New York, Amsterdam
- Zubay G (1993): *Biochemistry*. Wm C Brown Publishers; Dubuque, Iowa, Melbourne, Australia, Oxford, England
- Zimmermann H (1994) *Trends Neurosci Sci* 17: 420-426
- Edwards FA (1994) *Curr Opin Neurobiol* 4: 347-352
- Conigrave AD, Jiang L (1995) *Cell Calcium* 17: 111-119
- Walker J E, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) *EMBO J* 1: 945-951
- Schultz GE (1992) *Curr Opin Struct Biol* 2: 61-67
- Traut TW (1994) *Eur J Biochem* 222: 9-19
- Aprille JR (1993) *J Bioenerg Biomembr* 25: 473-481
- Hambly BD, Kiessling P, dos Remedios CG (1994) *Adv Exp Med Biol* 358: 25-34
- Inoue I, Higuti T (1994) W: Peracchia DC (red) *Handbook of Membrane Channels: Molecular and Cellular Physiology*. Academic Press, San Diego, CA, str 549-554
- van Kuijk M A, van Aabel RA, Busch AE, Lang F, Russel FG, Bindels RJ, van Os CH, Deen PM (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5401-5406
- Al-Awqati Q (1995) *Science* 269: 805-806
- Laham LE, Way M, Yin HL, Janmey PA (1995) *Eur J Biochem* 234: 1-7
- Cohen BE, Lee G, Arispe N, Pollard HB (1995) *FEBS Lett* 377: 444-450
- Bandorowicz-Pikuła J, Awasthi YC (1997) *FEBS Lett* (w druku)
- Kabsch W, Holmes KC (1995) *FASEB J* 9: 167-174
- Kabsch W, Manneherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC (1990) *Nature (Lond)* 347: 37-44
- Flaherty KM, DeLuca-Flaherty G, McKay DB (1990) *Nature (Lond)* 346: 623-628
- Bandorowicz J, Pikuła S (1993) *Acta Biochim Polon* 40: 281-293
- Raynal P, Pollard HB (1994) *Biochim Biophys Acta* 1197: 63-93
- Bandorowicz-Pikuła J (1996) *Post Biol Kom* 23: 151-167
- Swairjo MA, Seaton BA (1994) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 193-213
- Kaetzel MA, Dedman JR (1995) *News Physiol Sci* 10: 171-176
- Sobota A, Bandorowicz J, Jezierski A, Sikorski AF (1993) *FEBS Lett* 315: 178-182
- Bandorowicz-Pikuła J, Sikorski AF, Białkowska K, Sobota A (1997) *Mol Membr Biol* 13: 241-250
- Pikuła S, Bandorowicz-Pikuła J (1996) *Cell Mol Biol Lett* 1: 119-128
- Bianchi R, Giambanco I, Ceccarelli P, Paula G, Donato R (1992) *FEBS Lett* 296: 158-162
- Wang L, Iida H, Shibata Y (1993) *Cardiovasc Res* 27: 1855-1862
- Tagoe CE, Boustead CM, Higgins SJ, Walker JH (1994) *Biochim Biophys Acta* 1192: 272-280
- Burgoyne RD, Geisow MJ (1989) *Cell Calcium* 10: 1-10
- McClung AD, Carroll D, Battey NH (1994) *Biochem J* 303: 709-712
- Calvert CM, Gant SJ, Bowles DJ (1996) *Plant Cell* 8: 333-342
- Chap H, Fauvel J, Gassama-Diagne A, Ragab-Thomas J, Simon M (1991) *Med Sci* 7: 8-9
- Churn SB, Sankaran B, Haley BE, DeLorenzo RJ (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 193: 934-940
- Castets F, Baillat G, Mirzoeva S, Mabrouk K, Garin J, d'Alayer J, Monneron A (1994) *Biochemistry* 33: 5063-5069
- Tran ChM, Farley RA (1996) *Biochemistry* 35: 47-55
- Thomas PJ, Pedersen PL (1993) *J Bioenerg Biomembr* 25: 11-19
- Baubichon-Cortay H, Baggetto LG, Dayan G, Di Pietro A (1994) *J Biol Chem* 269: 22983-22989
- Pikuła S, Hayden JB, Awasthi S, Awasthi YC, Zimniak P (1994) *J Biol Chem* 269: 27566-27573
- Cheng K, Koland JG (1996) *J Biol Chem* 271: 311-318
- Bandorowicz J, Pikuła S, Sobota A (1992) *Biochim Biophys Acta* 1105: 201-206
- Bandorowicz-Pikuła J, Sobota A (1996) *Cell Mol Biol Lett* 1: 17-23
- Bandorowicz-Pikuła J (1995) *Post Biochem* 41: 247-257
- Celio MR, Pauls T, Schwaller B (red) (1996) *Guide to the calcium-binding proteins*. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press, Oxford
- Wuthier RE (1993) *J Nutr* 123 (2 suppl): 301-309
- Kirsch T, Wuthier RE (1994) *J Biol Chem* 269: 11462-11469
- Wu LN, Yoshimori T, Genge BR, Sauer GR, Kirsch T, Ishikawa Y, Wuthier RE (1993) *J Biol Chem* 268: 25084-25089
- Hatori M, Teixeira CC, Debolt K, Pacifici M, Shapiro IM (1995) *J Cell Physiol* 165: 468-474
- Wu LN, Ishikawa Y, Sauer GR, Genge BR, Mwale F, Mishima H, Wuthier RE (1995) *J Cell Biochem* 57: 218-237
- Makowska A, Duszyński J (1996) *Post Biochem* 42: 146-153
- Petersen OH (1996) *News Physiol Sci* 11: 13-17
- Ehrlich BE, Kaftan E, Bezprozvanny S, Bezprozvannaya I (1994) *Trends Pharmacol Sci* 15: 145-149
- Clapham DE (1995) *Cell* 80: 259-268
- Pikuła S (1997) *Kosmos* (w druku)
- Carafoli E (1994) *FASEB J* 8: 993-1002
- Fleischer S, Inui M (1989) *Annu Rev Biophys Chem* 18: 333-364
- Giannini G, Clementi E, Ceci R, Marziali G, Sorrentino V (1992) *Science* 257: 91-94
- Sorrentino V, Volpe P (1993) *Trends Pharmacol Sci* 14: 98-103
- Berridge MJ (1993) *Nature (Lond)* 361: 315-325
- Tanabe T, Beam KG, Adams BA, Niidome T, Numa S (1990) *Nature (Lond)* 346: 567-569
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994) *Physiol Rev* 74: 595-636
- Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T (1994) *Trends Pharmacol Sci* 15: 77-83
- Henderson JS, Meissner G (1987) *J Biol Chem* 262: 3065-3073
- Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Lin Q-Y, Meissner G (1988) *Nature (Lond)* 331: 315-319
- Ogawa Y (1994) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29: 229-274
- Petersen OH, Petersen CCH, Kasai H (1994) *Annu Rev Physiol* 56: 297-319
- Sitsapesan R, McGarry J, Williams AJ (1995) *Trends Pharmacol Sci* 16: 386-391
- Diaz-Muñoz M, Hamilton SL, Kaetzel MA, Hazarika P, Dedman JR (1990) *J Biol Chem* 265: 15894-15899

Zmiany w domenie regulatorowej główki miozyny obserwowane w niektórych chorobach serca

Changes in the regulatory domain of myosin head observed in some heart diseases

ANNA MOCZARSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Kardiomiopatia rozstrzeniowa o nieznanym pochodzeniu (IDC) i lekkie łańcuchy regulujące miozyny
- III. Lekkie łańcuchy istotne miozyny, a niektóre wrodzone wady serca
- IV. „Ogłuszony” mięsień sercowy, a zmiany w domenie regulatorowej główki miozyny
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: LC1 — lekki łańcuch istotny miozyny-izofорма dłuższa; LC3 — lekki łańcuch istotny miozyny - izofорма krótsza; LC2 — lekki łańcuch regulujący miozyny; IDC — kardiomiopatia rozstrzeniowa o nieznanym pochodzeniu; ALC1 — lekki łańcuch istotny miozyny-izofорма występująca w przedsionku serca; VLC1 — lekki łańcuch istotny miozyny-izofорма występująca w komorze serca.

