

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 45, NR 2, 1999

Przewidywanie struktur RNA . . .	74
Motywy strukturalne	80
Ekspresja genomu wirusów . . .	87
Rola oscylacji wapniowych . . .	95
Efekt Crabtree	100
Fibrynoliza i migracja komórek .	109
Białka choroby Alzheimera	116
Oporność na wankomycynę . . .	122
Bakulowirusy	137
Mechanizmy obronne owadów . .	143
Sprawozdania	151
Skracanie tytułów	153

**Kwartalnik „*Postępy Biochemii*” wydawa-
ny z pomocą finansową Komitetu Badań
Naukowych oraz Instytutu Biologii
Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Indeksowany w Medline i Agrolibrex**

<http://rcin.org.pl>

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland
tel/fax 658-20-99
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
LILIANA KONARSKA
tel. 659-85-71 w. 352
bezp. 658-20-99
wtorki 15—18
ANNA SZAKIEL
tel. 823-20-46
IWONA FIJAŁKOWSKA
tel. 659-70-72 w. 1123
ADAM SZEWCZYK
tel. 659-85-71 w. 269
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 672-34-38
HANNA LASKOWSKA
pon. i czw. 14-16
tel. 659-85-71 w. 441

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
MICHAŁ DADLEZ
(Warszawa)
LUCYNA GRĘBECKA
(Warszawa)
KRYSZYNA GRZELAK
(Warszawa)
MONIKA HRYNIEWICZ
(Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
PAWEŁ P. LIBERSKI
(Łódź)
ANNA PRZYKORSKA
(Warszawa)
ADAM SZEWCZYK
(Warszawa)
HANNA STRZELECKA-
-GOŁASZEWSKA
(Warszawa)
JADWIGA ZIEMNICKA
(Poznań)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel. (22) 659-85-71 w. 441
poniedziałki, czwartki 14⁰⁰-16⁰⁰
fax (22) 822-53-42
e-mail: postepy@nencki.gov.pl

SPIS TREŚCI CONTENTS

Przewidywanie struktur drugorzędowych kwasów rybonukleinowych (RNA) Predicting of the secondary structures of the ribonucleic acids (RNA)	
KRZYSZTOF ZIOMEK, RYSZARD KIERZEK	74
Drugorzędowe motywy strukturalne RNA The secondary structural motives of the RNA	
KRZYSZTOF ZIOMEK, RYSZARD KIERZEK	80
Mechanizm ekspresji genomu wirusów (+) RNA Gene expression of positive stranded RNA viruses	
MAREK JASZCZUK, WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI-OSTOJA, DANUTA HULANICKA	87
Oscylacje wapniowe uczestniczą w procesie regulacji ekspresji genów Calcium oscillations participate in the regulation of gene expression	
AGNIESZKA MAKOWSKA	95
Efekt Crabtree wyrazem strategii metabolicznej szybko rosnących nowotworów i innych komórek proliferujących The Crabtree effect as a metabolic strategy of fast growing tumours and rapidly proliferating cells	
KRYSZYNA BOGUĆKA, LECH WOJTCZAK	100
Współdziałanie receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu z integrzynami podczas adhezji i migracji komórek Interaction of urokinase-type plasminogen activator receptor with integrins during cell adhesion and migration	
CZESŁAW S. CIERNIEWSKI, ALEKSANDRA CIERNIEWSKA-CIEŚLAK, ZOFIA PAWŁOWSKA	109
Białka choroby Alzheimerera Proteins of Alzheimer's Disease	
AGNIESZKA PIEKIEŁKO	116
Mechanizmy bakteryjnej oporności na wankomycynę i inne antybiotyki glikopeptydowe: rosnące zagrożenie Mechanisms of bacterial resistance to vancomycin and other glycopeptide antibiotics: an emerging threat	
MAŁGORZATA KŁOSZEWSKA, ZDZISŁAW MARKIEWICZ	122
Bakulowirusy — specyficzne wirusy owadzie. Budowa, infekcyjność i wykorzystanie w ekspresji obcych genów Baculoviruses — insect specific viruses. Structure, infectivity and foreign genes expression	
JOANNA MICHALIK, EWA SZOŁAJSKA	137
Bioinsektycydy a mechanizmy obronne owadów Bioinsecticides and insect defense mechanisms	
JACEK BANIA, ANTONI POLANOWSKI	143
Sprawozdania Reports	151
Zasady skracania tytułów czasopism naukowych Titles' abbreviations of the scientific journals	153

Przewidywanie struktur drugorzędowych kwasów rybonukleinowych (RNA)

Predicting of the secondary structures of the ribonucleic acids (RNA)

KRZYSZTOF ZIOMEK¹,
RYSZARD KIERZEK²

Spis treści:

- I. Wstęp
 - I-1. Definicja struktury drugorzędowej RNA
- II. Metody oznaczania struktur drugorzędowych RNA
 - II-1. Analiza filogenetyczna
 - II-2. Metody uwzględniające enzymatyczną i chemiczną reaktywność RNA
 - II-2.1. Modyfikacja enzymatyczna
 - II-2.2. Modyfikacja chemiczna
 - II-3. Inne metody określania struktury drugorzędowej
- III. Metody przewidywania struktur drugorzędowych RNA oraz wyznaczania parametrów termodynamicznych określających trwałość termodynamiczną RNA
 - III-1. Metoda graficzna
 - III-2. Model najbliższego sąsiedztwa
- IV. Metody pomiaru parametrów termodynamicznych dupleksów RNA
 - IV-1. Metoda topnienia dupleksów
 - IV-2. Metoda kalorymetryczna
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
 - I-1. Definition of the secondary structure of the RNA
- II. Methods of the RNA secondary structures determination
 - II-1. Phylogenetic analysis
 - II-2. Methods based on enzymatic and chemical activity of the RNA
 - II-2.1. Enzymatic modification
 - II-2.2. Chemical modification
 - II-3. Other methods of determination of secondary structure
- III. Methods predicting the RNA folding and determination of the thermodynamic parameters of RNA
 - III-1. Graphic method
 - III-2. Nearest neighbor model
- IV. Methods of the measurements of the thermodynamics parameters of the RNA duplexes
 - IV-1. UV melting method
 - IV-2. Calorimetric method
- V. Conclusion

Wykaz stosowanych skrótów: tRNA — transferowy RNA; mRNA — informacyjny RNA; rRNA — rybosomalny RNA; ΔH — zmiana entalpii; ΔS — zmiana entropii; ΔG — zmiana energii swobodnej; T_m — temperatura topnienia oligomeru; DSC — różnicowa kalorymetria skaningowa.

I. Wstęp

Kwasy rybonukleinowe (RNA) składają się z kilkudziesięciu do kilku tysięcy nukleotydów. Najmniejsze z nich — transferowe kwasy rybonukleinowe (tRNA) zawierają ich ponad 70. Kwasy rybonukleinowe, w przeciwieństwie do kwasów deoksyrybonukleinowych (DNA), oprócz fragmentów helikalnych (dwuniciowych) zawierają wiele niehelikalnych elementów strukturalnych. Kwasy rybonukleinowe (tRNA,

mRNA, rRNA) biorą udział we wszystkich procesach biologicznych komórki, a dla biologicznej funkcji istotna jest ich struktura drugo- i trzeciorzędowa [1].

Stosunkowo łatwo określić strukturę pierwszorzędową RNA, czyli jego sekwencję. Ustalenie struktury drugorzędowej jest bardziej złożone. Istnieją zasadniczo trzy podejścia do rozwiązania tego problemu:

1) metoda filogenetyczna — porównująca sekwencje wielu homologicznych RNA i próbująca określić wspólny dla nich schemat oddziaływań drugorzędowych

2) metoda mapowania chemicznego i enzymatycznego — wykorzystująca różną reaktywność chemiczną i enzymatyczną fragmentów jednoniciowych i dwuniciowych RNA

3) metoda przewidywania pofałdowania RNA. Opiera się ona na założeniu, że termicznie najtrwalsze są struktury drugorzędowe RNA o najniższej energii swobodnej (ΔG°). Znając uwarunkowania określające

¹ Dr, ² doc. dr hab.; Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

trwałość termodynamiczną fragmentów helikalnych oraz wszystkich niehelikalnych motywów strukturalnych RNA możliwe jest przewidzenie struktury drugorzędowej RNA o najniższej energii swobodnej.

W sieci internetowej dostępne są dwa programy pozwalające określić strukturę drugorzędową RNA na podstawie ich sekwencji. Są one umieszczone na stronie internetowej D.H. Turner'a (www.chem.rochester.edu/Faculty/Turner.html) oraz M. Zucker'a (www.ibr.wustl.edu/~zucker/rna).

I-1. Definicja struktury drugorzędowej RNA

W RNA występują oddziaływania, których rzędowość trudno jest niejednokrotnie określić. W celu rozróżnienia oddziaływań drugo- i trzeciorzędowych, sekwencję RNA należy zapisać na płaszczyźnie [2]. Po połączeniu parujących się zasad liniami można określić rzędowość oddziaływań. Jeżeli linie nie przecinają się, w RNA występują jedynie oddziaływania drugorzędowe, jeżeli natomiast krzyżują się — występują oddziaływania trzeciorzędowe. Jest to definicja oparta na modelu „przecinających się strun” (ang. *chord crossing*). Schematycznie przedstawiono to na rycinie 1.

II. Metody oznaczania struktur drugorzędowych RNA

II-1. Analiza filogenetyczna

Analiza filogenetyczna porównuje sekwencje wielu homologicznych RNA i próbuje określić wspólny dla nich szkielet oddziaływań drugorzędowych [3]. Zakłada się, że jeśli w rodzinie homologicznych RNA pewne fragmenty są ze sobą komplementarne to tworzą one struktury helikalne. Najlepsze rezultaty uzyskuje się, gdy porównuje się sekwencje homologicz-

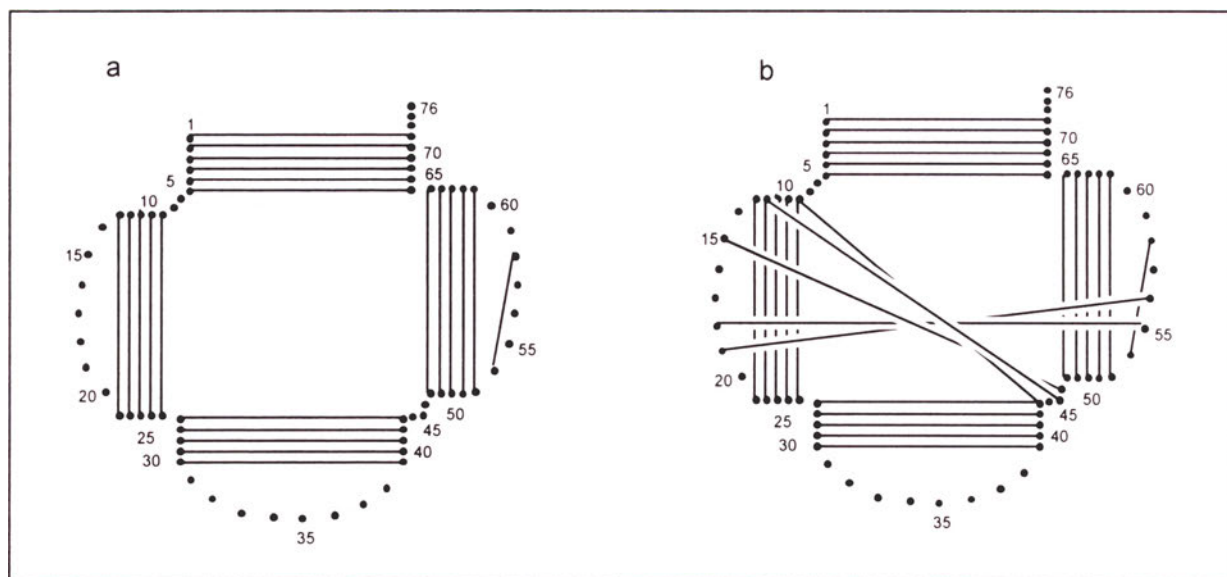
nych RNA różniące się pomiędzy sobą od 20 do 40% składu nukleotydowego, a zmianie sekwencji jednej nici potencjalnego fragmentu helikalnego towarzyszy komplementarnie uzupełniająca zmiana w sekwencji drugiej nici RNA. Struktury przewidziane na podstawie podobieństwa sekwencji często różnią się od rzeczywistych i prowadzą do zaproponowania kilku struktur alternatywnych. Wynika to stąd, że analiza filogenetyczna nie bierze pod uwagę oddziaływań innych niż Watsona-Cricka oraz wielu elementów strukturalnych RNA, które wpływają na trwałość termiczną RNA i decydują o najtrwalszej termodynamicznie strukturze RNA. Spośród istniejących metod analiza filogenetyczna pozwala na najdokładniejsze określenie struktury drugorzędowej RNA, dotyczy to zwłaszcza dużych cząsteczek RNA takich, jak 16S i 23S rRNA czy rybozymów grupy I.

II-2. Metody uwzględniające reaktywność enzymatyczną i chemiczną RNA

Drugorzędowa struktura RNA może być także wyznaczana metodami wykorzystującymi różnice w enzymatycznej i chemicznej reaktywności fragmentów jedno- i dwuniciowych RNA. Metody te dostarczają także ograniczonych informacji o trzeciorzędowej strukturze RNA i stanowią cenne uzupełnienie analizy filogenetycznej.

II-2.1. Enzymatyczna modyfikacja

Większość endonukleaz (T1, S1) przecina jednociowe fragmenty RNA szybciej niż dwuniciowe [4]. Na tej obserwacji opiera się metoda enzymatycznego mapowania struktury RNA. W tym celu znakowany RNA poddaje się trawieniu endonukleazą w warunkach natywnych i powstałe fragmenty RNA analizuje



Ryc. 1. Graficzna metoda rozróżnienia oddziaływań drugo- i trzeciorzędowych na przykładzie tRNA. Sekwencję tRNA przedstawia się w formie graficznej, jak pokazano na powyższej rycinie. Nukleozydy oddziałujące (przedstawione na rysunku jako kropki) z sobą poprzez wiązania wodorowe łączą się liniami. Jeśli linie nie przecinają się to jest to oddziaływanie drugorzędowe (Ryc. 1a), natomiast, gdy linie się krzyżują świadczy to o oddziaływań trzeciorzędowych w RNA (Ryc. 1b).

się metodą elektroforezy na żelu poliakryloamidowym. Od kilku lat szeroko stosuje się także inną metodę, która wykorzystuje właściwości rybonukleazy H do przecinania jednoniciowego fragmentu RNA na 3-końcu dupletu RNA/DNA. Pozwala to określić jednoniciowe fragmenty występujące w strukturze badanego RNA.

II-2.2. Chemiczna modyfikacja

Analiza struktury drugorzędowej RNA metodą chemicznej modyfikacji może być przeprowadzona dwoma sposobami. Pozwalają one na odróżnienie struktur jednoniciowych i dwuniciowych fragmentów RNA przez reagenty użyte do chemicznej modyfikacji. Pierwsza z metod wykorzystuje zdolność wiązania się niektórych kationów (Pb^{2+} , metali ziem rzadkich) z fragmentami jednoniciowymi RNA, a następnie hydrolizy wiązań fosfodiesterowych [5-7]. Druga metoda określania struktur drugorzędowych wykorzystuje związki chemiczne (na ogół czynniki alkilujące), które specyficznie reagują z fragmentami jednoniciowymi RNA [8, 9]. Oddziaływania z komplementarną nicią chronią nukleotydy uwikłane w wiązania wodorowe i dlatego nie ulegają one chemicznej modyfikacji. Oznaczenie miejsca specyficznej modyfikacji nukleotydów następuje poprzez zatrzymanie biosyntezy DNA podczas odwrotnej transkrypcji. Zastosowanie elektroforezy na żelu poliakryloamidowym pozwala na określenie miejsc modyfikacji RNA.

II-3. Inne metody określania struktury drugorzędowej

Omówione wcześniej metody są najpowszechniej stosowane i niejako ukierunkowane na ustalanie struktur drugorzędowych RNA. Istnieje także wiele metod pozwalających określić mniej lub bardziej dokładnie struktury trzeciorzędowe RNA oraz pewne elementy ich oddziaływań drugorzędowych. Należą do nich metody: krystalograficzne [10, 11], magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [12], fluorescencyjne i dichroizmu kołowego.

III. Metody przewidywania struktur drugorzędowych RNA oraz wyznaczania parametrów termodynamicznych określających trwałość termiczną RNA

III-1. Metoda graficzna

W 1970 r. Tinoco i wsp. zaproponowali graficzną metodę ustalania struktury drugorzędowej RNA na podstawie znajomości jego sekwencji (bez uwzględniania wpływu sąsiadujących ze sobą par zasad) [13, 14]. Przyjęto wówczas następujące założenia:

1) entalpia (ΔH) oraz entropia (ΔS) są niezależne od temperatury i powiązane z energią swobodną (ΔG)

równaniem:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

2) tworzenie struktury dwuniciowej zachodzi w dwóch etapach:

- a) tworzenia pierwszej pary zasad (ang. *initiation*),
- b) tworzenia następnych par zasad (ang. *propagation*);

3) oba wymienione etapy tworzenia dupletu składają się na jego całkowitą energię swobodną (ΔG);

4) najbardziej termicznie stabilną jest struktura o najniższej energii swobodnej (ΔG)

5) przejście dupletu \rightarrow łańcuch jednoniciowy zachodzi według schematu „zamka”, tzn. nie ma stanów pośrednich;

6) przyjęto następujące wartości „punktów”, określające stabilność dupletu RNA: G-C (+2), A-U (+1), G-U (0), struktury szpilkowe (od -5 do -7), wybrzuszenia wewnętrzne (od -4 do -7), wybrzuszenia jednostronne (od -2 do -6).