I. Wstęp

W wielu chorobach serca zaburzenia jego funkcji skurczowej połączone są ze zmianami w aparacie kurczliwym. Badania prowadzone w różnych ośrodkach na świecie wykazały, że jednym z białek podlegających tym zmianom jest miozyna — podstawowy składnik filamentu grubego.

Miozyna zbudowana jest z 6 łańcuchów polipeptydowych wśród których wyróżnia się dwa łańcuchy ciężkie tworzące pałeczkę i dwie główki w ich N-końcowej części, oraz połączone niekowalencyjnie ze strukturą główki dwa rodzaje lekkich łańcuchów [1-3]. Główki miozyny zawierają miejsce wiązania nukleotydu oraz aktyny, a zatem spełniają warunki niezbędne do generowania ruchu. Badania krystalicznej struktury główki miozyny uzyskanej z mięśnia szkieletowego kurczęcia [4, 5] pozwoliły wyróżnić w niej dwie domeny: motoryczną z centrum katalitycznym i miejscem wiązania aktyny, oraz domenę regulatorową zawierającą dwa lekkie łańcuchy miozyny:

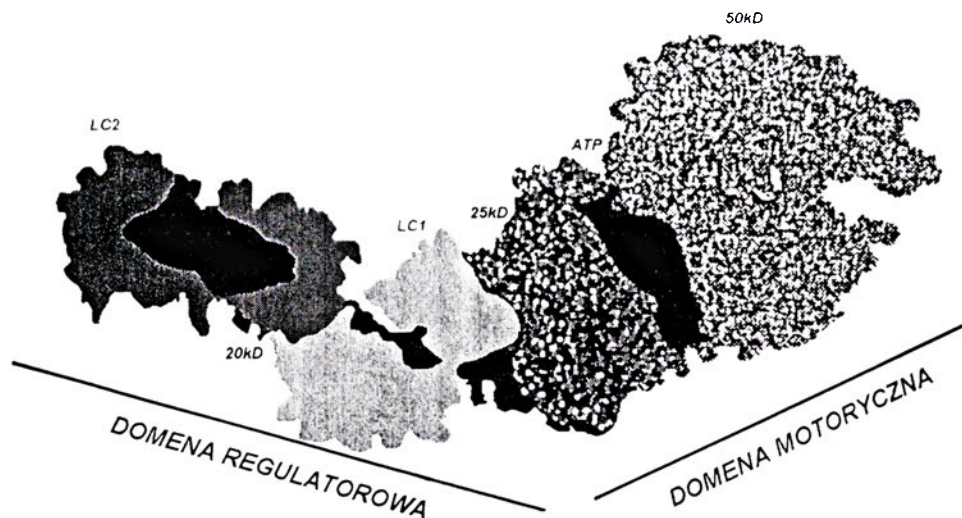
Contents:

- I. Introduction
- II. Idiopathic Dilated Cardiomyopathy (IDC) and myosin regulatory light chains
- III. Myosin essential light chains and some congenital heart diseases
- IV. “Stunned” myocardium and changes in the regulatory domain of myosin head
- V. Summary

łańcuch istotny (LC1) i regulujący (LC2) (Ryc. 1). Łańcuch regulujący ulega fosforylacji przez zależną od kalmoduliny i wapnia kinazę lekkich łańcuchów miozyny, a także wiąże jony wapnia lub magnezu [6, 7]. Wymienione procesy zmieniają konformację tego białka, co być może, wpływa na strukturę całej główki miozynowej i jej oddziaływanie z aktyną w procesie skurczu [8]. Umieszczenie obu lekkich łańcuchów w domenie regulatorowej główki pozwala sądzić, że ich główną funkcją jest stabilizowanie α -heliksu ciężkiego łańcucha i wzmacnianie efektów zmian konformacyjnych wynikających z procesów wiązania i uwalniania nukleotydu [5]. Hipotezy oparte na modelu struktury główki miozyny zakładają, że zmiany konformacyjne zachodzące w domenie motorycznej, a związane z procesami wiązania i hydrolizy ATP, przenoszone są do domeny regulatorowej główki miozynowej. Pewną rolę w tym procesie odgrywa lekki łańcuch istotny [9]. Jednocześnie, w obrębie domeny regulatorowej wymiana jonów magnezu na wapń w łańcuchu regulującym i fosforylacja tego łańcucha mają wpływ na oddziaływanie główki miozyny z aktyną. Zjawiska te mogą ulec zaburzeniu gdy jeden lub oba lekkie łańcuchy zostaną uszkodzone lub zmodyfikowane [10].

Dotychczasowe wyniki badań miozyny, uzyskanej z serc z różnymi wadami rozwojowymi, lub też zmienionych w wyniku innych chorób układu naczyniowego, wskazują, że domena regulatorowa główki miozyny, a w szczególności jej komponenty — lekki łańcuch istotny i łańcuch regulujący, pełnią ważną rolę w regulowaniu oddziaływania miozyny z aktyną, a zatem funkcji skurczowej mięśnia sercowego, która w warunkach choroby ulega często istotnym zmianom.

* Dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biochemii Mięśni Pasteura 3, 02-093 Warszawa



Ryc. 1. Schemat struktury główki miozyny przygotowany w oparciu o model Raymenta i wsp. [4, 5].

II. Kardiomiopatia rozstrzeniowa o nieznanym pochodzeniu (IDC) i lekkie łańcuchy regulujące miozyny

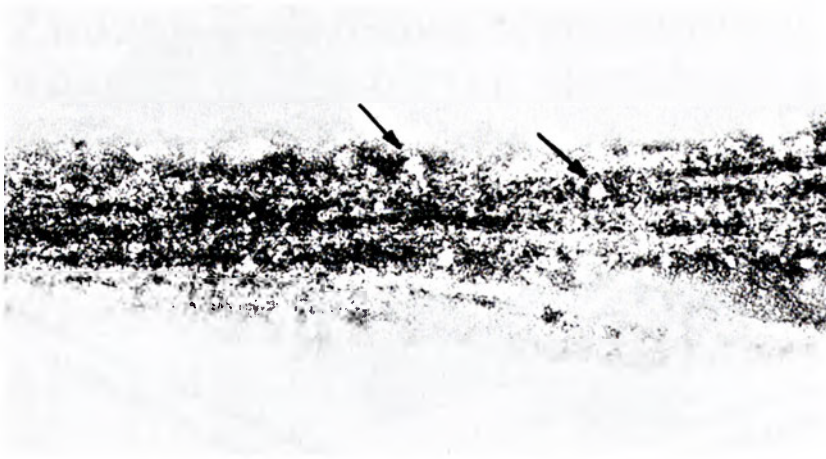
Lekkie łańcuchy miozyny — szczególnie łańcuch regulujący (LC2) są bardzo wrażliwe na obecność enzymów proteolitycznych. Badania miozyny uzyskanej z serc pacjentów cierpiących na kardiomiopatię rozstrzeniową o nieznanym pochodzeniu (*idiopathic dilated cardiomyopathy* — IDC) wykazały istotną redukcję zawartości jej lekkich łańcuchów regulujących.