Wartość jednego „punktu” określono jako równą -1.2 kcal/mol (ΔG). Zaproponowany przez Tinoco model zawierał pewne niedoskonałości, wynikające z zastosowanych przybliżeń. Najbardziej błędnym okazało się założenie, że wartości „punktów” określających stabilność dupletów RNA są zawsze takie same dla każdej pary zasad, niezależnie od rodzaju nukleotydów, z którymi one sąsiadują.

III-2. Model najbliższego sąsiedztwa

W roku 1974 Borer, Dengler i Tinoco wykazali, że stabilność termiczna dupletu RNA zale-

	A	U	C	G
U	AA	UA	CA	GA
A	UU	AU	GU	CU
U	AU	UU	CU	GU
A	UA	AA	GA	CA
C	AC	UC	CC	GC
G	UG	AG	GG	CG
G	AG	UG	CG	GG
C	UC	AC	GC	CC

Ryc. 2. Wszystkie możliwe kombinacje parametrów termodynamicznych modelu najbliższego sąsiedztwa dupletów RNA. Na „skrzyżowaniu” par zasad zapisanych pionowo i poziomo otrzymuje się 16 możliwych kombinacji. Pochyłym pismem, szarą czcionką przedstawiono 10 możliwych kombinacji, pozostałe to układy powtarzające się.

zy nie tylko od długości łańcucha i składu nukleozydowego, ale przede wszystkim od sekwencji czyli najbliższego sąsiedztwa danej pary zasad [15]. Stwierdzili mianowicie, że wartości temperatur topnienia pięciu różnych heksamerów RNA, posiadających po dwie pary G·C i po cztery pary A·U zawierały się pomiędzy -1.3°C i +28.3°C. Uzyskane wyniki dowodziły, że istotna jest także sekwencja dupleksu i dlatego zaproponowali model, który uwzględniał sekwencje pary zasad znajdującej w najbliższym sąsiedztwie. Nazwali go modelem najbliższego sąsiedztwa (ang. *nearest neighbour model*).

Sekwencję dowolnego dupleksu RNA można „zapisać” za pomocą 10 możliwych kombinacji, bowiem każda para zasad typu Watsona-Cricka, ze względu na swoje otoczenie, tworzy właśnie 10 możliwych układów (Ryc. 2). Wszystkie parametry termodynamiczne (entalpia ΔH , entropia ΔS , energia swobodna ΔG) zostały wyznaczone w roku 1986 przez F r e i e r [16], dzięki rozwiązaniu układu równań z 12 niewiadomymi. Parametry termodynamiczne uzyskano w oparciu o wyniki topnienia 45 różnych dupleksów RNA. W ostatnim czasie rozszerzono zbiór analizowanych dupleksów RNA do 90 [17]. Wprowadzono także dodatkowy parametr termodynamiczny rozróżniający dupleksy RNA mające pary zasad G-C i A-U w pozycji terminalnej (Tab. 1).

Do obliczenia parametrów termodynamicznych określających trwałość termiczną dupleksu RNA (np.: energii swobodnej $\Delta G^\circ_{\text{dupleksu}}$) należy uwzględnić cztery składniki: parametr związany z inicjacją tworzenia dupleksu ($\Delta G^\circ_{\text{inicjacji}}$), parametr związany z propagacją dupleksu ($\Delta G^\circ_{\text{propagacji}}$), parametr symetrii zależny od tego, czy tworzący się dupleks jest samokomplementarny czy niesamokomplementarny ($\Delta G^\circ_{\text{symetrii}}$), parametr uwzględniający efekt terminalnej pary A-U ($\Delta G^\circ_{\text{terminalnej pary zasad}}$). Energia swobodna ($\Delta G^\circ_{\text{dupleksu}}$) dowolnego oligorybonukleotydu jest więc sumą czterech cząstkowych energii swobodnych:

$$\Delta G^\circ_{\text{dupleksu}} = \Delta G^\circ_{\text{inicjacji}} + \Delta G^\circ_{\text{propagacji}} + \Delta G^\circ_{\text{symetrii}} + \Delta G^\circ_{\text{terminalnej pary zasad}}$$

Eksperymentalnie zmierzone wartości entalpii (ΔH°) oraz entalpii (ΔS°) służą do obliczenia energii swobodnej dla temperatury 37°C (ΔG°_{37}) w oparciu o następującą zależność:

$$\Delta G^\circ_{37} = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = \Delta H^\circ - 310.15\Delta S^\circ$$

IV. Metody pomiaru parametrów termodynamicznych dupleksów RNA

Istnieją dwie metody pozwalające na pomiar parametrów termodynamicznych RNA:

1) metoda optyczna (topnienie monitorowane zmianą właściwości UV dupleksu), ang. *UV melting technique*

2) metoda kalorymetryczna (różnicowa kalorymet-

Tabela 1.

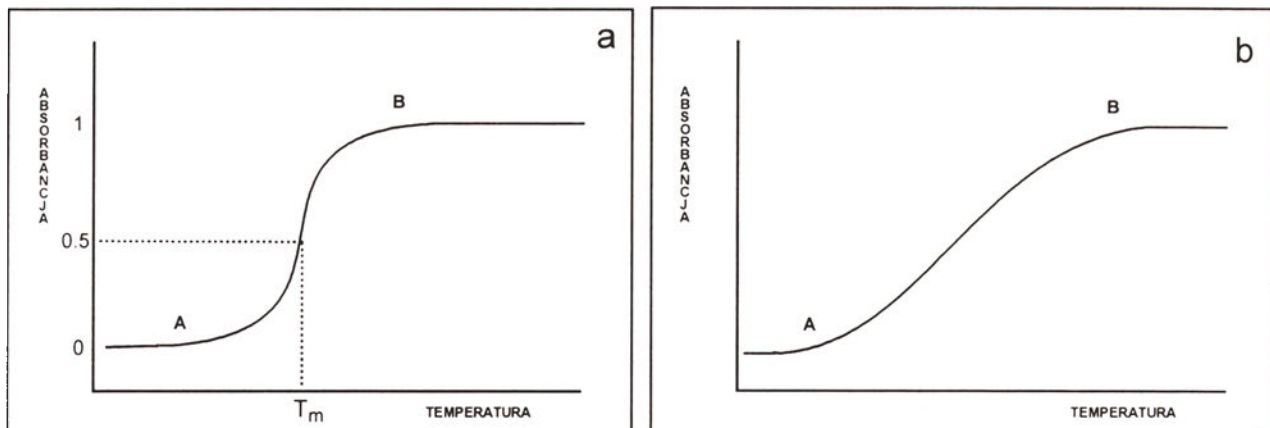
Parametry termodynamiczne (entalpia, entalpia i energia swobodna) określające trwałość dupleksów RNA obliczone na podstawie modelu najbliższego sąsiedztwa [17].

Sekwencja	ΔH° kcal/mol	ΔS° eu	ΔG°_{37} kcal/mol
AA	-6.82	-19.0	-0.93
UU	-6.82	-19.0	-0.93
AU	-9.38	-26.7	-1.10
UA	-9.38	-26.7	-1.10
UA	-7.69	-20.5	-1.33
AU	-7.69	-20.5	-1.33
CA	-10.44	-26.9	-2.11
GU	-10.44	-26.9	-2.11
CU	-10.48	-27.1	-2.08
GA	-10.48	-27.1	-2.08
GA	-12.44	-32.5	-2.35
CU	-12.44	-32.5	-2.35
GU	-11.40	-29.5	-2.24
CA	-11.40	-29.5	-2.24
CG	-10.64	-26.7	-2.36
GC	-10.64	-26.7	-2.36
GC	-14.88	-36.9	-3.42
CG	-14.88	-36.9	-3.42
GG	-13.39	-32.7	-3.26
CC	-13.39	-32.7	-3.26
Inicjacja	3.61	-1.5	4.09
Terminalna para AU	3.72	10.5	0.45
Korekcja symetrii (samokomplementarny)	0	-1.4	0.43
Korekcja symetrii (niesamokomplementarny)	0	0	0

ria skaningowa), ang. *differential scanning calorimetry (DSC)*

IV-1. Metoda topnienia dupleksów

Przejsie pomiędzy formą natywną (dwuniciową) i zdenaturowaną (jednoniciową) dupleksu RNA jest monitorowane przez zmianę absorpcji UV [15-17]. Zależność zmiany absorbancji UV i temperatury pomiaru wyznacza tzw. krzywą topnienia dupleksu (Ryc. 3). Pomiar zmiany absorbancji dupleksu prowadzi się przy długości fali 260 nm dla dupleksów zawierających głównie pary A·U lub przy 280 nm dla dupleksów zawierających głównie pary G·C, a obserwowana zmiana absorbancji jest funkcją temperatury i prowadzi do otrzymania tzw. krzywych topnienia dupleksu (Ryc. 3). W niskiej temperaturze dwa komplementarne jednoniciowe oligomery oddziałują ze sobą tworząc strukturę helikalną, wraz ze wzrostem temperatury następuje zaburzenie sił stabilizujących strukturę helikalną (oddziaływań wodorowych i warstwowych) i rozplatanie się dupleksu prowadzące do powstawania



Ryc. 3. Krzywe topnienia dupleksów RNA: a) przejście niekooperatywne, b) przejście kooperatywne (A-stan dwuniciowy, B-stan jednoniciowy). Punkt T_m odpowiada temperaturze topnienia dupleksu.

fragmentów jednoniciowych. Zerwanie oddziaływań wodorowych i warstwowych fizycznie przejawia się przejściem struktury dwuniciowej w jednoniciową, a spektroskopowo wzrostem absorbancji przy długości fali, dla której dokonano pomiaru (260 lub 280 nm). Rycina 3a pokazuje typowy profil korelacji absorbancji RNA i temperatury, będący rezultatem termicznego zaburzenia struktury helikalnej i przejścia w stan jednoniciowy. Dla określonego stężenia dupleksu temperaturę dla której $\alpha = 0.5$ nazywa się temperaturą topnienia (T_m) (ang. *melting temperature*), fizycznie oznacza to temperaturę, w której 50% dupleksu ulega rozpleceniu. Temperaturę topnienia dupleksu dla stężenia $10^{-4}M$ przyjmuje się jako porównawczą dla trwałości termicznej różnych dupleksów i oznaczaną przez T_M .

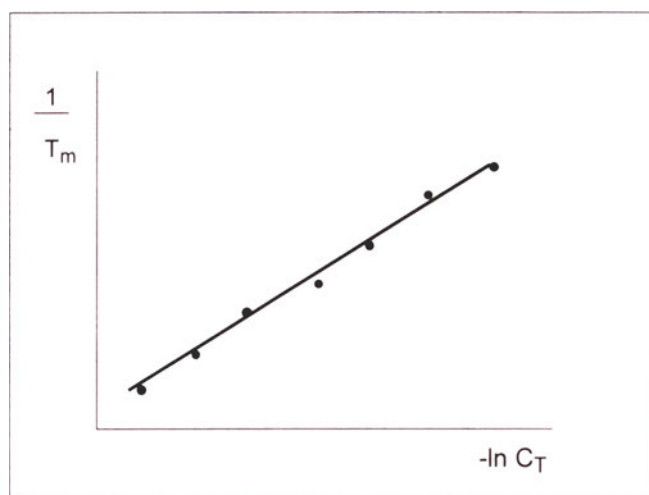
Dla obliczenia wartości entalpii (ΔH°) ważne jest „ustalenie” linii podstawowej krzywej topnienia, gdyż może to w istotny sposób zmienić jej wartość. Z tego też powodu dla uzyskania poprawnych wyników ważne jest rozpoczęcie topnienia oligomeru w temperaturze $0^\circ C$ i zakończenie w $90^\circ C$. Pozwala to uzyskać dobrą dolną i górną linię podstawową, gdyż oligomer w pewnym zakresie niskich i wysokich temperatur utrzymuje odpowiednio strukturę podwójnej lub pojedynczej nici. Trudności w uzyskaniu poprawnej wartości ΔH° mogą wynikać także z charakteru topnienia oligomeru. Jeśli topnienie przebiega wg modelu dwustanowego, to uzyskuje się zazwyczaj poprawne linie podstawowe. Takie przejście nazywane jest kooperatywnym i charakteryzuje się tym, iż zmiana absorbancji, związana z przejściem ze stanu dwuniciowego do jednoniciowego, odbywa się w wąskim zakresie temperatur (Ryc. 3a). Jeśli jednak topnienie dupleksu przebiega z tworzeniem pewnej populacji stanów przejściowych, to przejście zachodzi w znacznie szerszym zakresie temperatur, a sama krzywa nie wykazuje charakterystycznego „skoku”. Takie przejście nazywane jest niekooperatywnym (Ryc. 2b).

Tworzenie dupleksu z dwóch samokomplementarnych lub niesamokomplementarnych jednoniciowych oligomerów RNA jest procesem dwucząsteczkowym,

co można obserwować przez liniową zależność temperatury topnienia (T_m) od stężenia oligomeru ($\ln C_T$) (Ryc. 4). Zależność $\ln C_T$ od $1/T_m$ umożliwi obliczenie wartości entalpii (ΔH°) i entropii (ΔS°) dla przejścia dupleksu w strukturę jednoniciową. Na rycinie 3 nachylenie prostej jest równe $2.3R/\Delta H$, a rzędna jest równa $\Delta S/\Delta H$. Są one powiązane z energią swobodną (na ogół obliczoną dla temperatury $37^\circ C$ i oznaczoną jako ΔG°_{37}) i stałą równowagi (K) następującą zależnością:

$$\Delta G^\circ_{37} = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Z wykorzystaniem parametrów termodynamicznych modelu najbliższego sąsiedztwa [16, 17], możliwe jest obliczenie wszystkich parametrów termodynamicznych oraz temperatury topnienia dowolnego samokomplementarnego lub niesamokomplementarnego dupleksu. Przeciętne rozbieżności pomiędzy parametrami termodynamicznymi przewidywanymi na podstawie modelu najbliższego sąsiedztwa, a otrzymanymi eksperymentalnie wynoszą dla entalpii 6.0%, entropii 1.5%, a stałej równowagi 1.5%.



Ryc. 4. Zależność odwrotności temperatury topnienia ($1/T_m$) od całkowitego stężenia oligorybonukleotydu ($\ln C_T$). Liniowa zależność świadczy o dwustanowym charakterze przejścia dupleks \leftrightarrow struktura jednoniciowa. Z zależności tej obliczyć można entalpię (ΔH) i entropię (ΔS) tego przejścia.

pii 6.8%, energii swobodnej 3.2% i temperatury topnienia 1.3°C.

Dla samokomplementarnego dupleksu RNA temperaturę topnienia T_m oblicza się z zależności [13-15]:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = \frac{\Delta H^{\circ}}{\Delta S^{\circ} + R \ln(C_1)} - 273.15$$

gdzie: C_1 stężenie oligomeru obliczone na podstawie absorbancji w temperaturze 80°C (jako formy jednociowej).

Dla dupleksu niesamokomplementarnego zasada obliczania parametrów termodynamicznych jest taka sama, różni się jedynie parametrem dotyczącym symetrii dupleksu, natomiast przy obliczaniu temperatury topnienia uwzględnia się inne stężenie oligomeru ($C_1/4$).

Dla niesamokomplementarnego dupleksu RNA temperaturę topnienia T_m oblicza się z zależności [13-15]:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = \frac{\Delta H^{\circ}}{\Delta S^{\circ} + R \ln(C_1/4)} - 273.15$$

IV-2. Metoda kalorymetryczna

Do pomiaru równowagi helisa \longleftrightarrow łańcuch jednociowy wykorzystuje się także metodę różnicowej kalorymetrii skaningowej (ang. *differential scanning calorimetry* — DSC) [19]. W metodzie kalorymetrycznej dla monitorowania przejść fazowych mierzy się ciepło właściwe związane z przejściem dupleksu w formę jednociową. Bada się termicznie indukowane przejście endotermiczne kuwety zawierającej badany oligomer względem kuwety referencyjnej. Mierzona jest ilość energii elektrycznej, jaką należy użyć do podgrzania kuwety eksperymentalnej, aby jej temperatura była taka sama jak kuwety referencyjnej. Pozwala to uzyskać krzywą obrazującą zależność ciepła właściwego od temperatury. W przeciwieństwie do omawianej wcześniej metody optycznej, pomiar wartości ΔH° metodą kalorymetryczną jest niezależny od natury przejścia (tj. czy jest ono kooperatywne czy niekooperatywne). Z pomiaru kalorymetrycznego otrzymujemy bezpośrednio wartość entalpii przejścia. Porównanie wartości entalpii przejścia otrzymanych metodą optyczną w oparciu o model van't Hoffa ($\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$) i entalpii przejścia obliczonej z pomiarów kalorymetrycznych ($\Delta H^{\circ}_{\text{cal}}$) pozwala ocenić naturę przejścia. Jeżeli wartość $\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$ jest mniejsza niż $\Delta H^{\circ}_{\text{cal}}$, to należy spodziewać się istotnego udziału stanów pośrednich podczas przejścia helisa \rightarrow łańcuch jednociowy. Jeżeli natomiast obie wartości ΔH są sobie równe, to należy wnioskować, iż przejście helisa \rightarrow łańcuch jednociowy ma charakter dwustanowy. Metoda różnicowej kalorymetrii skaningowej ma kilka ujemnych stron: do pomiarów potrzeba ok. 2-3 mg oligomerów (ok. 50-70 OD₂₆₀), jest to 20 razy więcej niż do pomiarów metodą optyczną, przy stosowanym

wyższym stężeniu oligomeru może dochodzić do jego agregacji, wysokie stężenia oligomerów stosowane do pomiarów kalorymetrycznych znacznie odbiegają od stężeń, w których oligomery występują w układach biologicznych.

V. Podsumowanie

Dla biologicznej funkcji kwasów rybonukleinowych ważna jest ich struktura pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowa. W wielu przypadkach już znajomość struktury drugorzędowej pozwala powiązać właściwości biologiczne ze strukturą RNA. Istnieje kilka metod wyznaczania struktury drugorzędowej, które z różną dokładnością pozwalają określić fragmenty helikalne i niehelikalne RNA. Najbardziej znane metody to analiza filogenetyczna, mapowanie enzymatyczne i chemiczne. Również znajomość uwarunkowań determinujących trwałość termodynamiczną fragmentów helikalnych i niehelikalnych RNA pozwala przewidzieć jego pofałdowanie. Metoda ta oparta jest na modelu najbliższego sąsiedztwa, według którego o trwałości termodynamicznej dupleksu RNA decyduje sekwencja oligomeru, nie tylko suma par zasad A-U i G-C w oligomerze. Zakłada się, że struktura RNA o najniższej energii swobodnej (ΔG) jest strukturą najtrwalszą i najbardziej zbliżoną do biologicznie aktywnej. Potrzebne parametry termodynamiczne (entropia, entalpia i energia swobodna) zostały obliczone na podstawie analizy krzywych topnienia oligorybonukleotydów, obrazujących zmianę absorpcji UV RNA w wyniku jego przejścia ze struktury dwunociowej w jednociową. Należy jednak pamiętać, że równoczesne zastosowanie kilku metod określania struktury drugorzędowej RNA pozwala na uzyskanie najlepszych wyników i najdokładniejsze określenie struktury drugorzędowej RNA.

Podziękowania

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, projekt badawczy 3 T09A 107 10.

Artykuł otrzymano 10 sierpnia 1998 r.
Zaakceptowano do druku 25 lutego 1999 r.

Piśmiennictwo

1. The RNA World (1993) Gesteland RF, Atkins JF (red) Cold Spring Harbor Laboratory Press
2. Chastain M, Tinoco Jr I (1991) *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology* **41**: 131-177
3. Jaeger JA, Santa Lucia Jr J, Tinoco Jr I (1993) *Ann Rev Biochem* **62**: 256-281
4. Lorenz S, Hartmann RK, Piel N, Ulbrich N, Erdmann VA (1987) *Eur J Biochem* **163**: 239-246
5. Butzow JJ, Eichhorn GL (1975) *Nature (Lond)* **254**: 358-359
6. Brown RS, Dewan JC, Klug A (1985) *Biochemistry* **24**: 4785-4801
7. Ciesiołka J, Lorenz S, Erdmann VA (1992) *Eur J Biochem* **204**: 575-581
8. Pan T, Uhlenbeck OC (1992) *Biochemistry* **31**: 3887-3895

9. Banerjee AR, Jaeger JA, Turner DH (1993) *Biochemistry* **32**: 153-163
10. Pley H W, Flaherty K M, McKay DB (1994) *Nature (Lond)* **372**: 68-74
11. Cate JH, Gooding AR, Podell E, Zhou K, Golden BL, Kundrot CE, Cech TR, Doudna JA (1996) *Science* **273**: 1678-1699
12. Chou S-H, Flynn P, Reid B (1989) *Biochemistry* **28**: 2422-2435
13. Tinoco Jr I, Uhlenbeck OC, Levine MD (1971) *Nature (Lond)* **230**: 362-367
14. Tinoco Jr I, Borer PN, Dengler B, Levine MD, Uhlenbeck OC, Crothers DM, Gralla J (1973) *Nature New Biology* **246**: 40-41
15. Borer PN, Dengler B, Tinoco Jr I, Uhlenbeck OC (1974) *J Mol Biol* **86**: 843-853
16. Freier SM, Kierzek R, Jaeger JA, Sugimoto N, Caruthers MH, Neilson T, Turner DH (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 9373-9377
17. Xia T, Santa Lucia Jr J, Burkard ME, Kierzek R, Schroeder SJ, Jiao X, Cox C, Turner DH (1998) *Biochemistry* **37**: 14719-14735
18. Serra M J, Turner DH (1995) *Methods in Enzymology* **259**: 242-261
19. Freire E, Biltonen R L (1978) *Biopolymers* **17**: 463-485

Drugorzędowe motywy strukturalne RNA

The secondary structural motives of the RNA

KRZYSZTOF ZIOMEK¹
RYSZARD KIERZEK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Podwójna helisa (spirala) RNA
- III. Niesparowania nukleotydów
 - III-1. Pojedyncze niesparowania
 - III-2. Tandemowe niesparowania
 - III-2.1. Tandemowe niesparowania G-U
 - III-2.2. Tandemowe niesparowania G-A
 - III-2.3. Inne tandemowe niesparowania
- IV. 5'- i 3'- - Niesparowane nukleotydy
- V. Terminalne niesparowania nukleotydów
- VI. Terminalna para zasad
- VII. Stabilność podwójnej helisy zawierającej wybrzuszenia
 - VII-1. Wybrzuszenia jednostronne
 - VII-2. Wybrzuszenia dwustronne (wewnętrzne)
 - VII-3. Wybrzuszenia szpilkowe
 - VII-3.1 Wybrzuszenia szpilkowe zawierające czteronukleotydowe pętle
- VIII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ΔG — zmiana energii swobodnej; NMR — magnetyczny rezonans jądrowy; CD — dichroizm kołowy; Y — nukleotyd pirymidynowy; R — nukleotyd purynowy.

I. Wstęp

Kwasy rybonukleinowe zbudowane są z pojedynczego łańcucha, który fałdując się tworzy oprócz fragmentów helikalnych szereg drugo- i trzeciorzędowych motywów strukturalnych. Najpowszechniej wy-

Contents:

- I. Introduction
- II. Double helix
- III. Nucleotides mismatches
 - III-1. Single mismatches
 - III-2. Tandem mismatches
 - III-2.1. G-U tandem mismatches
 - III-2.2. G-A tandem mismatches
 - III-2.3. Other tandem mismatches
- IV. 5'- i 3'- - Dangling ends
- V. Terminal mismatches
- VI. Terminal base pair
- VII. Stability of the double helix containing different types of the loops
 - VII-1. Bulge loops
 - VII-2. Internal loops
 - VII-3. Hairpin loops
 - VII-3.1 Tetraloops
- VIII. Conclusion

stępującym w drugorzędowej strukturze RNA elementem struktury jest podwójna helisa (dupleks, spirala) (ang. *double helix*), zawierająca najczęściej 6-10 par zasad. Najważniejsze niehelikalne motywy strukturalne w RNA to: pojedyncze niesparowania (ang. *single mismatches*), wybrzuszenia jednostronne (ang. *bulges*), wybrzuszenia dwustronne (ang. *internal loops*), 5'- i 3'- niesparowane końce (ang. *3'- and 5'-dangling ends*), terminalne niesparowania (ang. *terminal mismatches*), struktury szpilkowe (ang. *hairpin loops*), współosiowe oddziaływania warstwowe (ang. *coaxial stacking*), pseudowęzły (ang. *pseudoknots*), wybrzuszenia wieloramienne (ang. *multibranch loops*) (Ryc. 1). Wszystkie one determinują całkowitą trwałość termiczną RNA [1].

¹ Dr,² doc. dr hab.; Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12/14, 61-705 Poznań

Poznanie reguł determinujących termiczną trwałość poszczególnych motywów strukturalnych RNA (wpływu ich sekwencji, wielkości, symetrii, sąsiedztwa innych fragmentów RNA) pozwala określić ich wpływ na stabilność całego RNA. Termodynamicznie najtrwalsza jest struktura RNA o najniższej energii swobodnej (ΔG^0_{37}), która jest sumą energii swobodnej fragmentów helikalnych i wszystkich niehelikalnych motywów strukturalnych występujących w cząsteczce RNA.

II. Podwójna helisa (spiralą) RNA

Głównym motywem strukturalnym kwasów rybonukleinowych jest podwójna helisa, utworzona przez komplementarne pary zasad G-C i A-U, występująca w formie A lub A', z konformacją cząsteczek rybozy — C3'-endo. Podwójna helisa RNA składa się z dwóch łańcuchów polirybonukleotydowych ułożonych antyrównolegle względem siebie i skręcających się w prawo wokół wspólnej osi [2]. W cząsteczkach RNA helisy stanowią ponad 50% wszystkich elementów struktury (dla porównania — DNA występuje prawie wyłącznie w formie podwójnej helisy). Wiązania wodorowe i oddziaływania warstwowe to dwa podstawowe oddziaływania determinujące strukturę podwójnej helisy. Na stabilność termodynamiczną helisy RNA ma wpływ jej sekwencja.

III. Niesparowania nukleotydów

III-1. Pojedyncze niesparowania

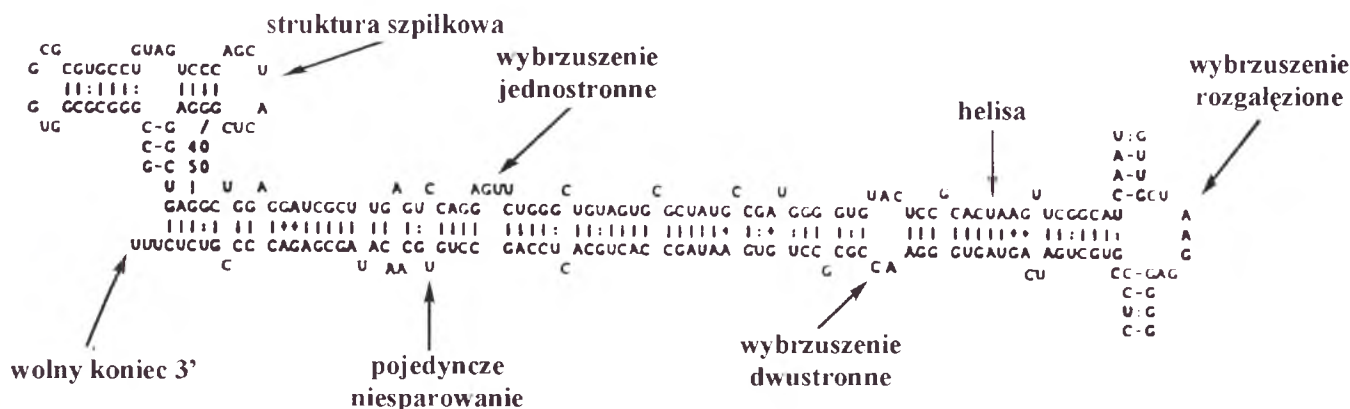
Bardzo często w łańcuchach oligorybonukleotydowych, naprzeciw siebie, występują inne pary zasad niż G i C lub A i U. Powstają wtedy wybrzuszenia utworzone przez pojedyncze nukleotydy, nazywane pojedynczymi niesparowaniami (Ryc. 1) [3]. Występowanie niesparowań G-U i G-A jest szczególnie częste w RNA i zostanie omówione poniżej bardziej szczegółowo.

Stabilizację dupleksu powodują pojedyncze niesparowania G-U oraz G-G. Niesparowanie C-A praktycz-

nie nie ma żadnego wpływu na trwałość termiczną dupleksu, a wszystkie pozostałe wykazują efekt destabilizujący. Wpływ pojedynczych niesparowań zależy od sekwencji nukleotydów znajdujących się po obu stronach niesparowania. Jeśli w obu komplementarnych łańcuchach na 5'-końcu niesparowania znajdują się puryny to dupleks jest zawsze bardziej trwały (o ok. 1.5 kcal/mol) niż w przypadkach, gdy są to pirymidyny. Gdy zamykającymi niesparowanie są pary zasad G-C to efekt zaburzenia trwałości dupleksu jest mniejszy niż dla A-U. Prawidłowość taką obserwowano dla kilku pojedynczych niesparowań (U-U, A-A oraz G-G) i wydaje się być ogólną dla wszystkich pozostałych pojedynczych niesparowań. Ponadto dla dupleksów zawierających to samo niesparowanie oraz te same zamykające pary zasad, jego wpływ na stabilność dupleksu zależy od położenia w oligomerze. „Przesuwanie” niesparowania w kierunku końca helisy powoduje zmniejszenie efektu destabilizacji. Analiza wielu sekwencji 16S i 23S rRNA wykazuje, że najczęściej występują w nich te pojedyncze niesparowania, które w najmniejszym stopniu zaburzają stabilność termiczną dupleksów. Ponadto dla każdego tego typu niesparowania populacja pojedynczych niesparowań, sąsiadujących od 5' końca z guanozyną, jest większa niż z cytydyną. Ciekawym jest także spostrzeżenie, że pojedyncze niesparowania oddzielone są najczęściej 1-2 parami zasad od końców fragmentów niehelikalnych.

Najczęściej spotykanymi pojedynczymi niesparowaniami są G-U i G-A. Na podstawie zebranych wyników eksperymentalnych można określić ich wpływ na stabilność termiczną dupleksu. Stwierdzono że:

1) występowanie pojedynczych niesparowań G-U w pozycji terminalnej dupleksu zwiększa jego trwałość od 1.0 do 1.6 kcal/mol (odpowiada to zwiększeniu trwałości jaką wnosi do dupleksu para A-U), natomiast w pozycji wewnętrznej pary zasad zwiększa trwałość dupleksu od 0.6 do 1.9 kcal/mol, w zależności od otoczenia, w którym występują [3-5]. Spostrzeżenia te sugerują, iż o wpływie G-U na trwałość termiczną dupleksu decydują oddziaływania nie tylko z sąsiadu-



Ryc. 1. Typowe motywy strukturalne występujące w RNA na przykładzie fragmentu ludzkiego SRP-RNAB (ang. *Signal Recognition Particle RNAB*). Na rycinie przedstawiającej strukturę SRP-RNAB strzałkami wskazano motywy strukturalne najczęściej spotykane w RNA i omówione w pracy.

jącymi parami zasad, lecz także oddziaływania wykraczające poza najbliższych sąsiadów G-U (tzw. oddziaływania dalekiego zasięgu).

2) w pojedynczych niesparowaniach G-A [3-6] powstałe wyrzuczenia w szerokim zakresie wpływają na stabilność termiczną dupleksów (obserwowano destabilizację wynoszącą nawet 7 kcal/mol). Ponadto jeśli w tym samym dupleksie występują dwa rozdzielone pojedyncze niesparowania G-A, to efekt destabilizacji zależy od odległości pomiędzy nimi.

III-2. Tandemowe niesparowania

W RNA bardzo często występują dwa niesparowania sąsiadujące bezpośrednio ze sobą, mówimy wtedy o tzw. tandemowych niesparowaniach. Mogą one być także rozpatrywane jako symetryczne podwójne wyrzuczenia, jednak ze względu na ich specyficzność pozwolimy sobie omówić je osobno. Najbardziej rozpowszechnione są tandemowe niesparowania zawierające G-U i G-A.

III-2.1. Tandemowe niesparowania G-U

Szczególnie ciekawe są tandemowe niesparowania typu G-U. Są one jednymi z najczęściej spotykanych w RNA. Dla określenia ich wpływu na trwałość termiczną dupleksu badano wiele modelowych oligorybonukleotydów [7-9]. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że wpływ jaki wywierają tandemowe niesparowania G-U na trwałość dupleksów w dużym stopniu zależy od sekwencji par sąsiadujących z niesparowaniem (tzw. par zamykających niesparowanie). Stwierdzono, że tandemowe niesparowania $\begin{smallmatrix} \text{UG} \\ \text{UG} \end{smallmatrix}$ zawsze stabilizują dupleks (ΔG^0_{37}) o 1.0 do 1.9 kcal/mol i jest to niezależne od sekwencji pary zamykających. Natomiast tandemowe niesparowania $\begin{smallmatrix} \text{GU} \\ \text{GU} \end{smallmatrix}$ stabilizują lub destabilizują dupleks w zależności od sekwencji pary zamykającej niesparowanie. Stwierdzono, że $\begin{smallmatrix} \text{CGUG} \\ \text{GUGC} \end{smallmatrix}$ i $\begin{smallmatrix} \text{UGUA} \\ \text{GUGU} \end{smallmatrix}$ oraz $\begin{smallmatrix} \text{AGUU} \\ \text{UUGA} \end{smallmatrix}$ destabilizują dupleks o 1.0 do 1.6 kcal/mol, natomiast $\begin{smallmatrix} \text{GGUG} \\ \text{CUGC} \end{smallmatrix}$ stabilizuje dupleks o 0.04 do 0.7 kcal/mol. Analiza częstotliwości występowania tandemowych niesparowań G-U w 23S i 16S rRNA [7] wykazuje, że tandemowe niesparowania $\begin{smallmatrix} \text{UG} \\ \text{UG} \end{smallmatrix}$ (które zawsze stabilizują dupleks RNA) występują w nich 98 razy, natomiast tandemowe niesparowania $\begin{smallmatrix} \text{GU} \\ \text{GU} \end{smallmatrix}$ (które na ogół destabilizują dupleks) jedynie 10-krotnie. Widma CD i ^1H NMR są podobne i nie wyjaśniają przyczyn częstotliwości występowania tandemowych niesparowań $\begin{smallmatrix} \text{GU} \\ \text{GU} \end{smallmatrix}$ i $\begin{smallmatrix} \text{UG} \\ \text{UG} \end{smallmatrix}$.