IDC jest chorobą o nieznanym dotąd etiologii [11, 12]. Preparaty histologiczne chorych serc wykazują rozlane zwłóknienia i w niektórych przypadkach ogniskowe blizny [13]. W przeciwieństwie do kardiomiopatii hipertroficzej, w której nie ma uderzających zmian w strukturze i aktywności białek kurczliwych [14], w sercach IDC obserwuje się spadek zawartości miofibryli w miocytach [15, 16], a także obniżenie aktywności miofibrylarnej ATPazy [17, 18]. Postęp choroby od początku zaobserwowania jej objawów do krańcowego zniszczenia mięśnia sercowego jest u wielu pacjentów zróżnicowany. W pewnych przypadkach trwa to miesiące w innych lata z tymi samymi końcowymi objawami poważnego uszkodzenia serca [19].

Analiza zawartości lekkich łańcuchów istotnych i regulujących w miozynie uzyskanej z serc pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową i w miozynie serc kontrolnych wykazała istotne różnice. W zdrowym sercu stosunek LC1/LC2 wynosi 1:1, w sercach pacjentów z IDC proporcje tych łańcuchów były wyraźnie zmienione i wynosiły od 1:0.69 do 1:0.1. Zaobserwowano również całkowitą degradację LC2 [20]. Badania mikroskopowe filamentów syntetycznych wykazały, że redukcja zawartości lekkich łańcuchów regulujących miozyny pochodzącej z serc miopatycznych, prowadzi do tworzenia się nieprawidłowych tzw. „karłowatych” filamentów o guzowatych tępych końcach. Syntetyczne filamente formowane z miozyny uzyskanej z kontrolnego mięśnia sercowego człowieka mają długość wahającą się w granicach 0.7-2.0 μm .

Filamenty formowane z miozyny mięśnia sercowego pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową są zdecydowanie krótsze i grubsze od tych prawidłowych. Ich długość wynosi od 0.35 do 0.5 μm [20]. Jest interesujące, że podobne zaburzenia struktury syntetycznych filamentów obserwuje się też w miozynie pochodzącej z serc kontrolnych po skróceniu jej lekkich łańcuchów regulujących jedynie o N-końcowy fragment [21]. Obecność zgrubień na powierzchni filamentu wskazuje na możliwość zlepiania się główek miozynowych (Ryc. 2). Jest prawdopodobne, że zmiany struktury miofilamentów powstałe w następstwie całkowitej lub tylko częściowej degradacji łańcuchów regulujących mogą być ostatecznie przyczyną zmienionych właściwości kurczliwych serca.

Dalsze badania miozyny uzyskanej z serc pacjentów cierpiących na kardiomiopatię rozstrzeniową wykazały, że obserwowana tu znaczna redukcja zawartości lekkich łańcuchów regulujących spowodowana jest obecnością proteazy, która być może w czasie choroby syntetyzowana jest *de novo* lub też aktywowana z jej nieaktywnej formy obecnej wcześniej w tkance. Wzmoczone działanie proteazy nie zostało ostatecznie wyjaśnione i pozostaje kwestią sporną. Jednak możliwość jej aktywacji wydaje się być bardzo prawdopodobną, ponieważ niewielkie ilości tego enzymu wykryto w preparatach serc kontrolnych [20]. W sercach IDC jego aktywność wzrastała 3-5 razy. Omawiana proteaza charakteryzuje się wysoką specyficznością w stosunku do LC2 miozyny serca ludzkiego. Jej inkubacja z miozyną z mięśnia sercowego psa czy też z mięśni szkieletowych królika powoduje niewielkie tylko uszkodzenie lekkich łańcuchów regulujących, natomiast w miozynie z serca ludzkiego łańcuchy te ulegają całkowitej degradacji [20]. Zatem, bez względu na to jaki mechanizm odpowiedzialny jest za zwiększoną aktywność proteazy w sercach IDC, jej pojawianie się może stanowić krytyczny etap w rozwoju choroby prowadzący ostatecznie do degradacji lekkich łańcuchów regulujących miozyny. Obserwowany w kardiomiopatii rozstrzeniowej defekt w domenie regulatorowej główki miozyny jest także przyczyną spadku jej aktyw-



Ryc. 2. Syntetyczne filamenty formowane z miozyny z mięśnia sercowego królika, w której działaniem chymotrypsyny skrócono lekki łańcuch regulujący. Strzałki pokazują charakterystyczne zgrubienia będące wynikiem zlepiania się główek miozynowych [21].

ności enzymatycznej, co przejawia się obniżeniem szybkości wiązania i hydrolizy ATP, a także spadkiem powinowactwa do aktyny [20]. Należy przypuszczać, że obecność nienaruszonych lekkich łańcuchów regulujących niezbędna jest dla formowania prawidłowych filamentów oraz stabilizacji struktury główek miozynowych. Ich brak obserwowany w IDC może być przyczyną destabilizacji sarkomeru, co ostatecznie doprowadzi do załamania się funkcji skurczowej mięśnia sercowego.

III. Lekkie łańcuchy istotne miozyny a niektóre wrodzone wady serca

Innym elementem domeny regulatorowej główki

LC1	P K K N V K K P A A	10	A A A P A P K A P A	20	P A P A P A P A P K	30
LC3						
LC1	E E K I D L S A I K	40	I E F S K E Q Q D E	50	F K E A F L L Y D R	60
LC3			S F S A D Q I A E		F K E A F L L Y D R	
LC1	T G D S K I T L S Q	70	V G D V L R A L G T	80	N P T N A E V K K V	90
LC3	T G D S K I T L S Q		V G D V L R A L G T		N P T N A E V K K V	
LC1	L G N P S D E Q M N	100	A K K I E F E Q F L	110	P M L Q A I S N N K	120
LC3	L G N P S D E Q M N		A K K I E F E Q F L		P M L Q A I S N N K	
LC1	D Q G T Y E D F V E	130	G L R V F D K E G D	140	T V G M G A E L R H	150
LC3	D Q G T Y E D F V E		G L R V F D K E G D		T V G M G A E L R H	
LC1	V L A T L G E K M K	160	E E E V E A L M A G	170	Q E D S N G C I N Y	180
LC3	V L A T L G E K M K		E E E V E A L M A G		Q E D S N G C I N Y	
LC1	E A F V K H I M S I	190				
LC3	E A F V K H I M S I					

Ryc. 3. Sekwencje aminokwasowe izoformy dłuższej (LC1) i krótszej (LC3) lekkich łańcuchów istotnych miozyny mięśnia szkieletowego szybkiego królika (wg bazy danych SWISS-PROT).

		10		20		30
ALC1	A P K K P E P K K E		A A K P A P A P A P		A P A P A P A P A P	
VLC1	A P K K P E P K K D		D A K A A P K A A P		A P A P P P E P E R	
		40		50		60
ALC1	E A P K E P A F D P		K S V K I D F T A D		Q I E E F K E A F S	
VLC1	P K E V E F D A S K		I K I E F T P E Q I		E E F K E A F M L F	
		70		80		90
ALC1	L F D R T P T G E M		K I T Y G Q C G D V		L R A L G Q N P T N	
VLC1	D R T P K C E M K I		T Y G Q C G D V L R		A L G Q N P T Q A E	
		100		110		120
ALC1	A E V L R V L G K P		K P E E M N V K M L		D F E T F L P I L Q	
VLC1	V L R V L G K P R Q		E E L N T K M M D F		E T F L P M L Q H I	
		130		140		150
ALC1	H I S R N K E Q G T		Y E D F V E G L R V		F D K E S N G T V M	
VLC1	S K N K D T G T Y E		D F V E G L R V F D		K E G N G T V M G A	
		160		170		180
ALC1	G A E L R H V L A T		L G E K M T E A E V		E Q L L A G Q E D A	
VLC1	E L R H V L A T L G		E R L T E D E V E K		L M A G Q E D S N G	
		190		196		
ALC1	N G C I N Y E A F V		K H I M S G			
VLC1	C I N Y E A F V K H		I M S S			

Ryc. 4. Sekwencje aminokwasowe izoformy przedsionkowej (ALC1) i komorowej (VLC1) lekkich łańcuchów istotnych miozyny mięśnia sercowego człowieka (wg bazy danych SWISS-PROT).

N-koniec lekkiego łańcucha istotnego może uczestniczyć w oddziaływaniach miozyny z aktyną [26, 27]. Jego rola w tym procesie nie została ostatecznie poznana. Badania kurczliwości włókien izolowanych z mięśnia szkieletowego oraz analiza ruchliwości *in vitro* wykazały, że utrata przez izoformę LC1 jej N-końcowego fragmentu przyczynia się do wzrostu maksymalnej szybkości skracania się włókien i ruchu filamentów [28-31]. Inne wyniki badań sugerują też, że w szybkim mięśniu szkieletowym oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowanym bogatym w prolinę N-końcem LC1 i ujemnie naładowanymi resztami na powierzchni aktyny są przyczyną wolniejszego ruchu filamentów [32]. Morano i w s p. [33] przeprowadzili badania z zastosowaniem syntetycznego peptydu odpowiednika N-końcowego fragmentu lekkiego łańcucha istotnego miozyny komory mięśnia sercowego człowieka. Peptyd ten zawierał reszty aminokwasowe 5-14 i wiązał się do C-końca aktyny, uniemożliwiając w ten sposób oddziaływanie N-końcowego fragmentu natywnego lekkiego łańcucha z aktyną. Oddziaływania takie blokowano również stosując przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko N-końcowemu fragmentowi natywnego lekkiego łańcucha istotnego miozyny. W obu przypadkach zaobserwowano wzrost kurczliwości włókien mięśnia sercowego. Wysłunięto zatem wniosek, że oddziaływania lekkiego łańcucha istotnego z aktyną lub brak takich oddziaływn mogą w istotny sposób regulować produkcję siły, a przez to kurczliwość serca. Hipotezę

te potwierdziły wyniki dalszych badań, w których wykazano wzrost ekspresji przedsionkowych form lekkich łańcuchów istotnych miozyny w komorach pacjentów cierpiących na pewne wrodzone wady serca.

Mięsień sercowy zawiera izoenzymy miozyny wykazujące różne poziomy aktywności ATPazowej. Ekspresja określonej izoformy jest związana z kurczliwością mięśnia i jego energetycznym zachowaniem [34]. Proporcje izoenzymów w poszczególnych częściach serca zmieniają się w zależności od wieku, stanów patologicznych i regulowane są na poziomie transkrypcji. Miocyty przedsionka i komory serca mogą adaptować się do zmienionych warunków zwiększonego mechanicznego obciążenia przez zmianę wzoru izoform ciężkich i lekkich łańcuchów w tych częściach serca. Podczas rozwoju płodowego w prawidłowo rozwijającym się mięśniu sercowym człowieka zarówno w przedsionkach jak i w komorach serca występują przedsionkowe formy lekkich łańcuchów istotnych miozyny (ALC1). Pierwotne sercowe komory pojawiają się już w pierwszych kilku tygodniach życia płodowego i funkcjonują w nieobecności kontroli układu nerwowego. Sugeruje się, że pewną rolę w determinowaniu typu syntetyzowanych lekkich łańcuchów w rozwijających się komorach serca mogą odgrywać zróżnicowane gradienty ciśnienia [24]. Wkrótce po urodzeniu zawartość przedsionkowych form LC1 w komorach stopniowo obniża się do niewykrywalnych poziomów, a na ich miejsce pojawiają się właściwe formy komorowe, obserwowane tam przez całe

Tabela 1.

Podstawowe cechy analizowanych wrodzonych wad serca

Rodzaj wady serca	Podstawowe cechy choroby
Czwórzespół Fallota	<ul style="list-style-type: none"> ● zwężenie ujścia tętnicy płucnej ● ubytek przegrody międzykomorowej ● przesunięcie w prawo tętnicy głównej ● przerost prawej komory (zjawisko wtórne)
Zwężenie podzastawkowe prawego ujścia tętniczego	<ul style="list-style-type: none"> ● rozlany masywny przerost mięśnia drogi odpływu prawej komory (zwężenie stożka komory) lub obecność okrężnego pierścienia włóknistego lub mięśniowego w odległości około 1 cm przed zastawką tętnicy płucnej
Odejsięcie obu dużych tętnic z prawej komory serca	<ul style="list-style-type: none"> ● tętnica płucna umiejscowiona jest prawidłowo a przemieszczona aorta znajduje się po prawej stronie tętnicy płucnej ● zastawki obu tętnic leżą na tym samym poziomie ● ubytek w przegrodzie międzykomorowej stanowi jedyną drogę odpływu krwi z lewej komory serca ● możliwa obecność zwężenia ujścia tętnicy płucnej

dalsze życie [24, 35, 36]. U pacjentów z niektórymi wrodzonymi wadami serca takimi jak: czwórzespół Fallota; podzastawkowe zwężenie prawego ujścia tętniczego, czy też odejsięcie obu dużych tętnic z prawej komory serca (Tab. 1), proces ten przebiega odmiennie. Tu bowiem związany z rozwojem zanik form przedsionkowych LC1 w komorach serca jest znacznie spowolniony i u dorosłych pacjentów oprócz komorowych form lekkich łańcuchów istotnych występują także formy przedsionkowe [35-37], których zawartość nie przekracza jednak 30% całkowitej ilości lekkich łańcuchów istotnych w miozynie komór serca. Spowolnienie procesu zaniku ekspresji przedsionkowych form łańcuchów istotnych miozyny w komorach serc dotkniętych wrodzoną wadą, tłumaczy się obciążeniem wywołanym przez wysokie ciśnienie krwi spowodowane utrudnionym jej odpływem z prawej komory serca, oraz rozwojem prawokomorowej hipertrofii, która jest zjawiskiem wtórnym we wszystkich wyżej wymienionych wadach serca. Podobnie, u dorosłych pacjentów z chorobą zastawek serca obserwuje się korelację, pomiędzy przeciążeniem serca przez podwyższone ciśnienie krwi, a ekspresją przedsionkowych form LC1 w lewej komorze serca. Normalizacja parametrów hemodynamicznych po operacyjnej wymianie zastawek istotnie redukuje hipertrofię i ekspresję ALC1 [38].