III-2.2. Tandemowe niesparowania G-A

Tandemowe niesparowania G-A podobnie jak G-U są równie częste w RNA. Podobnie jak poprzednio zbadano wiele modelowych oligorybonukleotydów zawierających tandemowe niesparowania G-A i A-G

[10-14]. Pomiary wskazują, że trwałość dupleksów RNA zależy od sekwencji tandemowego niesparowania (A-G lub G-A). Średnia wartość zmiany energii swobodnej (ΔG^0_{37}) wywołana przez $\begin{smallmatrix} \text{GA} \\ \text{AG} \end{smallmatrix}$ wynosi -0.9 kcal/mol, a dla $\begin{smallmatrix} \text{AG} \\ \text{GA} \end{smallmatrix}$ -0.5 kcal/mol. Dla porównania wartość ΔG^0_{37} dla $\begin{smallmatrix} \text{AA} \\ \text{AA} \end{smallmatrix}$ jest równa +1.6 kcal/mol. Aby określić, jak oddziałuje para G-A dokonano substytucji grup funkcyjnych biorących udział w parowaniu G-A. Badania wykazały, że dodatkowe wiązania wodorowe powstające w niesparowaniu GA stabilizują dupleks RNA o 1.4 kcal/mol.

Informacje o strukturze oligorybonukleotydu $(\text{GGCGAGCC})_2$ uzyskano przy pomocy różnych technik dwuwymiarowego NMR [13]. Stwierdzono, że wszystkie nieterminalne rybozy posiadają konformację *C3'-endo*, natomiast wszystkie zasady występują w konformacji *anti*. Cała helisa ma formę A. W obrębie tandemowych niesparowań G-A stwierdzono występowanie wiązań wodorowych, w których w guanozynie biorą udział grupa aminowa w pozycji 2 i atom azotu w pozycji 3. Natomiast w adenozylinie wiązania wodorowe zaangażowana jest grupa aminowa w pozycji 6 oraz atom azotu w pozycji 7. Bardzo charakterystyczne są oddziaływania warstwowe w obrębie G-A. Obserwuje się silne, międzyłańcuchowe oddziaływania G-G i A-A w obrębie tandemowego niesparowania $\begin{smallmatrix} \text{GA} \\ \text{AG} \end{smallmatrix}$, a także słabe warstwowe między G-A i parami G-C sąsiadującymi z niesparowaniem. Obecność tandemowego niesparowania $\begin{smallmatrix} \text{GA} \\ \text{AG} \end{smallmatrix}$ nie wnosi wyraźnych zaburzeń w część helikalną trzeciorzędowej struktury dupleksu $(\text{GGCGAGCC})_2$.

W strukturze $(\text{GCGGACGC})_2$ stwierdzono istnienie iminowych wiązań wodorowych w obrębie niesparowania a także brak wyraźnych zmian w strukturze helikalnej oligorybonukleotydu [14]. Struktury $(\text{GGCGAGCC})_2$ i $(\text{GCGGACGC})_2$ różnią się zasadniczo w obrębie tandemowego niesparowania, potwierdzając tym samym tezę, iż zamiana dwóch par zamykających niesparowanie może mieć radykalny wpływ na strukturę dupleksu poprzez wprowadzenie zupełnie nowych oddziaływań [14].

Przeprowadzono też bardziej szczegółowe badania dotyczące wpływu par zasad sąsiadujących z tandemowym niesparowaniem G-A na trwałość termodynamiczną dupleksu. Badania te wykazały zależność podobną jak w przypadku tandemowych niesparowań G-U, tj. różną trwałość w zależności od sekwencji zamykającej niesparowanie.

W oligorybonukleotydach zawierających sekwencje XGAY wartość ΔG^0_{37} wyrzuczenia wynosi od -2.9 do +2.0 kcal/mol, przy czym wyrzuczenia są najbardziej stabilne gdy XY to GC (średnio -2.7 kcal/mol), a dla XY będących UG lub CG wyrzuczenia GA są nieznacznie stabilizujące. Gdy zamykającymi parami zasad-XY są AU, UA lub GU to obserwuje się destabilizację wyrzuczenia od +0.1 do +2.0 kcal/mol [13].

Po przeanalizowaniu częstotliwości występowania

tandemowych niesparowań G-A w 16S i 23S rRNA można zauważyć, iż najczęściej spotykane są takie aranżacje tandemowych niesparowań GA, które najbardziej stabilizują dupleks, na 142 przypadki 123 stanowiły te, które wносиły największy wkład w trwałość dupleksu.

III-2.3. Inne tandemowe niesparowania

W cząsteczkach RNA najczęściej spotykane są tandemowe niesparowania G-A i G-U, jednakże nie są one jedynymi występującymi. Badania trwałości termodynamicznej wielu oligorybonukleotydów zawierających inne tandemowe niesparowania pozwalają wnioskować, iż ich obecność zmienia stabilność dupleksu od -0.6 do +2.3 kcal/mol [15, 16]. Są to duże różnice, zwłaszcza jeśli uświadomimy sobie, że dla wielu suboptymalnych struktur RNA, zawierających przykładowo 400 nukleotydów, różnice energii swobodnej (ΔG^0_{37}) mogą wynosić tylko kilka kcal/mol [17]. Uzyskane rezultaty sugerują [15], iż istnieją dwa rodzaje tandemowych niesparowań — pierwsze to takie, które stabilizują dupleks RNA i posiadają silne wiązania wodorowe w obrębie niesparowania. Do tej grupy należą niesparowania tandemowe utworzone przez G-A, A-G, G-U, U-G i U-U, stabilizują one dupleks RNA o -0.1 do -0.6 kcal/mol. Drugi rodzaj tandemowych niesparowań destabilizuje dupleks, nie tworzą one wiązań wodorowych w obrębie niesparowania. Do tej grupy należą niesparowania utworzone przez G-G, C-A, A-A, C-U, U-C, C-C i A-C.

W przypadku niesparowań stabilizujących dupleks tworzenie się wiązań wodorowych potwierdziły widma ^1H NMR i substytucja atomowa niektórych grup funkcyjnych zasad heterocyklicznych, natomiast w przypadku niesparowań destabilizujących dupleks, nie stwierdzono oddziaływań poprzez wiązania wodorowe. Zauważyć należy, że niektóre oligorybonukleotydy zmieniają trwałość termodynamiczną w zależności od wartości pH, w której prowadzono pomiar (w standardowych pomiarach wartość pH buforu wynosi 7.0). Na przykład trwałość $(\text{CGCCCGCG})_2$ w pH 5.5 zmienia wartość $\Delta\Delta G^0_{37}$ o -2.5 kcal/mol, a T_M wzrasta o 12 °C w stosunku do warunków standardowych.

Eksperymenty poszerzono także o badania wpływu sekwencji zamykających tandemowe niesparowania na trwałością termodynamiczną dupleksów. Po przebadaniu wielu oligorybonukleotydów zawierających tandemowe niesparowania stwierdzono, że zarówno sekwencje niesparowań jak i pary zasad zamykających niesparowanie mają wpływ na jego trwałość. W oparciu o zebrane wyniki ułożono wszystkie tandemowe niesparowania w „układ okresowy”, w którym zestawiono sekwencje tandemowego niesparowania z sekwencją zamykającą i efektem termodynamicznym jaki wywołuje [15, 16]. Dane te wskazują, że stabilność tandemowych niesparowań maleje w następującym szeregu:



Natomiast wpływ sekwencji zasad zamykających tandemowe niesparowania na trwałość termodynamiczną dupleksów układa się w następującej kolejności:



IV. 5'- i 3'-niesparowane nukleotydy

Często na 3' i (lub) 5' końcach fragmentów helikalnych RNA występują niesparowane nukleotydy. Nazywa się je 5'-niesparowanym końcem (ang. *5'-dangling end*) lub 3'-niesparowanym końcem (ang. *3'-dangling end*) (Ryc. 1). Przeprowadzone badania dotyczące ich wpływu na trwałość termiczną RNA [18-20] pozwalają wyciągnąć następujące wnioski:

- 1) zarówno 5'- jak i 3'-niesparowany nukleotyd stabilizuje trwałość termiczną dupleksu RNA, efekt stabilizacyjny, jaki wnosi do trwałości dupleksu 3'-niesparowany nukleotyd jest większy niż ten, który powoduje 5'-niesparowany nukleotyd;
- 2) wielkość efektu stabilizacji 3'-niesparowanego nukleotydu zależy od sekwencji pary zasad zamykającej strukturę helikalną;
- 3) 3'-niesparowany nukleotyd w dupleksie zakończonym $\square^{\text{A}}\text{X}$ stabilizuje dupleks bardziej niż gdy zakończony jest $\square^{\text{U}}\text{X}$. W przypadku obydwu dupleksów, gdy X jest puryną efekt stabilizacji dupleksu jest większy niż gdy X jest pirymidyną;
- 4) w przypadku 3'-niesparowanego nukleotydu układ $\square^{\text{C}}\text{X}$ stabilizuje dupleks bardziej niż $\square^{\text{G}}\text{X}$. Tutaj także, gdy X jest puryną to efekt stabilizacji dupleksu jest większy niż gdy X jest pirymidyną;
- 5) efekt 5'-niesparowanego końca jest prawie stały dla wszystkich dupleksów RNA i nie zależy od rodzaju nukleotydu i od sekwencji zamykającej helise.

Efekt stabilizacyjny 3'-niesparowanego końca tłumaczy się tym, iż 3'-niesparowany nukleotyd znajduje się w przestrzeni dokładnie nad przeciwległym łańcuchem RNA i przez to jego oddziaływanie warstwowe jest zbliżone do tego, jakie występuje w terminalnej parze zasad. Brak jest natomiast oddziaływań wodorowych, dlatego efekt termodynamiczny wnoszony przez 3'-niesparowany koniec jest mniejszy niż ten, jaki wnosi terminalna para zasad. Inaczej przedstawia się sytuacja dla 5'-niesparowanego nukleotydu, bowiem nie oddziałuje on warstwowo z przeciwległym łańcuchem dupleksu, tym samym efekt termodynamiczny przez niego wnoszony jest o wiele mniejszy.

Analiza różnych RNA sugeruje, iż stabilność wnoszona przez 3'-niesparowany nukleotyd może odgrywać ważną rolę w stabilności trzeciorzędowej struktury RNA. Oto kilka przykładów:

- a) 3'-nukleotydem w stosunku do antykodonu w tRNA jest zawsze nukleotyd purynowy. W stosunku do minihelisy kodon-antykodon występuje on jako 3'-niesparowany nukleotyd. Purynowy 3'-niesparowany nukleotyd purynowy bardziej stabilizuje trwałość

helisy niż pirymidynowy [21].

b) sugeruje się, że supresja amber (UAG) może być spowodowana efektem 3'-niesparowanego nukleotydu, szczególnie że większa supresja obserwowana jest dla UGAR niż dla UAGY (gdzie, Y oznacza nukleotydy pirymidynowy, a R nukleotydy purynowy).

c) efekt 3'-niesparowanego końca uwidacznia się w tRNA. W tRNA 12 nukleotydów bezpośrednio sąsiaduje z fragmentami helikalnymi ramion tRNA. Na podstawie struktury krystalograficznej stwierdzono, że dla 12 przypadków w 7 obserwuje się oddziaływania warstwowe z sąsiadującymi układami helikalnymi. Dokładna analiza tych 7 przypadków wskazuje, że są one usytuowane jako 3'-niesparowane końce i ich wkład w stabilizację fragmentów helikalnych wynosi ok. 1 kcal/mol [20].

V. Terminalne niesparowane nukleotydy

Gdy 5'- i 3'-niesparowane nukleotydy znajdują się naprzeciwko siebie i gdy nie są to pary GC lub AU, to mówimy wtedy o terminalnych niesparowaniach [4, 22]. W przypadku terminalnych niesparowań pirymidyna-pirymidyna oraz CA parametry termodynamiczne są sumą wartości wnoszonych przez oba 3'- i 5'-niesparowane nukleotydy. Natomiast dla terminalnych niesparowań puryna-puryna te oddziaływania są mniejsze. Nie ma termodynamicznych dowodów na oddziaływanie zasad w pozycji terminalnych niesparowań, wyjątkiem jest GU, gdzie obserwowany efekt jest większy niż wynikałoby to z sumy efektów 5'- i 3'-niesparowanych nukleotydów. Badania wykazały, że terminalna para GU wzmacnia trwałość dupleksu RNA o 1.4 do 2.3 kcal/mol, co odpowiada efektowi pary AU i jest to około 1 kcal/mol mniej niż dla pary GC.

VI. Terminalna para zasad

Model najbliższego sąsiedztwa zakłada, że stabilność termiczna wewnętrznych i terminalnych par zasad w dupleksie jest taka sama. Wcześniej sądzono, iż terminalna para zasad jest mniej stabilna niż wewnętrzna, co tłumaczono ekspozycją wiązań wodorowych do wody otaczającej oligomer [23]. Jakkolwiek P a p a n i c o l a o u i w s p. nieco później sugerowali, że jest to teoria niesłuszna [24].

Powtórna analiza parametrów termodynamicznych dla 90 różnych oligorybonukleotydów wykazała, że najlepszą zgodność danych eksperymentalnych i teoretycznych uzyskuje się dla modelu, w którym przyjmuje się, że terminalna para AU destabilizuje dupleks RNA o +0.45 kcal/mol [25]. Z tego też powodu w paragrafie omawiającym model najbliższego sąsiedztwa odliczając wartości entalpii, entropii i energii swobodnej dodano parametr uwzględniający sekwencje terminalnej pary zasad.

VII. Stabilność podwójnej helisy zawierającej wybrzuszenia

Wybrzuszenia (pętle, ang. *loops*) są regionami nieparujących się nukleotydów ograniczonych przez jedną lub więcej helis [1]. Istnieją cztery rodzaje wybrzuszeń: wybrzuszenia jednostronne (ang. *bulge loop*), wybrzuszenia dwustronne (wewnętrzne) (ang. *internal loop*), struktury szpilki (ang. *hairpin loop*), wybrzuszenia rozgałęzione (ang. *multibranch loop, junction*).

Wybrzuszenia występują głównie w RNA, cząsteczka DNA jest zasadniczo podwójną helisą i jedynie sporadycznie tworzy struktury wybrzuszone. Określenia efektów termodynamicznych wywołanych przez wybrzuszenie (np.: $\Delta G^0_{37 \text{ wybrzuszenia}}$) dokonuje się przez pomiar parametrów termodynamicznych oligorybonukleotydu zawierającego wybrzuszenie i odjęciu od nich parametrów termodynamicznych zmierzonych dla oligorybonukleotydu bez wybrzuszeń oraz uwzględnieniu parametrów termodynamicznych modelu najbliższego sąsiedztwa, które zostały zaburzone przez obecność wybrzuszenia. Na przykład:

$$\Delta G^0_{37 \text{ wybrzuszenia A}} = \Delta G^0_{37}(\text{GCG} \cdots \text{GCG}) - \Delta G^0_{37}(\text{GCGGCG}) + \Delta G^0_{37}(\text{GC})$$

VII-1. Wybrzuszenia jednostronne

Wybrzuszenia jednostronne powstają wtedy, gdy niesparowane nukleotydy znajdują się tylko w jednym łańcuchu podwójnej helisy (Ryc. 1). W naturalnych RNA najczęstszym przypadkiem wybrzuszenia jednostronnego jest takie, które zawiera tylko jeden nukleotyd i jest to najczęściej adenozyne. Sądzi się, iż fakt ten jest ważny dla oddziaływania RNA z białkami oraz tworzenia struktury przestrzennej RNA. Chemiczna modyfikacja cząsteczek RNA sugeruje, że struktura wybrzuszenia jednostronnego może być zależna od sekwencji zamykających par zasad [26]. Badania NMR wskazują, że gdy wybrzuszonym nukleotydem jest adenozyne to interkaluje ona z helisą RNA (ang. *bulge-in*), natomiast dla wybrzuszeń tworzonych przez C i U nukleotydy istnieje poza strukturą helikalną (ang. *bulge-out*).