Badania proporcji lekkich łańcuchów istotnych (LC1) i łańcuchów regulujących (LC2) w miozynie serc pacjentów z wrodzonymi wadami nie wykazały różnic w porównaniu z miozyną pochodzącą z serc kontrolnych, co oznacza, że zwiększonej ekspresji form przedsionkowych LC1 w komorach towarzyszy spadek ekspresji form komorowych lekkich łańcuchów istotnych [39]. W celu wyjaśnienia funkcjonalnych konsekwencji

podwyższonej ekspresji form przedsionkowych łańcuchów istotnych miozyny w komorach serca, przeprowadzono badania szybkości maksymalnego skracania się włókien oraz pomiary połowicznego czasu rozwoju napięcia w pozbawionych błony włóknach izolowanych z serc pacjentów z analizowanymi wcześniej wadami (Tab. 1). Ekspresja ALC1 w prawej komorze serc tych pacjentów wahała się w granicach od 0 do 27%. Pokazano, że włókna komory zawierające największe ilości ALC1 (20% i więcej) wykazywały wyższą szybkość maksymalnego skracania się i niższy połowiczny czas rozwoju napięcia niż włókna nie zawierające przedsionkowej formy LC1 lub zawierające bardzo małe jej ilości [39]. Inne badania wykazały, że zwiększona ekspresja ALC1 w komorach serc miopatycznych skorelowana jest z podwyższoną wrażliwością na wapń aparatu kurczliwego prawdopodobnie na skutek różnic w składzie aminokwasowym N-końców obu form LC1 [25, 40]. Wyniki te sugerują, że obecność przedsionkowej formy lekkich łańcuchów istotnych miozyny w hipertroficznym komorach ma wpływ na kinetykę cyklu mostków poprzecznych regulując w ten sposób kurczliwość komór serca. Pomimo, że jedynie w N-końcowym odcinku obu lekkich łańcuchów występują wspólne sekwencje aminokwasowe, to jednak i tu obserwuje się niewielkie różnice (Ryc. 4). Należy zatem przypuszczać, że różnice w składzie aminokwasowym N-końcowych fragmentów lekkich łańcuchów istotnych miozyny komór i przedsionków serca, są przyczyną odmiennych oddziaływań tych łańcuchów z aktyną. Zatem funkcja skurczowa mięśnia sercowego może być regulowana w zależności od składu izoenzymów miozyny.

Pewne badania sugerują też, że fosforylacja lekkich łańcuchów regulujących (LC2) katalizowana przez kinazę zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny zwiększa zależną od jonów wapnia siłę skurczu zarówno w mięśniach szkieletowych jak i w mięśniu sercowym [41, 42]. Co prawda w omawianych wadach serca nie obserwowano żadnych różnic w ekspresji komorowych form lekkich łańcuchów regulujących miozyny, a także badana miozyna zawierała całkowicie zdefosforylowane LC2, to nie można jednak wykluczyć, że również zmiana wzoru izoform lekkich łańcuchów regulujących miozyny związana jest z modyfikacją enzymatycznej aktywności miozyny i szybkości kurczenia się włókien serca.

Obserwowany we wrodzonych wadach serca wzrost ekspresji przedsionkowej formy łańcuchów istotnych miozyny jest przejawem adaptacji mięśnia sercowego do jego zmienionych funkcjonalnych wymagań. Zatem część regulatorowa główki miozyny ma istotny wpływ na prawidłową funkcję skurczową serca.

IV. „Ogłuszony” mięsień sercowy a zmiany w domenie regulatorowej główki miozyny

Badania zjawiska „serca ogłuszonego”, definiowa-

nego jako odwracalne zaburzenie jego kurczliwości, które pojawia się, gdy następuje reperfuzja po krótkim okresie ischemii, wskazują, że także i w tym przypadku zmiany w aparacie kurczliwym mogą być przyczyną dysfunkcji mięśnia sercowego w nieobecności jakichkolwiek oznak nekrozy czy też poważnych zmian ultrastrukturalnych [43, 44]. Utrzymujące się często przez kilka dni zaburzenie funkcji skurczowej serca sugeruje, że procesy odbudowy jego upośledzonej czynności wiążą się z koniecznością naprawy uszkodzonego aparatu kurczliwego. Analiza składu białkowego miofibrilli uzyskanych z biopsji pobranych z krótko niedokrwionych obszarów serca świni wykazała częściową degradację lekkich łańcuchów istotnych miozyny. W celu określenia jakie zmiany właściwości miozyny może pociągać za sobą obserwowana częściowa degradacja tych białek badano właściwości miozyny zawierającej skrócony działaniem papainy lekki łańcuch istotny. Okazało się, że skrócenie LC1 ma wyraźny wpływ na oddziaływanie miozyny z aktyną. Miozyna taka wykazywała bowiem wzrost powinowactwa do aktyny. Stężenie aktyny potrzebne dla uzyskania połowy maksymalnej aktywności Mg^{2+} ATPazy, dla miozyny zawierającej skrócony łańcuch LC1 wynosiło $0.19 \mu M \pm 0.05$ natomiast dla miozyny natywnej $0.35 \mu M \pm 0.04$. Jednocześnie czułość na wapń miozyny ze skróconym LC1 była obniżona [10, 21]. Można więc przypuszczać, że obserwowana podczas niedokrwienia niewielka nawet degradacja lekkich łańcuchów istotnych pociąga za sobą zmiany w oddziaływaniu miozyny z aktyną, co wyjaśniałoby utrzymującą się przez kilka dni zmianę parametrów skurczu obserwowaną w „ogłuszonym” mięśniu sercowym.

V. Podsumowanie

Na podstawie przedstawionych, niektórych tylko, wyników badań miozyny w różnych stanach patologicznych serca można sądzić, że obserwowane zaburzenia jego funkcji skurczowej związane są ze zmianami właściwości układu kurczliwego. Prowadzą one często do nieodwracalnych zaburzeń pracy serca, ale mogą też stanowić mechanizm obronny przystosowujący przynajmniej na pewien okres czasu mięsień sercowy do narzuconych mu przez chorobę nowych funkcjonalnych wymagań. Naturalnie, omawiane zmiany w układzie kurczliwym mogą być różne i dotyczyć nie tylko filamentu grubego. Wiele danych wskazuje bowiem, że częstą przyczyną zmienionych właściwości kurczliwych serca prowadzącą niejednokrotnie do śmierci są także obok miozyny zaburzenia białek regulujących np. α -tropomiozyny czy troponiny T związanych z filamentem cienkim [45]. Omówione wyżej wyniki badań dotyczyły jednak tylko białka filamentu grubego — miozyny. Wynika z nich, że zmiany w domenie regulatorowej główki miozyny są przyczyną zmienionych oddziaływań miozyna — ak-

tyna, co ma niewątpliwie wpływ na obserwowane w różnych chorobach serca zaburzenia jego funkcji skurczowej.