Badania wielu modelowych oligorybonukleotydów [27] pozwoliło sformułować prawidłowości, które określają wpływ sekwencji, wielkości wybrzuszenia oraz par zasad sąsiadujących z wybrzuszeniem na trwałość dupleksu RNA. Stwierdzono, że:

- 1) wszystkie wybrzuszenia jednostronne destabilizują dupleks;
- 2) wybrzuszenia A i U zawierające taką samą ilość nukleotydów destabilizują dupleks RNA w podobnym stopniu;
- 3) wybrzuszenia A₃ mniej destabilizują dupleks, gdy sekwencją fragmentu helikalnego jest $\begin{matrix} \text{GCG} & \text{CGC} \\ \text{CGC} & \text{GCG} \end{matrix}$ niż $\begin{matrix} \text{GCG} \\ \text{CGC} \end{matrix}$. Dla wybrzuszeń A i A₂ nie ma to dużego znaczenia,

ale dla A_3 jest korzystniej wtedy, gdy jest ono ulokowane pomiędzy $G(A_3)G$ niż $C(A_3)C$. Różnica energii swobodnej wynosi około 2 kcal/mol;

- 4) oddziaływania dalszego zasięgu niż z najbliższym sąsiadem mogą mieć wpływ na trwałość termodynamiczną dupleksu zawierającego wybrzuszenie. Dla przykładu, wybrzuszenia w $GCGA_nGCCA$ destabilizują dupleks o 2 kcal/mol bardziej niż w $GCGA_nGUCA$. Zmiany dwóch par zasad nie sąsiadujących bezpośrednio z wybrzuszeniem wywołują istotną zmianę w trwałości termicznej dupleksu.
- 5) dłuższe wybrzuszenia nukleotydowe nie zawsze destabilizują dupleks bardziej niż wybrzuszenia krótsze;
- 6) wybrzuszenia wywołują „zgięcie” struktury dupleksu RNA;
- 7) wybrzuszenia powodują zmniejszenie oddziaływań warstwowych w dupleksie.

VII-2. Wybrzuszenia dwustronne (wewnętrzne)

Wybrzuszenia dwustronne powstają wtedy, gdy podwójna helisa jest przerywana przez nukleotydy znajdujące się naprzeciw siebie w równoległych łańcuchach i nie tworzące pary Watsona-Cricka (Ryc. 1). O wielkości wybrzuszenia dwustronnego informuje ogólna liczba nukleotydów w wybrzuszeniu. Wybrzuszenia są symetryczne, gdy liczba niesparowanych nukleotydów jest taka sama w obu łańcuchach, a niesymetryczne gdy liczba ta jest różna. Osobną grupę dwustronnych wewnętrznych wybrzuszeń stanowią przypadki, gdy w dupleksie naprzeciw siebie mamy jedynie po jednym niesparowanym nukleotydzie (pojedyncze niesparowania).

Na podstawie pomiarów dotyczących termodynamicznej stabilności dupleksów RNA zawierających dwustronne wewnętrzne wybrzuszenia można wyciągnąć następujące wnioski [28-30]:

- 1) wewnętrzne wybrzuszenia destabilizują dupleks;
- 2) symetryczne wybrzuszenia destabilizują dupleks mniej niż asymetryczne. Różnica w destabilizacji wywołanej przez asymetryczne i symetryczne wybrzuszenia zależy od sekwencji wybrzuszenia i od sekwencji fragmentów helikalnych zamykających wybrzuszenie. Różnice te wynoszą ok. 0.9 kcal/mol. Analiza częstotliwości występowania dwustronnych wewnętrznych wybrzuszeń w 16S i 23S rRNA potwierdza, że dwustronne wybrzuszenia mniej destabilizujące dupleks występują częściej;
- 3) stabilność termiczna wybrzuszenia nie zależy w prosty sposób od wielkości wybrzuszenia ani oddziaływań warstwowych z pierwszą parą zasad tworzącą dupleks.

VII-3. Wybrzuszenia szpilkowe

Struktury szpilkowe powstają wtedy, gdy łańcuch kwasu nukleinowego „zwinie się z powrotem” i utwo-

rzy dupleks, pozostawiając niesparowane nukleotydy w pętli (Ryc. 1). Proces tworzenia się struktur szpilkowych jest procesem jednocząsteczkowym.

Parametry termodynamiczne struktur szpilkowych określa się podobnie jak dla struktur dwuniciowych omówionych wcześniej. Przejścia fazowe w strukturach szpilkowych są bardzo kooperatywne, co umożliwia w sposób prosty ustalenie linii podstawowej, a T_m nie zależy od stężenia oligorybonukleotydów.

Na podstawie dostępnych danych termodynamicznych [31-34], dotyczących trwałości struktur szpilkowych, można wyciągnąć następujące wnioski:

- 1) energia swobodna tworzenia się pętli w strukturze szpilkowej jest zawsze niekorzystna ($\Delta G_{3,7 \text{ pętli}}^0$ dodatnie);
- 2) dla RNA najkorzystniejszymi strukturami szpilkowymi, tzn. powodującymi najmniejszą destabilizację są pętle składające się z 4-6 nukleotydów;
- 3) trwałość struktur szpilkowych zależy od: wielkości i sekwencji pętli, sekwencji par zasad sąsiadujących z pętlą, sekwencji par zasad zamykającej dupleks, sekwencji i długości dupleksu budującego trzon (fragment helikalny) struktury szpilkowej.

Struktury szpilkowe spotykane są bardzo często w naturalnych RNA. Na przykład, blisko 70% całego RNA w 16S rRNA z *E. coli* występuje w formie małych struktur szpilkowych, w których dla 85% par zamykających trzon jest G-C lub C-G [34]. Badania termodynamiczne struktury szpilki o sekwencji GGXAUA-AUAYCC, gdzie X i Y były odpowiednio parami: CG, GC, AU, UA, GU, UG [32-34] umożliwiają porównanie energii swobodnej tworzenia pętli ($\Delta G_{3,7 \text{ pętli}}^0$). Otrzymane dla sześciu struktur szpilkowych wyniki pozwalają stwierdzić, że:

- 1) stabilność struktury szpilkowej zależy od pary zamykającej trzon;
- 2) struktury szpilkowe należy podzielić na dwa rodzaje:
 - a) struktury szpilkowe, w których dupleks zamykają pary GC, CG lub GU i energia swobodna ($\Delta G_{3,7}^0$) tworzenia się pętli wynosi średnio 3.4 kcal/mol;
 - b) struktury szpilkowe, w których dupleks zamykają pary AU, UA lub UG i energia swobodna ($\Delta G_{3,7}^0$) tworzenia się pętli wynosi średnio 4.6 kcal/mol.

Wytłumaczeniem różnicy w energii swobodnej tworzenia się pętli struktur szpilkowych wymienionych powyżej może być występowanie dodatkowego wiązania wodorowego dla struktur szpilkowych, w których trzon szpilki zamknięty jest przez pary G-C, C-G i G-U.

VII-3.1. Wybrzuszenia szpilkowe zawierające czteronukleotydowe pętle

Metoda filogenetyczna oparta na analizie sekwencyjnej prowadzi do powstania drugorzędowych struktur rRNA, w których bardzo często występują struktury szpilkowe zawierające czteronukleotydowe pętle

[34]. Stanowią one 55% wszystkich struktur szpilkowych występujących w rRNA. Druga najczęściej spotykana rodzina struktur szpilkowych zawiera pięcionukleotydową pętlę i stanowi 13% całej populacji. Dla 23S rRNA czteronukleotydowe pętle stanowią 38%, a pętle pięcionukleotydowe 24% całej populacji struktur szpilkowych.

Czteronukleotydowe pętle typu GNRA i UNCG (gdzie N=A, C, G lub U, a R=A lub G) są często spotykane w strukturach szpilkowych 16S i 23S rRNA [34]. Przypuszczano, że jedną z przyczyn częstego ich występowania może być ich trwałość termiczna, dlatego przebadano wiele struktur szpilkowych należących do tej rodziny. Z analizy danych [31] wynika, że pętla UUCG jest najbardziej stabilna z badanych, energia swobodna pętli ($\Delta G^0_{3,7 \text{ pętli}}$) wynosi +1 kcal/mol. Drugą pod względem stabilności jest UACG, dla której $\Delta G^0_{3,7 \text{ pętli}}$ jest równe +1.6 kcal/mol. Przypomnijmy, że dla innych struktur szpilkowych, energia swobodna pętli ($\Delta G^0_{3,7 \text{ pętli}}$) zawarta jest pomiędzy +3.4 i +4.6 kcal/mol. Dane te demonstrowają, iż dla pętli czteronukleotydowych istotna jest sekwencja wybrzuszenia oraz sekwencja par zasad zamykających trzon struktury szpilkowej. I tak na przykład zamknięcie trzonu szpilki parą C-G zamiast G-C zwiększa trwałość ($\Delta G^0_{3,7 \text{ pętli}}$) o 1.9 kcal/mol.

Przyjmuje się, że pętle czteronukleotydowe mogą termodynamicznie stabilizować strukturę szpilkową (dane eksperymentalne wykazują, że $\Delta \Delta G^0_{3,7 \text{ pętli}}$ wynosi około -2.5 kcal/mol) oraz być ważne dla oddziaływań z innymi fragmentami rRNA lub innymi biomolekułami i wywoływać zmiany w oligomerze, w którym się znajdują.

VII. Podsumowanie

Kwasy rybonukleinowe, w przeciwieństwie do kwasów deoksynukleinowych, oprócz fragmentów helikalnych zawierają wiele fragmentów niehelikalnych (tzw. motywy strukturalne RNA). Wszystkie one determinują drugorzędową i trzeciorzędową strukturę RNA. Najważniejsze niehelikalne motywy strukturalne RNA to: pojedyncze niesparowania, wybrzuszenia jednostronne, wybrzuszenia dwustronne, 5'- i 3'- niesparowane końce, terminalne niesparowania par zasad, struktury szpilkowe, współosiowe oddziaływania warstwowe, pseudowęzły, wybrzuszenia wieloramienne. Wszystkie one wpływają na trwałość termodynamiczną dupleksów RNA, w których się znajdują. Pozwala to określić ogólne ilościowe zależności determinujące trwałość termodynamiczną RNA. Uzyskane parametry termodynamiczne (entropia, entalpia i energia swobodna) zostały włączone do tzw. programu Zucker'a służącego do przewidywania pofałdowania dużych cząsteczek RNA. Na podstawie pomiarów stwierdzono, że: (i) większość motywów strukturalnych RNA destabilizuje helisę, w której się znajduje, (ii) wielkość efektu destabilizującego wywołanego przez

motywy strukturalne RNA zależy od sekwencji i długości niesparowania lub wybrzuszenia, sekwencji i orientacji par zasad sąsiadujących z niesparowaniem lub wybrzuszeniem, położenia niesparowania lub wybrzuszenia w dupleksie RNA, (iii) w naturalnych RNA występują przeważnie takie rodzaje motywów strukturalnych, które spośród możliwych w najmniejszym stopniu destabilizują RNA.

Podziękowania

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych — projekt badawczy 3 T09A 107 10.

Artykuł otrzymano 10 sierpnia 1998 r.

Zaakceptowano do druku 25 lutego 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Serra MJ, Turner DH (1995) *Methods in Enzymology* **259**: 242-261
2. Saenger W (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, str. 242-252
3. Kierzek R, Burkhard ME, Turner DH — w druku
4. Freier SM, Kierzek R, Caruthers MH, Neilson T, Turner DH (1986) *Biochemistry* **25**: 3209-3213
5. Sugimoto N, Kierzek R, Freier SM, Turner DH (1986) *Biochemistry* **25**: 5755-5759
6. Morse SE, Draper DE (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 302-306
7. He L, Kierzek R, SantaLucia Jr J, Walter AE, Turner DH (1991) *Biochemistry* **30**: 1124-1132
8. McDowell JA, Turner DH (1996) *Biochemistry* **35**: 14077-14089
9. McDowell JA, He L, Chen X, Turner DH (1997) *Biochemistry* **37**: 8030-8038
10. SantaLucia Jr J, Kierzek R, Turner DH (1990) *Biochemistry* **29**: 8813-8819
11. SantaLucia Jr J, Kierzek R, Turner DH (1991) *J Am Chem Soc* **113**: 4313-4322
12. Walter AE, Wu M, Turner DH (1994) *Biochemistry* **33**: 11349-11354
13. SantaLucia Jr J, Turner DH (1993) *Biochemistry* **32**: 12612-12623
14. Wu M, Turner DH (1996) *Biochemistry* **35**: 9677-9689
15. Wu M, McDowell JA, Turner DH (1995) *Biochemistry* **34**: 3204-3211
16. Xia T, McDowell JA, Turner DH (1997) *Biochemistry* **36**: 12486-12497
17. Jaeger J, Turner DH, Zucker M (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7706-7710
18. Freier SM, Burger BJ, Alkema D, Neilson T, Kierzek R, Turner DH (1983) *Biochemistry* **22**: 6198-6206
19. Freier SM, Sugimoto N, Sinclair A, Alkema D, Neilson T, Kierzek R, Turner DH (1986) *Biochemistry* **25**: 3214-3219
20. Sugimoto N, Kierzek R, Turner DH (1987) *Biochemistry* **26**: 4554-4559
21. Sugimoto N, Sasaki M (1989) *Bull Chem Soc Jpn* **62**: 3745-3747
22. Hickey DR, Turner DCH (1983) *Biochemistry* **24**: 3987-3991
23. Levitt M (1972) *Polymerization in Biological Systems*, Ciba Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam, str. 147-166
24. Papanicolaou C, Gouy M, Ninio J (1984) *Nucleic Acids Res* **12**: 31-44
25. Xia T, SantaLucia Jr J, Burkard ME, Kierzek R, Schroeder SJ, Jiao X, Cox C, Turner DH (1998) *Biochemistry* **37**: 14719-14735
26. Moazed D, Stern S, Noller HF (1986) *J Mol Biol* **187**: 399-416

27. Longfellow CE, Kierzek R, Turner DH (1990) *Biochemistry* **29**: 278-285
28. Pertiz A, Kierzek R, Sugimoto N, Turner DH (1991) *Biochemistry* **30**: 6428-6436
29. Schroeder S, Kim J, Turner DH (1996) *Biochemistry* **35**: 16105-16109
30. Tang RS, Draper DE (1990) *Biochemistry* **29**: 5232-5237
31. Antao VP, Tinoco Jr I (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 819-824
32. Serra MJ, Lyttle MH, Axenson T, Schadt CA, Turner DH (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 3845-3849
33. Serra MJ, Axenson T, Turner DH (1994) *Biochemistry* **33**: 14289-14296
34. Turek C, Gauss P, Thermes C, Groebe DR, Gayle M, Guild N, Stormo G, D'Aubenton-Carafa Y, Uhlenbeck OC, Tinoco Jr I, Brody EN, Gold L (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1364-1368
35. Fountain MA, Serra MJ, Krugh TR, Turner DH (1994) *Biochemistry* **35**: 6539-6548

Mechanizm ekspresji genomu wirusów (+) RNA

Gene expression of positive stranded RNA viruses

MAREK JUSZCZUK¹,
WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI-OSTOJA²,
DANUTA HULANICKA³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktury RNA wpływające na ekspresję genomu wirusowego
- III. Regulacja ekspresji genomu
 - III-1. Regulacja transkrypcyjna
 - III-2. Regulacja translacyjna
 - III-2.1. Inicjacja translacji
 - III-2.2. Czynniki wpływające na inicjację syntezy białek wirusowych
 - III-2.3. Model translacji współzależnej
- IV. Strategie ekspresji genomu wirusowego
 - IV-1. „Mijający” skaning
 - IV-2. Zmiana ramki odczytu
 - IV-3. Odczytywanie kodonu stop
 - IV-4. Ograniczona proteoliza
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. RNA structure and the regulation of gene expression
- III. Regulation of genome expression
 - III-1. Regulation of transcription level
 - III-2. Regulation of translation level
 - III-2.1. Translation initiation
 - III-2.2. Factors affecting of translation initiation
 - III-2.3. Co-dependent translation model
- IV. Strategies of genome expression
 - IV-1. Leaky scanning model of translation
 - IV-2. Frame shift
 - IV-3. Suppression of stop codon
 - IV-4. Proteolytic processing
- V. Final remarks

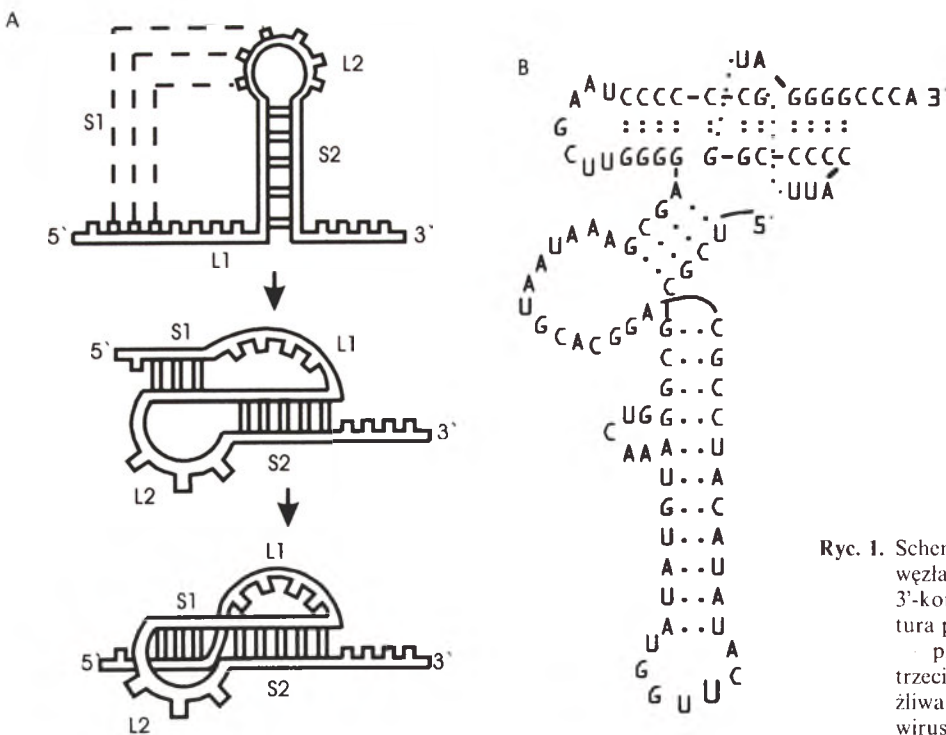
Wykaz stosowanych skrótów: LS — sekwencja liderowa; FS — zmiana ramki odczytu; gRNA — genomowa nić RNA wirusów; sgRNA — subgenomowa nić RNA wirusów; SGP — subgenomowy promotor; VPg — białko kowalencyjnie przyłączone do genomowego RNA; eIF — eukariotyczne czynniki inicjacyjne; GUS — β-glukurunidaza; BMV — wirus mozaiki stokłosy; TYMV — wirus żółtej mozaiki rzepy; AMV — wirus mozaiki lucerny; TMV — wirus mozaiki tytoniu; TRV — wirus kędzierzawki tytoniu; TEV — wirus cętkowanej plamistości tytoniu.

I. Wstęp

Wirusy roślinne o genomie (+)RNA, będącym matrycą w procesie translacji, rozwinęły mechanizmy

zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji, umożliwiające syntezę produktów niezbędnych w cyklu życiowym tych patogenów [1]. Genomowy RNA (gRNA) wirusów koduje obok białek niezbędnych w jego replikacji białka tworzące wiriony, biorące udział w rozprzestrzenianiu się wirusów w roślinie, białka oddziałujące z wektorem i gospodarzem. Ponadto genom zawiera sekwencje kontrolujące rozpoczęcie replikacji, translacji i modulujące ekspresję genów. Mimo stosunkowo prostej organizacji genomów wirusów proces ich ekspresji jest złożony. Wpływa na to wiele czynników, takich jak: ograniczona wielkość genomu, co pociąga za sobą ściśle upakowanie poszczególnych ramek odczytu, a często ich wzajemne nakładanie się, zależność syntezy białek wirusowych od aparatu translacyjnego gospodarza, struktura drugorzędowa i trzeciorzędowa RNA.

¹ Mgr, ^{2,3} prof. dr hab. Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa e-mail: dankahul@ibbrain.ibb.waw.pl



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie struktury pseudowęzła oraz tRNA-podobnej struktury obecnej na 3'-końcu wirusa TMV. A: drugorzędowa struktura pseudowęzła; S1 — pień 1; L1 — pętla 1; S2 — pień 2; L2 — pętla 2; oraz — schemat trzeciorzędowej struktury pseudowęzła. B — możliwa tRNA — podobna struktura 3' końca RNA wirusa TMV.

II. Struktury RNA wpływające na ekspresję genomu wirusowego

Dla przedstawienia mechanizmów ekspresji genomów (+) RNA wirusów konieczne jest omówienie znaczenia przestrzennej struktury RNA. Znaczenie pewnych sekwencji RNA, choćby kontekst zasad wokół kodonu inicjatorowego, czy sygnały decydujące o poliadenylacji znane były od dawna, natomiast wpływ drugo- i trzeciorzędowych struktur RNA na ekspresję genów stał się przedmiotem intensywnych badań dopiero w ciągu ostatnich lat [2]. Wiadomo, że odpowiednie struktury przestrzenne genomowego RNA umożliwiające oddziaływanie z białkami wirusa i gospodarza, kontrolują przebieg cyklu życiowego wirusa. Jednym z dobrze już poznanych zjawisk jest spowalnianie procesów translacji przez struktury pnia i pętli (ang. *stem and loop*). W tej pracy ograniczymy się do krótkiego przedstawienia roli tych elementów przestrzennych, którym ostatnio przypisuje się największe znaczenie, to jest strukturze pseudowęzła i strukturze przypominającej tRNA (ang. *tRNA-like*) [3].

Struktura pseudowęzła przedstawiona jest na rycinie 1. Struktury takie wpływają zarówno na replikację jak i translację wirusów [3]. Pseudowęzły oddziałują na translację zarówno na etapie inicjacji, regulując jej wydajność, jak również na etapie elongacji stymulując zmianę fazy ramki odczytu (ang. *frameshift-FS*) czy odczytywanie kodonów terminujących.

Występowanie struktury przypominającej tRNA, zlokalizowanej po raz pierwszy w regionie 3' nie ulegającym translacji u wirusa żółtej mozaiki rzepy (ang. *turnip yellow mosaic virus — TYMV*) jako tzw. 3' UTR (ang. *3'-untranslated region*). Początkowo uważano, że wpływ struktury "tRNA-like" sprowadza się jedynie do stabilizacji RNA, ale prace grupy Skudrzyńskiej

wykazały, że aminoacylacja końca 3' wpływa na ekspresję genomu [4].

Ponieważ replikacja wirusa zaczyna się od końca 3' sugerowano, że struktura przypominająca tRNA może odgrywać rolę w syntezie ujemnej nici RNA. Potwierdziły to badania *in vitro* replikacji RNA TYMV, które wykazały, że jej brak prowadził do zmniejszenia wydajności syntezy potomnych nici RNA o 50% [5]. Występowanie struktury przypominającej tRNA rodzaju struktur w regionach 3' UTR genomów stwierdzono również u wielu innych wirusów, między innymi u wirusa mozaiki tytoniu (ang. *tobacco mosaic virus — TMV*) [6]. Dlaczego i jak elementy te stymulują translację nie wiadomo, ale izolacja z rośliny białka 102 kDa, specyficznego wiążącego się do regionów 5' i 3' wirusowego RNA i wykazanie, że inaktywacja tego białka w układzie *in vitro* przez swoiste przeciwciała hamuje translację, sugeruje iż 3' UTR zawierające strukturę tRNA podobną kontroluje również translację [7]. Jednakże u wielu wirusów np. u wirusa mozaiki stokłosa (ang. *brome mosaic virus — BMV*) struktury występujące na końcu 3' wpływają głównie na replikację a nie na translację [8].

III. Regulacja ekspresji genomu

Proces ekspresji genomów wirusowych podlega regulacji na etapie transkrypcji, a także posttranskrypcyjnie, czyli na poziomie translacji i ten właśnie etap odgrywa dominującą rolę w regulacji ekspresji genomu (+) RNA wirusów.

III-1. Regulacja transkrypcyjna

Typowym przykładem regulacji ekspresji genów RNA wirusów na poziomie transkrypcji jest synteza

subgenomowych RNA. Subgenomowe RNA (sgRNA) powstają w wyniku wewnętrznej inicjacji transkrypcji na (–) nici RNA. sgRNA koduje 3' proksymalne geny policistronowego wirusowego RNA. Translacja eukariotycznych mRNA rozpoczyna się zwykle od pierwszego 5' końca inicjatorowego kodonu AUG. W policistronowym mRNA odczyt otwartych ramek odczytu (ORF), leżących w rejonie 3' wymaga więc istnienia swoistych mechanizmów. Jednym z nich jest tworzenie sgRNA co „przybliża” dystalne ramki do końca 5', ułatwiając ich translację.

Powstawanie sgRNA stwierdzono u przedstawicieli kilku supergrup wirusów (alpha-, carmo- i sobemo-) o znacznie różniącej się organizacji genomu i mechanizmach ekspresji. Wyniki badań prowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wskazują, że sgRNA jest syntetyzowane pod kontrolą wewnętrznych promotorów przez wirusowe polimerazy RNA zależne od RNA, tzw. replikazy (RdRp).

Promotor sgRNA (SGP) zwykle występuje w tzw. regionie międzycistronowym (ang. *intercistronic region* – IR), ale zdarza się również, że inicjacja transkrypcji zachodzi w 3'-terminalnym regionie genu poprzedzającego IR. Porównanie sekwencji nukleotydowej końców 5' gRNA z sgRNA, przeprowadzone dla wielu wirusów wykazało występowanie regionów homologicznych sięgających od paru do kilkunastu zasad [9]. Zachowawczość sekwencji, zwłaszcza pierwszego nukleotydu końca 5' sgRNA, ma zasadnicze znaczenie [10].

Intesywnie badania prowadzone nad wirusem mozaiki lucerny (ang. *alfalfa mosaic virus AMV*) i BMV [11, 12] doprowadziły do stwierdzenia, że w SGP wyróżnić można dwie domeny tzw. *core promoter* – najmniejszy region umożliwiający rozpoczęcie transkrypcji sgRNA – oraz tzw. regiony wzmacniające (ang. *enhancer*), które wpływają na zwiększenie wydajności transkrypcji.

SGP obejmuje średnio około 150 nt, a przeniesienie tego regionu w inne miejsce genomu inicjuje syntezę sgRNA [11]. Jak już wcześniej wspomniano, genomowe i subgenomowe RNA syntetyzowane są na tej samej matrycy, ujemnej nici RNA. Również struktura końców 3' obu RNA jest taka sama. Jeśli genomowe RNA zakończone jest łańcuchem poliA lub strukturą przypominającą tRNA, to na subgenomowym znajdować się będzie odpowiednio poliA lub struktura przypominająca tRNA.

Jak dotąd niewiele wiadomo o regulacji syntezy sgRNA. Obserwowano modulacje syntezy sgRNA w zależności od miejsca lokalizacji promotora. Na ogół najwydajniej syntetyzowane są te sgRNA, których promotory są zlokalizowane bliżej 3'-końca genomu. Najlepiej poznane są promotory sgRNA dwóch wirusów: AMV i BMV [1].

Subgenomowe RNA często są opłaszczane i występują w wirionach, ale niekiedy np. u luteowirusów, czy potexwirusów w kapsydzie znajduje się tylko

gRNA, a sgRNA syntetyzowane są w komórce roślinnej. W przypadku TMV i wirusa kędzierzawki tytoniu (ang. *tobacco rattle virus* – TRV), z dwóch syntetyzowanych sgRNA, tylko większy sgRNA ulega opłaszczeniu razem z gRNA [1].

III-2. Regulacja translacyjna

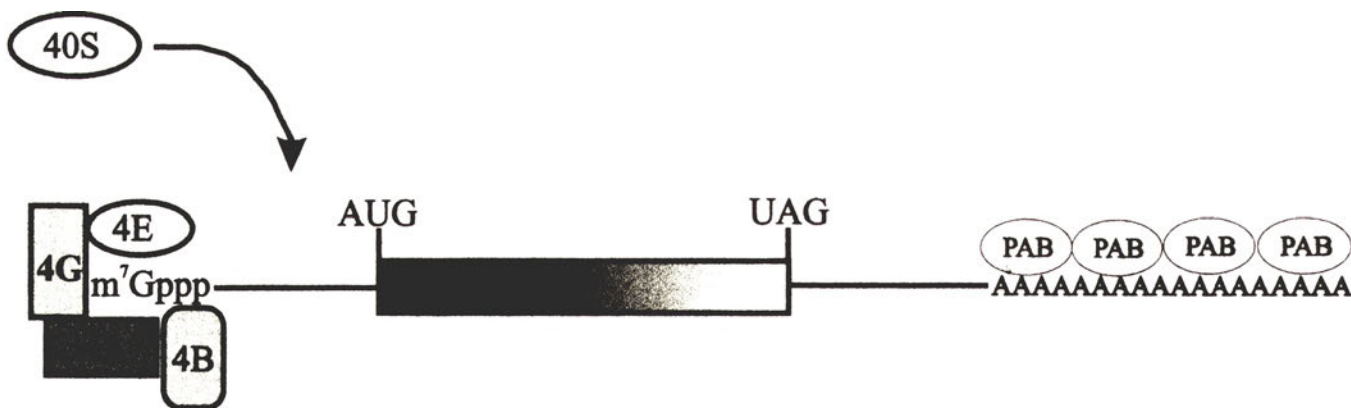
Jak już wcześniej wspomniano translacja odgrywa zasadniczą rolę w modulacji ekspresji genomu (+) RNA wirusów i zależy nie tylko od aparatu translacyjnego gospodarza, ale również od organizacji struktury genomu wirusa. Translacja składa się z trzech etapów, a) inicjacji, kiedy dochodzi do utworzenia kompleksu rybosomalnego 80S i powstania pierwszego wiązania peptydowego; b) elongacji, gdzie ma miejsce translacja rybosomów wzdłuż mRNA z jednoczesną syntezą łańcucha polipeptydowego i c) terminacji – na tym etapie następuje uwolnienie utworzonego peptydu i kompleksu rybosomalnego 80S.

III-2.1. Inicjacja translacji

Głównym etapem, na którym dochodzi do regulacji ekspresji jest inicjacja. U większości (+) RNA wirusów, podobnie jak w przypadku komórkowych mRNA, na końcu 5' znajduje się 7-metyloguanidyna (m^7 Gppp) tzw. cząsteczka *kap*. Translacja rozpoczyna się od przyłączenia do końca 5' mRNA czynników inicjujących (eIF), podjednostki rybosomalnej 40S, do której dołączone są eIF2, met-tRNA i GTP. Powstaje wówczas kompleks rozpoznający, zwany również *ternary complex* (Ryc. 2). Jeden z czynników inicjujących eIF-4F przyłącza się do cząsteczki *kap*, a następnie dołączają się czynniki eIF-4A i eIF-4B, które wykazują aktywność helikazy. Po usunięciu struktury drugorzędowej regionu 5' w wyniku działania helikazy, następuje przesuwanie się kompleksu wzdłuż mRNA w poszukiwaniu kodonu inicjatorowego AUG. W miejscu tym dochodzi do dołączenia drugiej podjednostki rybosomalnej 60S i powstaje aktywny kompleks rybosomalny 80S zdolny do rozpoczęcia translacji. Jest to najczęściej spotykana droga inicjacji translacji eukariotycznych mRNA. Model ten, nazwany „skaningowym” zaproponowany został przez M. Kozaka w 1989 r. [13] i jest ogólnie przyjętym dla organizmów eukariotycznych.

III-2.2. Czynniki wpływające na inicjację translacji

Wpływ zasad otaczających kodon inicjatorowy. Translacja nie zawsze rozpoczyna się od pierwszego napotkanego przez kompleks rybosomalny kodonu AUG. Inicjacja translacji zależy od rodzaju zasad otaczających kodon AUG, czyli jego kontekstu, przy czym największe znaczenie ma pozycja –3 i +4, licząc adeninę A kodonu AUG jako +1. Sekwencja



Ryc. 2. Model tworzenia kompleksu preinicjującego. Skróty przedstawiają odpowiednio: 40S — mała podjednostka rybosomu; m⁷Gppp — struktura *kap*; 4A — inicjatorowy czynnik eIF-4A; 4B — inicjatorowy czynnik eIF-4B; 4E — inicjatorowy czynnik eIF-4E; 4G — inicjatorowy czynnik eIF-4G; PAB — białka wiążące się do poliA; AUG — kodon startu translacji; UAG — kodon terminacji translacji.

CA/GCCAUGG jest optymalnym kontekstem dla eukariotycznych mRNA. W przypadku roślinnych mRNA sekwencja konsensusu inicjacji jest następująca: AACAUUGG [14]. Często się zdarza, że aktywny kompleks mija pierwszy kodon AUG zlokalizowany w „złym” kontekście i rozpoczyna translację od następnego. Jest to tzw. model translacji „przeciekający” często spotykany u wirusów [1].

W pewnych przypadkach inicjacja translacji może zaczynać się od kodonu CUG. Jednakże u wirusów roślinnych kodon AUG jest jedynym inicjatorowym kodonem, z jednym jak dotąd opisanym wyjątkiem. W przypadku wirusa amerykańskiej mozaiki pszenicy (ang. *soil borne wheat mosaic virus* — SBMV) gen białka płaszcza rozpoczyna się kodonem CUG [15]. Grupa dr Rhode’go wykazała, że w układach chimerycznych zawierających lider wirusa TMV i gen reporterowy GUS translacja rozpoczyna się również od kodonu AUU występującego w sekwencji liderowej wirusa [16].

Sekwencje liderowe. Między końcem 5’ genomu a kodonem inicjatorowym znajduje się region nieulegający translacji, zwany sekwencją liderową (SL) lub określanej jako 5’ UTR (ang. — 5’ *untranslated region*). Ten fragment genomu może wpływać na inicjację translacji biernie, przez swą wielkość czy strukturę drugorzędową, ale również aktywnie wiążąc białka regulujące translację. Wielkości sekwencji liderowych są różne, od kilkunastu do kilkudziesięciu nukleotydów (od 9 do 193 nt), najczęściej 40-90 nt. Większość danych o wpływie SL na translację pochodzi z prac nad wirusami RNA. Sekwencje liderowe są często bogate w nukleotydy A-U. Na ogół nie obserwuje się homologii pomiędzy różnymi SL, a zsekwencjonowano ich już kilkadziesiąt [17].