Artykuł otrzymano 25 lutego 1997 r.
Zaakceptowano do druku 1 kwietnia 1997 r.

Piśmiennictwo

- Harrington WF, Rodgers ME (1984) *Annu Rev Biochem* **53**: 35-73
- Weeds AG, Pope B (1971) *Nature (Lond)* **234**: 85-88
- Warrick HM, Spudich JA (1987) *Annu Rev Cell Biol* **3**: 379-421
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäase K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G & Holden HM (1993) *Science* **261**: 50-58
- Rayment I, Holden HM (1994) *TIBS* **19**: 129-134
- Collins JH (1976) *Nature (Lond)* **259**: 699-700
- Matsuda G (1983) *Adv Biophys* **16**: 185-218
- Alexis NN, Gratzer WB (1978) *Biochemistry* **17**: 2319-2325
- Fisher AJ, Smith CA, Thoden J, Smith R, Sutoh K, Holden HM, Rayment I (1995) *Biophys J* **68**: 19s-28s
- Moczarska A, Kąkol I (1995) *Biochem and Mol Biol Intern* **37**: 765-772
- Abelman WH, Lorell BH (1989) *J Am Coll Cardiol* **13**: 1219-1239
- Bender JR (1991) *Circulation* **83**: 704-706
- Oakly CM (1978) *Postgrad Med J* **54**: 440
- Schier JJ, Adelstein RS (1982) *J Clin Invest* **69**: 816-825
- Hammond EH, Menlove RL, Anderson JL (1987) *Am Heart J* **114**: 1055-1065
- Schaper J, Freole R, St Hein MD, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Briedl A, Bleese N (1991) *Circulation* **83**: 504-514
- Pagani ED, Alousi AA, Grant AM, Older TM, Dziuban SW Jr, Allen PD (1988) *Circ Res* **63**: 380-385
- Alousi AA, Grant AM, Etzer JR, Cofer BR, Van der Bel-Kahn J, Melvin D (1990) *Mol Cell Biochem* **96**: 79-88
- Silver MM, Silver MD (1983) W: MD Silver (red) *Cardiovascular Pathology* t. I. Churchill Livingstone Inc, New York, str. 492-498
- Margossian SS, White HD, Caulfield JB, Norton O, Taylor S, Slayter HS (1992) *Circulation* **85**: 1720-1733
- Moczarska A (1995) Praca doktorska wykonana w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa
- Matsuda G, Maita T & Umegane T (1981) *FEBS Lett* **126**: 111-113
- Nabeshima Y, Fuji-Kuriyama Y, Muramatsu M, Ogata K (1984) *Nature (Lond)* **308**: 333-338
- Price KM, Litter WA, Cummins P (1980) *Biochem J* **191**: 571-580
- Kurabayashi M, Komoro J, Tsuchimochi F, Takaku F, Yazaki Y (1988) *J Biol Chem* **263**: 13930-13936
- Sutoh K (1982) *Biochemistry* **21**: 3654-3661
- Trayer JP, Trayer HR, Levine BA (1987) *Eur J Biochem* **164**: 259-266
- Greaser ML, Moss RL, Reiser PJ (1988) *J Physiol* **406**: 85-98
- Sweeney HL, Kushmeric MJ, Mabuchi K, Sreter FA, Gergely J (1988) *J Biol Chem* **263**: 9034-9039
- Lowey S, Waller GS, Trybus KM (1993) *J Biol Chem* **268**: 20414-20418
- Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C (1994) *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 413-419
- Sweeney HL (1995) *Biophys J* **68**: 112s-119s
- Morano I, Ritter O, Bonz A, Timek T, Vahl ChF, Michel G (1995) *Circ Res* **76**: 720-725
- Swynghedauw B (1986) *Physiol Rev* **66**: 710-771
- Auckland LM, Lambert SJ & Cummins P (1986) *Cardiovasc Res* **20**: 828-863

36. Cummins P & Lambert SJ (1986) *Circ Res* 58: 864-858
 37. Schaub MC, Tuchschnid CR, Srihari T & Hirzel HO (1984) *Eur Heart J* 5: (suppl F) 85-93
 38. Süttsch G, Brunner UT, Von Schulthess C, Hirzel HO, Hess OM, Turina M, Krayemnbuchl HP & Schaub MC (1992) *Circ Res* 70: 1035-1043
 39. Morano M, Zacharzowski U, Maier M, Lange PE, Alexi-Meskishvili V, Haase H (1996) *J Clin Invest* 98: 467-473
 40. Morano J, Hädicke K, Böhm M, Erdmann E (1993) *J Mol Cell Cardiol* 25 (II): 131 Abstract
 41. Morano I, Hofmann F, Zimmer M & Rüegg JC (1986) *FEBS Lett* 189: 221-224
 42. Morano I, Bächle-Stolz C, Katus H & Rüegg JC (1988) *Basic Res Cardiol* 83: 350-359
 43. Kloner RA, De Boer LWV, Darsee JR, Ingwall JS, Hale S, Tumas J, Braunwald E (1981) *Am J Physiol* 241: H591-H599
 44. Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E (1983) *Circulation* 68 (suppl I) 1-8-1-15
 45. Yamauchi-Takahara K, Nakajima-Taniguchi Ch, Matsui H, Fujio Y, Kunisada K, Nagata S, Kishimoto T (1996) *Heart* 76: 63-65

SPRAWOZDANIE z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w roku 1996

Działalność organizacyjna:

1. Skład osobowy Zarządu Głównego:

Prezydium: Prezes — prof. dr hab. Liliana Konarska
 wiceprezes — doc. dr hab. Jolanta Barańska
 sekretarz — doc. dr hab. Małgorzata Balińska
 skarbnik — prof. dr hab. Zofia Porębska

Członkowie Prezydium Zarządu: prof. dr hab. Stanisław Bielecki
 prof. dr hab. Edward Bańkowski
 prof. dr hab. Roman Tarnawski

Członkowie Zarządu: prof. dr hab. Jan Glogowski
 prof. dr hab. Teresa Jakubowicz
 prof. dr hab. Aleksandra Kubicz
 doc. dr hab. Piotr Laidler
 prof. dr hab. Maciej J. Nałęcz
 prof. dr hab. Ryszard Oliński
 prof. dr hab. Jerzy Popinigis
 prof. dr hab. Tomasz Twardowski
 dr Teresa Wesołowska

Komisja Rewizyjna: prof. dr hab. Magdalena Fikus — Przewodnicząca
 prof. dr hab. Anna Brańczyk-Kuźma
 prof. dr hab. Maria Stryjecka-Zimmer

Zarząd Główny działa poprzez Oddziały Terenowe usytuowane:

w Gdańsku — przewodniczący dr M. Woźniak
 w Toruniu — przewodniczący dr A. Leźnicki
 w Krakowie — przewodniczący prof. dr hab. Z. Żak
 w Katowicach — przewodnicząca doc. dr hab. I. Żak
 w Lublinie — przewodnicząca dr M. Sanecka-Obacz
 w Łodzi — przewodnicząca prof. dr hab. W. Krajewska
 w Olsztynie — przewodniczący prof. dr hab. J. Glogowski
 we Wrocławiu — przewodnicząca prof. dr hab. M. Malicka-Błaszkiwicz
 w Warszawie — przewodnicząca prof. dr hab. B. Grzelakowska-Sztabert
 w Białymstoku — przewodniczący dr hab. J. Pałka
 w Poznaniu — przewodniczący prof. dr hab. W. Walerych
 w Szczecinie — przewodniczący dr T. Ogoński
 Kierownik Biura Zarządu Głównego — Weronika Kamińska

Zarząd Główny współpracując z Zarządami Oddziałów prowadził działalność statutową Towarzystwa poprzez Sekcje, Komisje i Zespoły powołane do zadań szczegółowych. Jak co roku odbyły się, zgodnie ze statutem, cztery plenarne posiedzenia Zarządu Głównego.