Najwięcej prac ukazało się na temat sekwencji liderowej wirusa TMV, zwanej również sekwencją Ω [18]. Działanie sekwencji Ω jako stymulatora translacji stwierdzono zarówno w systemach *in vitro* jak i *in vivo*. [19-21]. Obecność sekwencji Ω przed wprowadzonym genem tzw. transgena powodowało 4-6-krotny wzrost ilości produktu transgeny [22]. Oczywiście,

wynik ten wzbudził duże zainteresowanie biotechnologów.

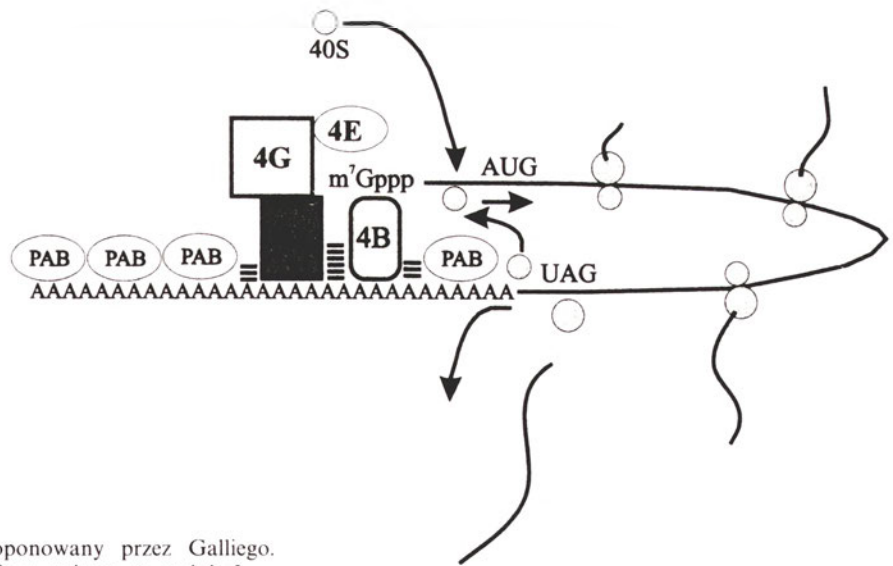
Sekwencje liderowe innych wirusów również wywołują zwiększenie translacji, toteż często są one określane jako stymulatory translacji (ang. *translational enhancer*) [21], ale nie we wszystkich przypadkach SL działa jako stymulator translacji, np. SL TYMV nie wzmaga translacji [23, 24], a niekiedy, jak wykazały nasze prace, SL działa hamująco lub zmienia stosunek syntetyzowanych produktów z poszczególnych ramek [25]. Mechanizm działania SL jako stymulatora translacji nie jest jeszcze znany.

Elementy strukturalne końców genomu. Jak już wyżej wspomniano u większości (+) RNA wirusów na końcu 5’ genomu znajduje się cząsteczka *kap* a koniec 3’ jest poliadenylowany. Ale u wielu wirusów zamiast cząsteczki *kap* znajduje się wirusowe białko VPg (ang. *Viral protein genome linked*) kowalencyjnie dołączone do pierwszego nukleotydu. U niektórych zaś wirusów nie stwierdzono obecności ani cząsteczki *kap* ani białka VPg na końcu 5’ genomu.

Organizacja 3’ UTR genomu wirusów nie zawierających poliA bywa również różna; niekiedy występuje struktura przypominająca tRNA (TMV, TYMV), niekiedy, np. w przypadku luteovirusów koniec 3’ nie tworzy swoistych struktur drugo- czy trzeciorzędowych.

III-2.3. Model translacji współzależnej

W ostatnich latach zauważono, że rola cząsteczki *kap* i łańcucha poliA nie sprowadza się jedynie do stabilizacji matrycy w trakcie translacji. Okazało się, że elementy strukturalne występujące na końcach genomu oddziałują na siebie [26]. W roku 1996 Gallie zaproponował model współzależnej translacji, który przedstawiony jest na rycinie 3. Synergizm elementów strukturalnych na 5’ i 3’ końcach genomu sugeruje wzajemne oddziaływanie poprzez zasocjowane białka. Metodą opóźnienia wędrowki kompleksu w żelu wykazano specyficzne wiązanie inicjatorowych czynników eIF-4F i eIF-4B z łańcuchem poliA. a po-



Ryc. 3. Model translacji współzależnej zaproponowany przez Galliego. Wszystkie skróty użyte w tym schemacie są opisane na rycinie 2.

nadto czynniki te stabilizują asocjację białka (ang. *polyA binding protein* – *PAB*) wiążącego się do łańcucha poliA. Wyniki te wskazują, że cząsteczka *kap* wraz z inicjatorowymi czynnikami eIF-4F, i eIF-4B i poliA tworzą kompleks, który jest stabilny dzięki oddziaływaniu białko — RNA i białko — białko. Jest to tzw. model współzależnej translacji (ang. *termin-co-dependent translation*) [26]. Interakcja między końcami 5' i 3' stabilizuje asocjację aparatu translacyjnego z mRNA i umożliwia ponowne wykorzystanie matrycy.

Ponadto jest wiele grup wirusów o innej niż wyżej omówionej strukturze końców genomu. Genomy tych wirusów również ulegają wydajnej translacji. TMV (grupa tobamo wirusów) na końcu 5' zawiera *kap* natomiast na końcu 3' znajduje się region (177 zasad) nie ulegający translacji i tworzący strukturę pięciu pseudowęzłów, z których dwa końcowe tworzą strukturę o przestrzennym kształcie przypominającym tRNA. Poprzedzające trzy pseudowęzły tworzą tzw. domenę UPD („*upstream pseudoknot domain*”) wpływającą na wydajność translacji [27].

W roślinach wykryto białko 102kDa wiążące zarówno koniec 5' genomu, jak i UPD [28]. Podobnie jak w przypadku genomów poliadenylowanych stymulacja translacji przez UPD jest zależna od obecności *kap* na końcu 5', a zatem struktura występująca na końcu 3' TMV „zastępuje” łańcuch poliA w procesie współzależnej translacji. Innym przykładem współdziałania końców 5' i 3' genomu jest wirus ćetkowanej plamistości tytoniu (ang. *tobacco etch virus TEV*). Na końcu 5' RNA tego wirusa występuje sekwencja liderowa a nie ma cząsteczki *kap*. Koniec 3' jest poliadenylowany. Region lidera zastępuje funkcję cząsteczki *kap* w funkcjonalnej interakcji z łańcuchem poliA, jak to wykazały badania z genem reporterowym w komórkach roślinnych i zwierzęcych [29, 30]. Podobną, współzależną stymulację translacji stwierdzono u BMV [31]. Wskazuje to, że w celu ułatwienia translacji możliwe jest zastąpienie funkcji łańcucha poliA inną strukturą.

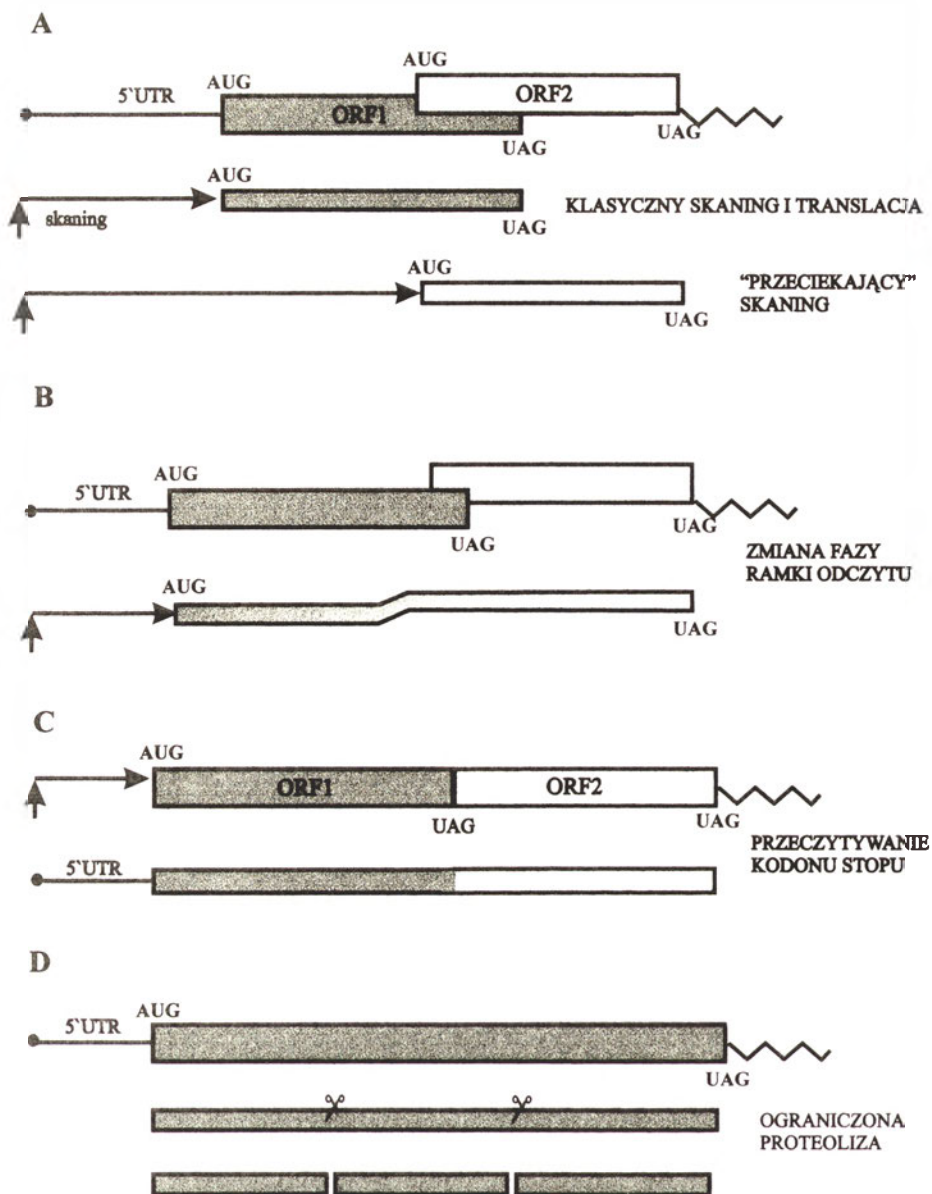
W trakcie ewolucji powstały różnorodne mechanizmy umożliwiające interakcje między końcami genomowego RNA mimo braku cząsteczki *kap* i łańcucha poli-A, a co za tym idzie prowadzenie wydajnej translacji genomu wirusów. Zatem, model współzależnej translacji wydaje się być ogólnym mechanizmem translacji w przypadkach rozpoczynania syntezy białka od pierwszego kodonu inicjatorowego.

IV. Mechanizmy ekspresji genomu wirusowego

Inicjacja translacji według omówionego wyżej modelu (rozdział — III-2.1) jest powszechnie spotykanym mechanizmem ekspresji monocistronowych eukariotycznych mRNA. Występowanie wirusów o genomie podzielonym, złożonym z paru monocistronowych RNA kodujących pojedyncze białka jest przykładem adaptacji wirusów do mechanizmów translacji działających w systemach eukariotycznych. Policistronowe genomy wielu wirusów roślinnych zawierają zwykle parę otwartych ramek odczytów, których wzajemne pozycje mogą być różne, co umożliwia działanie różnych strategii ekspresji. Na rycinie 4 przedstawiono znane typy ułożeń otwartych ramek odczytu. Ze względu na ograniczoną wielkość genomu nakładanie się ramek odczytu jest często spotykane u wielu grup wirusów.

IV-1. „Mijający” skanning

Zgodnie z ogólnie przyjętym modelem translacji inicjacja rozpoczyna się od pierwszego kodonu AUG, ale zdarza się, że ten kodon nie znajduje się w odpowiednim kontekście zasad, wtedy kompleks rybosomalny omija pierwszy kodon i przesuwa się dalej, a translacja startuje z następnego kodonu o odpowiednim kontekście. Ten sposób odnajdywania właściwego inicjatora nosi nazwę „mijający” skanning (ang. *leaky scanning*).



Ryc. 4. Strategie ekspresji genomu wirusów RNA. A — hipotetyczny policistronowy RNA; klasyczny model inicjacji translacji oraz „mijający” skaninig. B — zmiana fazy ramki odczytu. C — przeczytywanie kodonu stopu. D — ograniczona proteoliza. Używane symbole i skróty w rysunkach: ● — struktura *kapu*; 5' UTR — niekodujący fragment 5' końca RNA ORF1 — ramka odczytu 1; ORF2 ramka odczytu 2; linia łamana — łańcuch poliA; AUG kodon startu translacji; UAG kodon terminacji translacji; ↑ — miejsce rozpoczęcia skaninigu.

Rozpoczęcie translacji z dalszego AUG zależy przede wszystkim od kontekstu zasad, ale również i inne czynniki, jak odległość między kodonami inicjatorowymi, czy obecność struktur drugorzędowych mają wpływ na wydajność inicjacji translacji. Ten sam mechanizm może również działać kiedy dwie ramki odczytu wzajemnie się nakładają. W tym przypadku niektóre rybosomalne kompleksy 80S rozpoczynają translację z pierwszego AUG, a inne z kodonu AUG drugiej ramki odczytu.

Jeśli kompleks rybosomalny mija pierwsze AUG z pewną częstością i rozpoczyna proces translacji z następnego AUG znajdującego się w tej samej fazie, wtedy powstają dwa białka różniące się jedynie N-końcem. Jeśli nakładające się ramki znajdują się w różnych fazach to „mijający skaninig” prowadzi do powstania dwu zupełnie różnych peptydów. Przykładem może być translacja drugiej ramki odczytu wirusa zniekształcenia orzecha ziemnego (tłumaczone bezpośr. z ang. — *peanut clump virus*). [32]. Innymi, dobrze udokumentowanymi przykładami, jest ekspre-

sja ORF4 u wirusa liściozwoju ziemniaka, przedstawiciela drugiej grupy luteo. Ramka ta znajduje się wewnątrz ORF3 białka płaszczka, ale w innej fazie odczytu [25].

IV-2. Zmiana ramki odczytu — *frameshift*

Innym mechanizmem ekspresji genomu często spotykanym u wirusów roślinnych jest zmiana ramki odczytu (ang. *frameshift*) — FS. Mechanizm ten umożliwia regulację ekspresji genów na poziomie elongacji translacji [33, 34]. Na jednym mRNA powstają dwa białka określane jako „*frame*” i „*transframe*”. Białka te są identyczne w części N-terminalnej a różnią się od siebie w części dystalnej w wyniku zmiany ramki odczytu. Zmiana ramki odczytu przebiega na ogół z niewielką wydajnością. Znaczący to, że tzw. białka „*transframe*” są syntetyzowane w znacznie mniejszej ilości niż białka „*frame*”. Cofnięcie się rybosomu w kierunku 5' prowadzi do -1 FS i jest mechanizmem znacznie częściej spotykanym niż przesunięcie w kie-

runku końca 3' +1 FS. Ten rodzaj zmiany ramki jest rzadko spotykany u wirusów roślinnych, prawdopodobnie występuje tylko u closterowirusów.

Zmiana ramki odczytu w kierunku końca 5' — to znaczy — 1 FS wymaga:

a) Obecność charakterystycznego heptanukleotydu tzw. miejsca poślizgu (ang. *slippery site*). W większości przypadków sekwencja ta jest następująca X.XXY.YYZ gdzie X = A, G, U; Y = A, U; Z = A, C, U. Hipoteza Jacka i wsp. [35] zakłada, że dwie cząsteczki tRNA dołączone do XXY w rybosomowym miejscu P i YYZ w miejscu A jednocześnie, z niewielką częstością cofają się o jeden nukleotyd i odczytywane są kodony XXX.YYY.Z,

b) Możliwość tworzenia przez mRNA za miejscem poślizgu struktur pseudowęzła lub pnia i pętli,

c) Odpowiednia odległość (4-9 nukleotydów) między miejscem poślizgu a strukturą trzeciorzędową.

Ciekawe jest, że w przypadku niektórych wirusów (wirus M ziemniaka, wirus zachodniej żółtaczki buraka, wirus żółtej karłowatości jęczmienia i wirusy goździków) kodon terminacyjny białka „*frame*”, występujący bezpośrednio za miejscem poślizgu, ma wpływ na wydajność procesu zmiany ramki odczytu. Zmiana tego kodonu w sensowny, czyli zdolny do odczytywania przez t-RNA, powoduje znaczne obniżenie tworzenia białka „*transframe*” [1].

Mechanizm zmiany ramki odczytu jest często odpowiedzialny za syntezę wirusowych polimeraz RNA zależnych od RNA.

IV-3. Odczytywanie kodonu terminacyjnego (ang. „*readthrough*”)

Odczytanie kodonu stop UAG lub UGA jako sensownego przez odpowiednie tRNA supresorowe jest mechanizmem występującym u wirusów roślinnych. Mechanizm ten, zwany supresją kodonu stop, umożliwia regulację ekspresji na poziomie terminacji. Supresja kodonu stop prowadzi do otrzymania dwóch białek tzw. „*stop-protein*” i „*readthrough-protein*”, które na całej długości białka „*stop*” są identyczne. Supresja stop kodonu przebiega z niewielką wydajnością toteż białka „*stop*” są syntetyzowane w większej ilości niż białka „*readthrough*” — białka przedłużonego odczytu.