Dyżury członków Prezydium odbywały się we wtorki w biurze Zarządu Głównego w małym budynku Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, pokój 633, telefon 658-20-99, fax 22-53-42, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl.

Ważniejsze uchwały Zarządu Głównego:

1. Powołanie Sekcji Kwasów Nukleinowych, której przewodniczącym został prof. dr hab. Jan Barciszewski z Poznania.
2. Przeniesienie redakcji „Postępów Biochemii” do nowego lokalu, tj. p. 632 w małym budynku Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, telefon 659-85-71 wew. 441, fax 22-53-42, e-mail: postepy@nencki.gov.pl.
3. Decyzja nawiązania kontaktów naukowych z biochemikami lwowskich placówek naukowych, organizacja wspólnej polsko-ukraińskiej konferencji naukowo-wspomnieniowej poświęconej Jakubowi K. Parnasowi we Lwowie, wykonanie tablicy pamiątkowej ze składek biochemików polskich.

W roku sprawozdawczym w poczet członków PTBioch przyjęto 57 osób, w tym 27 osób otrzymało status członka studenta.

W grudniu 1996 r. liczba członków naszego Towarzystwa, płacących składki, wynosiła 1126 osób oraz 11 członków honorowych i 78 członków-emerytów zwolnionych z opłaty członkowskiej. 547 osób utraciło członkostwo w PTBioch. ze względu na wieloletnie zaległości w płaceniu składek.

Działalność organizacyjno-naukowa Towarzystwa

- a. Doroczny Zjazd Towarzystwa odbył się w Krakowie w dniach 17-20 września 1996 r. z udziałem około 800 uczestników z kraju i z zagranicy. Szczegółowe sprawozdanie z obrad ukazało się w „Postęпах Biochemii” nr 1, t. 43, 1997.
- b. Zarząd Główny zorganizował we Lwowie w dniach 8-11 września I Polsko-Ukraińską Konferencję Biochemiczną poświęconą pamięci prof. Jakuba Karola Parnasa, połączoną z wmurowaniem w budynku, w którym pracował J. K. Parnas, tablicy pamiątkowej ufundowanej ze składek polskiej społeczności biochemicznej. Obszerne sprawozdanie z tej Konferencji ukaże się w jednym z tegorocznych numerów „Postępów Biochemii”.

Działalność wydawnicza

1. Kwartalnik „Postępy Biochemii”

Wydano 4 zeszyty „Postępów Biochemii” z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych. Czasopismo drukuje artykuły przeglądowe z różnych działów biochemii i dziedzin pokrewnych i redagowane jest przez zespół: prof. dr Z. Zielińska (redaktor naczelny), prof. dr G. Palamarczyk, prof. dr A. Jerzmanowski, dr A. Szakiel. Drugi numer „Postępów Biochemii” dedykowany był prof. dr Zofii Zielińskiej, redaktorowi naczelnemu kwartalnika, z okazji 80-lecia urodzin.

2. Kwartalnik „Acta Biochimica Polonica”

Drukuję oryginalne prace doświadczalne w języku angielskim. Wydano 4 zeszyty, w tym numer pierwszy dedykowany prof. dr Davidowi Shugarowi z okazji 80-lecia urodzin. Pismo jest wydawane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne wspólnie z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN z pomocą finansową KBN i jest indeksowane w Biochemistry and Biophysics Citation Index, BIOSIS, Chemical Abstract, Excerpta Medica, Medline Current Contents.

3. Monografie Biochemiczne

W roku 1996 wydano dwa kolejne tomy monografii:

nr 40 p.t. „Włodzimierz Mozolowski 1895-1975 w 100-lecie urodzin” jest to praca zbiorowa pod redakcją prof. W. Makarewicza

nr 41 p.t. „Hormony glikoproteinowe: struktura, biosynteza i funkcje ich oligosacharydów”, autorzy Iwona Żak i Marian Drózdź, redaktor Liliana Konarska

4. „Listy do członków PTBioch”:

Biuletyn jest redagowany przez dr Teresę Wesołowską w Szczecinie. W roku sprawozdawczym ukazały się 4 listy.

Nagrody Towarzystwa

1. Nagrodę im. J. K. Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w Polsce przyznano Maciejowi Żyliczowi i Alicji Wawrznów za pracę p.t. „Divergent effects of ATP on binding of the DnaK and DnaJ chaperones to each other, or to their various native and denaturated protein substrates” opublikowaną w *J. Biol. Chem.* **270** (33), 19300-19306, 1995.
 2. Nagrodę im. B. Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w „*Postęпах Biochemii*” otrzymała Barbara Grzelakowska-Sztabert za pracę p.t. „Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych” opublikowaną w numerze 2 (tom 41), 1995.
 3. W pierwszej edycji konkursu im. A. Dmochowskiego za wybitne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii nagrodę otrzymała Leokadia Klyszejko-Stefanowicz za książkę p.t. „Cytobiochemia” wydaną w 1995 roku przez PWN, a wyróżnienie Grzegorz Bartosz za książkę p.t. „Druga twarz tlenu” wydaną w 1995 roku przez PWN.
 4. W konkursie na najlepszy wykład akademicki w roku 1996 dwie równorzędne nagrody uzyskali: Zygmunt Pojda za wykład p.t. „Cytokiny w regulacji i odpowiedzi układu krwiotwórczego” i Hanna Czczot za wykład p.t. „Biochemia nasienia”.
 5. Nagrodę im. W. Mozołowskiego za najlepszą pracę przedstawioną na dorocznym Zjeździe PTBioch przez młodego biochemika (do lat 30) otrzymała dr Ewa Missol za prezentację pracy p.t. „Wykorzystanie liposomów kationowych do wprowadzenia *in vivo* samobójczego genu dezaminazy cytozyny z *E. coli*”.
- Przyznano także dwa wyróżnienia: dr Alicji Węgrzyn za prezentację pracy p.t. „Mechanizm rozpadu kompleksu replikacyjnego bakteriofaga po szoku termicznym” oraz mgr Mariuszowi Więckowskiemu za prezentację pracy p.t. „Rola nośników mitochondrialnych w rozprzegającym działaniu kwasów tłuszczowych”.
6. Nagrodę im. J. Opieńskiej-Blauth za najlepszą pracę studencką prezentowaną na dorocznym Zjeździe PTBioch. otrzymał Maciej Wiznerowicz za prezentację pracy p.t. „Konstrukcja dwucistronowych wektorów retrowirusowych dla celów terapii genowej nowotworów u ludzi”, a wyróżnienie Borys Wróbel za dwie prezentacje: „Amplifikacja plazmidów w komórkach *E. coli* w warunkach niedoboru aminokwasów” i „Degradacja DNA w podwyższonej temperaturze po amplifikacji plazmidów głodzonych komórkach *E. coli*”.

Staż naukowe

Zarząd Główny popiera krajowe i zagraniczne staże naukowe. W roku 1996 w stażach i kursach szkoleniowych oraz konferencjach organizowanych przez FEBS wzięło udział 12 osób.

Wszystkim, którzy w minionym roku 1996 poświęcili swój czas i energię włączając się w działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, składam serdeczne podziękowania.

Prezes Zarządu Głównego
Liliana Konarska

**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.).

Zachęcamy do czytania i prenumerowania *Acta Biochemica Polonica*

Prenumerata roczna wynosi: indywidualna 40 zł

dla instytucji wynosi 80 zł

Acta Biochemica Polonica

Vol. 44 No. 1/1997

QUARTERLY

PL ISSN0001-527X

31 11 13

Plant biochemistry

Reviews

- Nodulation genes in the *Rhizobium* — plant signal exchange**
Zbigniew Lorkiewicz 1-12
- Nuclear extrachromosomal DNA of higher plants**
Jerzy Buchowicz 13-20
- Galactolipase and chilling sensitivity of plants**
Zbigniew Kaniuga 21-36

Regular papers

- Isolation and classification of a family of cyclin gene homologues in *Lupinus luteus***
Joanna Deckert, Joanna Jeleńska, Żaneta Zaborowska and Andrzej B. Legocki 37-42
- UDP-glucose:solasodine glucosyltransferase from eggplant (*Solanum melongena* L.) leaves: Partial purification and characterization**
Cezary Pączkowski, Małgorzata Kalinowska and Zdzisław A. Wojciechowski 43-54
- Reversibility of the oleanolic acid monoglycosides transport across the tonoplast in vacuoles isolated from *Calendula officinalis* leaves**
Anna Szakiel and Wirginia Janiszowska 55-60
- Purification and some properties of a novel dsRNA degrading nuclease bound to rye germ ribosomes**
Maria A. Siwecka 61-68
- Studies on the translation mechanism of subgenomic RNA of potato leafroll virus**
Marek Juszcuk, Włodzimierz Zagórski-Ostoja and Danuta Maria Hulanicka 69-78

Short communications

- Autonomous replication of a wheat DNA sequence in isolated wheat nuclei**
Blanka Szurmak and Jerzy Buchowicz 79-82
- The influence of polyamines on polymerase chain reaction (PCR)**
Paweł Fiedorow and Zofia Szwejkowska-Kulińska 83-88

Enzyme kinetics

- Regular paper
- The enthalpimetric determination of inhibition constants for the inhibition of urease by acetohydroxamic acid**
Wiesława Zaborska, Maciej Leszko, Mirosława Kot and Adam Juszkiewicz **89-90**

Clinical biochemistry

- Regular papers
- Changes in red blood cell membrane structure in patients with chronic renal failure**
Krzysztof Gwoździński, Magdalena Janicka, Joanna Brzeszczyńska and Marek Luciak **99-108**
- Activity of cancer procoagulant (CP) in serum of patients with cancer of lung, breast, oesophagus and colorectum**
Monika Rucińska, Marian Furman, Zdzisław Skrzydlewski and Ewa Zaremba **109-112**
- The activities and subcellular localization of cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors in human ovarian carcinoma**
Halina Haczyńska, Jerzy Gerber, Jerzy Osada and Maria Warwas **113-120**
- The application of a flow cytometric assay for evaluation of phagocytosis of neutrophils**
Małgorzata Zielińska and Władysław Fenrych **121-126**
- Short communication
- Silybin and silydianin diminish the oxidative metabolism of human polymorphonuclear neutrophils**
Ewa Ignatowicz, Hanna Szafer, Małgorzata Zielińska, Izabela Korczowska and Władysław Fenrych **127-130**

Oxidation states

- Regular papers
- Changes in ATP level and iron-induced ultra-weak photon emission in bull spermatozoa, caused by membrane peroxidation during thermal stress**
Maria Gumińska, Teresa Kędryna, Andrzej Laszczka, Marek Godlewski, Janusz Sławiński, Barbara Szczęśniak-Fabiańczyk, Teresa Kwiecińska, Zenon Rajfur, Dorota Wierzuchowska **131-138**
- Liver and serum antioxidant status after methanol intoxication in rats**
Elżbieta Skrzydlewska and Ryszard Farbiszewski **139-146**

Clinical biochemistry

Short
communications

Identification of a microsatellite region composed of a long homopurine/homopyrimidine tract surrounded by AT-rich sequences upstream of the rat stress-inducible hsp70.1 gene

Katarzyna Lisowska, Tomasz Loch, Anna Fiszler-Kierzkowska, Dorota Ściegłńska and Zdzisław Krawczyk

147-152

Characterization of the *Escherichia coli* gene encoding a new member of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family

Agnieszka Sirko, Anna Węgleńska Monika Hryniewicz and Danuta M. Hulanicka

153-158

Index of authors

Brzeszczyńska, J.	99	Jeleńska, J.	37	Siwecka, M.A.	61
Buchowicz, J.	13, 79	Juszczuk, M.	69	Skrzydłowska, E.	189
Deckert, J.	37	Juszkiewicz, A.	89	Skrzydłowski, Z.	109
Farbiszewski, A.	189	Kalinowska, M.	43	Szaefer, H.	127
Fenrych, W.	127	Kaniuga, Z.	21	Szakiel, A.	55
Fenrych, Wł.	121	Korczyńska, I.	127	Szweykowska-Kulińska, Z.	83
Fiedorow, P.	83	Kot, M.	89	Szczęśniak-Fabiańczyk, B.	131
Fiszler-Kierzkowska, A.	147	Krawczyk, Z.	147	Szurmak, B.	79
Furman, M.	109	Kwiecińska, T.	131	Ściegłńska, D.	147
Gerber, J.	113	Laszczka, A.	79	Kędryna, T.	153
Godlewski, M.	131	Legocki, A.B.	37	Węgleńska, A.	153
Gumińska, M.	131	Leszko, M.	89	Warwas, M.	113
Gwoździński, K.	99	Lisowska, K.	147	Wierzuchowska, D.	131
Haczyńska, H.	113	Loch, T.	147	Wojciechowski, Z.A.	43
Hryniewicz, M.	153	Lorkiewicz, Z.	1	Zaborowska, Ż	37
Hulanicka, D.M.	69	Luciak, M.	99	Zaborska, W.	89
Hulanicka, D.M.	153	Osada, J.	113	Zagórski-Ostoja, Wł.	69
Ignatowicz, E.	127	Pączkowski, C.	43	Zaremba, E.	109
Janicka, M.	99	Rajfur, Z.	131	Zielińska, M.	121, 127
Janiszowska, W.	55	Rucińska, M.	109		
Sławiński, J.	37	Sirko, A.	153		

Wskazówki dla autorów

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).

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

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

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji, nr telefonu

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym oraz wykaz stosowanych skrótów. **Kolejno numerowane dalsze strony** obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

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

1. Hildenbrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* **631**: 499-502
2. Bostock CJ, Sumner AT (1978) *The Eukaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florjkin 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 przelać na adres:

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