Stosunkowo mało wiadomo o regulacji wydajności odczytywania kodonów stop. Wiadome jest, że dwa kodony położone poniżej kodonu stop ulegającemu odczytaniu odgrywają rolę w wydajności supresji. Do tej pory opisano jedynie supresję kodonów UAG i UGA.

Swoiste supresorowe tRNA wyizolowano z tytoniu, pszenicy i łubinu. Dwa tRNA^{UAG} (antykodon 5'-GΨA-3') zostały wyizolowane z tytoniu i one, jak wskazują wyniki doświadczeń *in vitro* i *in vivo* są odpowiedzialne za supresję kodonu UAG. Supresja kodonu UGA, której ramka wirusa TMV i wirusa TRV przeprowa-

dzana jest przez tRNA^{UAG} i tRNA^{UGA} wyizolowane z tytoniu [25, 36, 37].

IV-4. Obróbka proteolityczna

U wielu wirusów w wyniku translacji genomu powstaje jeden polipeptyd, który następnie ulega ograniczonej proteolizie przez proteazy wirusowe lub gospodarza. Powstające produkty są aktywnymi białkami niezbędnymi w cyklu życiowym wirusa. Proteoliza może zachodzić zarówno w trakcie jak i po ukończeniu translacji. Poznanie właściwości proteaz wirusowych jak i eukariotycznych umożliwia wykazanie podobieństwa budowy i funkcji tych białek. Obecnie wyróżnia się cztery grupy proteaz w zależności od budowy centrum aktywnego proteaz [38].

Do pierwszej grupy zaliczamy proteazy serynowe, w których centrum katalitycznym znajdują się aminokwasy His, Asp i Ser. W niektórych grupach wirusów seryna może być zastąpiona cysteiną. Mechanizm działania proteaz serynowych jest dość dokładnie opisany. Ten typ proteaz jest charakterystyczny dla wirusów roślinnych z rodziny: *Potyviridae*, *Comoviridae*, *Nepoviridae*, *Luteoviridae* i *Sobemoviridae* [38].

Do drugiej grupy należą proteazy cysteinowe (tiolowe). W ich centrum aktywnym występują charakterystyczne diady sąsiadujących ze sobą cysteiny i histydy. I w tym przypadku mechanizm działania jest dokładnie poznany. Do grupy posiadającej ten rodzaj proteinaz należą wirusy z rodziny *Potyviridae*, *Furoviridae* i *Tymoviridae* [38].

Trzecią grupę tworzą wirusowe proteinazy asparaginowe, gdzie centrum aktywne tworzą dwa asparagina. Mechanizm działania tego typu proteinaz jest nieznan, mimo że są dość rozpowszechnione w świecie wirusów i występują u wirusów z rodziny *Caulimoviridae* i *Badnaviridae* [38].

U wirusów roślinnych nie znaleziono dotychczas proteaz typu czwartego czyli metaloproteinaz.

V. Uwagi końcowe

Podsumowując warto zwrócić uwagę na niezwykle różnorodność mechanizmów ekspresji genomu (+) RNA wirusów roślinnych i jego regulację. Ponadto warto podkreślić fakt, że właśnie badania nad translacją u wirusów doprowadziły do poznania szeregu niekonwencjonalnych strategii, które jak wykazały późniejsze prace działają również w komórkach gospodarzy. Często zdarza się, że wirus wykorzystuje nie jedną strategię, ale kilka w procesie ekspresji genomu. Przykładem mogą być wirusy grupy luteo, u których stwierdzono operowanie niemal wszystkich znanych dróg ekspresji genomu to jest: *leaky scanning*, zmiana ramki odczytu, supresja kodonu stop i jak ostatnio wykazały nasze prace obróbka proteolityczna.

Należy podkreślić, że poznanie organizacji i ekspresji genomu wirusa jest niezbędnym etapem dla prac

biotechnologicznych takich jak np. uzyskanie roślin odpornych na infekcje wirusowe czy zastosowanie wirusów jako wektorów.

Praca finansowana z grantu KBN 6P04B01615

Artykuł otrzymano 20 grudnia 1998 r.
Zaakceptowano do druku 11 lutego 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Mai IG, Seron K, Haenni A-L, Bernardi F (1996) *Plant Mol Biol* **32**: 367-391
2. Klaff P, Riesner D, Steger G (1996) *Plant Mol Biol* **32**: 89-106
3. Deiman BALM, Pleij CWA (1997) *Sem in Virol* **8**: 166-175
4. Skuzeski JM, Bozarth CS, Dreher TW (1996) *J Virol* **70**: 2107-2115
5. Dreher TW, Tsai CH, Skuzeski JM (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12212-12216
6. Felden B, Florentz C, Giege R, Westhof E (1996) *RNA* **2**: 201-212
7. Tanguay RL, Gallie DR (1996) *J Biol Chem* **271**: 14316-14322
8. Gallie DR, Kobayashi M (1994) *Gene* **142**: 159-165
9. Miller WA, Dreher TW, Hall TC (1985) *Nature (Lond)* **313**: 68-70
10. Van der Vossen EAG, Notenboom T, Bol JF (1995) *Virology* **212**: 663-672
11. Smirnyagina E, Hsu Y-H, Chua N, Ahlquist P (1994) *Virology* **198**: 427-436
12. French R, Ahlquist P (1988) *J Virol* **62**: 2411-2420
13. Kozak M (1989) *J Cell Biol* **108**: 229-241
14. Gallie DR (1993) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 77-105
15. Shirako Y (1998) *J Virol* **72**: 1677-1682
16. Schmitz J, Prufer D, Rohde W, Tacke E (1996) *Nucl Acids Res* **24**: 257-263
17. Sleat DE, Wilson TMA (1992) *Genetic Engineering with Plant Viruses* CRC Press, Boca Raton, FL
18. Gallie DR, Walbot V (1992) *Nucl Acids Res* **20**: 4631-4638
19. Gallie DR, Feder JN, Schimke RT, Walbot V (1991) *Mol Gen Genet* **228**: 258-264
20. Gallie DR, Lucas WJ, Walbot V (1989) *Plant Cell* **1**: 301-311
21. Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA (1987) *Nucl Acid Res* **15**: 3257-3273
22. Dowson Day MJ (1993) *Plant Mol Biol* **23(1)**: 97-109
23. Fennoy SL, Bailey-Serres J (1995) *Plant J* **7**: 287-295
24. Jobling SA, Cuthbert CM, Rogers SG, Fraley RT, Gehrke L (1988) *Nucl Acids Res* **16**: 4483-4498
25. Juszczyk M, Zagórski-Ostojka W, Hulanicka DM (1997) *Acta Bioch Polon* **44**: 69-78
26. Gallie DR (1996) *Plant Mol Biol* **32**: 145-158
27. Leathers V, Tanguay R, Kobayashi M, Gallie DR (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 5331-5347
28. Tanguay RL, Gallie DR (1996) *J Biol Chem* **14**: 71: 14316-14322
29. Carrington JC, Freed DD (1990) *J Virol* **64**: 1590-1597
30. Gallie DR, Tanguay R, Leathers V (1995) *Gene* **165**: 223
31. Gallie DR, Kobayashi M (1994) *Gene* **142**: 159-165
32. Herzog E, Guilley H, Fritsch C (1995) *Virology* **208**: 215-225
33. Tacke E, Prufer D, Salamini F, Rhode W (1990) *J Gen Virol* **71**: 2265-2272
34. Ten Dam EB, Pleij CWA, Bosch L (1990) *Virus Genes* **4**: 121-136
35. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Varmus HE (1988) *Nature (Lond)* **331**: 280-283
36. Zerfass K, Beier H (1992) *EMBO J* **11(11)**: 4167-4173
37. Urban C, Beier H (1995) *Nucleic Acids Res* **25**: 23(22): 4591-4597
38. Dougherty WG, Semler BL (1993) *Microbiol Rev* **57**: 781-822



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”.

Oscylacje wapniowe uczestniczą w procesie regulacji ekspresji genów

Calcium oscillations participate in the regulation of gene expression

AGNIESZKA MAKOWSKA*

Spis treści:

- I. Oscylacje wapniowe jako element szlaku sygnałowego w komórce
- II. Mechanizm powstawania oscylacji wapniowych
- III. Nowe metody badania roli oscylacji wapniowych
 - III-1. Metoda oparta na trwałym otwarciu kanałów wapniowych
 - III-2. Metoda wykorzystująca fotolabilną pochodną IP_3
- IV. Badania przeprowadzone w oparciu o nowe metody
 - IV-1. Doświadczenia wykorzystujące trwale otwarcie kanałów wapniowych
 - IV-2. Doświadczenia wykorzystujące nową pochodną IP_3
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: $[Ca^{2+}]_c$ – stężenie jonów wapnia w cytosolu; IP_3 – trisfosfoinozytol; ER – retikulum endoplazmatyczne; NFAT – ang. *nuclear factor of activated T cells*, białko jądrowe z aktywowanych limfocytów T; NF κ B – ang. *nuclear factor of kappa chain B cells*, czynnik transkrypcyjny łańcuchów kappa limfocytów B; Oct/OAP – ang. *octamer/octamer-associated protein*, czynnik transkrypcyjny z limfocytów T; IL2 – interleukina 2; IL8 – interleukina 8

I. Oscylacje wapniowe jako element szlaku sygnałowego w komórce

Jednym z najciekawszych tematów badań prowadzonych w ostatnim dziesięcioleciu w dziedzinie sygnalizacji komórkowej są oscylacje wapniowe, czyli cykliczne zmiany stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Występują one w komórkach niemal wszystkich typów, w tym również w komórkach niepobudliwych elektrycznie. Pobudzenie każdej komórki następuje na skutek przyłączenia do receptora błonowego specyficznego agonisty. W komórkach niepobudliwych, w przeciwieństwie do komórek elektrycznie pobudliwych, pobudzenie nie wiąże się ze zmianą potencjału elektrycznego błony komórkowej. Polega ono na uruchomieniu wielu sekwencji następujących po sobie i wzajemnie zależnych procesów, których efektem jest odpowiedź komórki na pobudzenie. Te sekwencje

Contents:

- I. Calcium oscillation as an element of signal transduction pathway
- II. The mechanism of the calcium oscillations induction
- III. New methods of research of the calcium oscillations function
 - III-1. The method based on the permanent opening of calcium channels
 - III-2. The method utilizing the new $InsP_3$ derivative
- IV. Studies employing the new methods
 - IV-1. Experiments with the permanent opening of calcium channels
 - IV-2. Experiments with the new $InsP_3$ derivative
- V. Summary

zdarzeń są nazywane szlakami sygnałowymi. Jednym z nich jest tzw. szlak sygnału wapniowego. Na jego przebieg składają się: hydroliza fosfatidyloinozytolo(4,5)bisfosforanu w błonie komórkowej i powstawanie trisfosfoinozytola (IP_3), otwarcie IP_3 – zależnych kanałów wapniowych w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER), opróżnienie magazynów wapniowych ER oraz napływ jonów wapnia do komórki z zewnętrznego środowiska [1, 2]. W efekcie następuje podwyższenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórki. Jest ono czynnikiem modulującym aktywność wielu enzymów komórkowych i w ten sposób prowadzącym do uzyskania fizjologicznej odpowiedzi komórki [3, 4].

Zjawisko oscylacji wapniowych odkryto po zastosowaniu w badaniach nad przekazywaniem sygnału wapniowego technik, takich jak mikroskopia konfokalna i komputerowa analiza fluorescencji w obrazie mikroskopowym, umożliwiających obserwację procesów zachodzących w pojedynczych komórkach. Zauważono wtedy, że w pewnych określonych granicach stężeń wywoływana przez nie zmiana stężenia jonów wapnia w cytoplazmie nie ma charakteru stałego podwyższenia, lecz zachodzi w postaci oscylacji [5-10]. W wielu komórkach oscylacje wapniowe mają stałą amplitudę, natomiast ich częstotliwość wzrasta wraz z intensywnością pobudzenia, czyli stężeniem agonistów. W innych komórkach oscylacje mogą mieć zmienną amplitudę i częstotliwość [11, 12].

W chwili odkrycia oscylacji wapniowych pojawiły

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

się dwa podstawowe pytania, których wyjaśnienie stało się celem intensywnych badań:

— jak powstają tego rodzaju zmiany stężenia jonów wapnia w komórce?

— jakie jest ich fizjologiczne znaczenie?

II. Mechanizm powstawania oscylacji wapniowych

W efekcie prowadzonych badań wysunięto wiele hipotez próbujących opisać sposób powstawania i regulacji oscylacji wapniowych [13]. Jedne z nich zakładają, że czynnikiem wywołującym oscylacyjne zmiany stężenia jonów wapnia w cytoplazmie są cykliczne wahania poziomu trisfosfoinozytoli [14-16]. Inne wyjaśniają powstawanie oscylacji występowaniem sprzężenia zwrotnego pomiędzy szybkością wpływu jonów wapnia z magazynów a stężeniem wapnia w cytoplazmie. Początkowo sprzężenie to tłumaczono istnieniem kanałów wapniowych innego niż IP_3 - zależne rodzaju, tzw. rianodynowych, które otwierają się pod wpływem podwyższonego poziomu wapnia w cytoplazmie [17]. Nowsze hipotezy opierają się na odkryciu, że aktywność IP_3 - zależnych kanałów wapniowych jest regulowana przez stężenie jonów wapnia w cytoplazmie [18, 19]. Pojedynczy kanał wapniowy może otworzyć się po przyłączeniu cząsteczki IP_3 oraz jonu wapniowego. W miarę wzrostu $[Ca^{2+}]_c$ spowodowanego wpływem wapnia z ER coraz większa ilość kanałów ulega otwarciu i całkowity wpływ jest coraz szybszy. Gdy $[Ca^{2+}]_c$ wzrośnie powyżej pewnej granicy, kanały wapniowe przyłączają drugi jon wapnia, co powoduje ich zamknięcie. Taka zależność, w połączeniu z aktywnością ATP-az obniżających $[Ca^{2+}]_c$ przez pompowanie jonów wapnia z powrotem do magazynów oraz na zewnątrz komórki, może odpowiadać za powstawanie oscylacji wapniowych.

W ostatnich latach badania ograniczały się w zasadzie do potwierdzenia i rozwinięcia zaproponowanych wcześniej hipotez. Badano na przykład jaki wpływ na oscylacje wapniowe mają aktywności kinazy trisfosfoinozytoli i fosfotazy trisfosfoinozytoli, głównych enzymów odpowiedzialnych za obniżanie poziomu IP_3 w cytoplazmie [20]. Sprawdzano czy zmiany pH [21] i temperatury [22] mogą wpływać na procesy związane z przekazywaniem sygnału wapniowego. Odkryto niepojemnościowy, czyli niezależny od stopnia opróżnienia magazynów, napływ jonów wapnia do komórki, indukowany przez kwas arachidonowy i mający miejsce tylko podczas oscylacji wapniowych [23, 24]. Poszukiwano również związku pomiędzy cechami morfologicznymi, takimi jak wielkość i kształt komórki oraz jądra komórkowego, ilość i rozmieszczenie magazynów wapiennych oraz miejsce wytwarzania IP_3 na przebieg oscylacji wapniowych [25]. Zaproponowano nawet hipotezę, według której kluczową rolę w procesie wytwarzania oscylacji $[Ca^{2+}]_c$ odgrywają

zmiany objętości komórki i potencjału błonowego, związane z uaktywnieniem Ca^{2+} — zależnych kanałów potasowych [26]. Wiele prac dotyczyło zależności pomiędzy pojawieniem się oscylacji a stopniem napełnienia magazynów wapniowych ER oraz stężeniem jonów wapnia w środowisku komórki [23, 26, 27].

III. Nowe metody badania roli oscylacji wapniowych

Chociaż wysunięto tak wiele hipotez wyjaśniających powstawanie oscylacji wapniowych w komórce, fizjologiczne znaczenie tego zjawiska pozostawało nieznanne. Barię w badaniach stanowił brak odpowiedniej metody pozwalającej na wytwarzanie oscylacji wapniowych o ściśle dobranych parametrach, takich jak częstotliwość i amplituda. Co więcej, pobudzanie komórki przez oddziaływanie na receptory błonowe za pomocą różnych agonistów może uruchomić wiele dodatkowych szlaków sygnałowych. Uzyskiwana w ten sposób odpowiedź komórki nie mogła więc być interpretowana jedynie jako efekt oscylacji wapniowych. Dlatego ważne stało się opracowanie metody zapewniającej powtarzalność doświadczeń i pozwalającej na odniesienie wyników do określonych warunków doświadczalnych. Dopiero w 1998 r. opracowano dwie takie metody, które jak się wydaje, pomogą wyjaśnić rolę oscylacji w regulacji procesów fizjologicznych w komórce. Pozwalają one sztucznie wytwarzać w komórce oscylacje wapniowe już na poziomie uwalniania Ca^{2+} z magazynów wapniowych, z całkowitym pominięciem wszystkich wcześniejszych etapów przekazywania sygnału wapniowego. Uzyskiwane oscylacje mogą mieć precyzyjnie dobraną częstotliwość, amplitudę i czas trwania. Metody te mogą więc umożliwić odkrycie i zróżnicowanie zmian pojawiających się w komórce w odpowiedzi na oscylacje wapniowe o różnym charakterze.

III-1. Metoda oparta na trwałym otwarciu kanałów wapniowych

Zgodnie z większością hipotez podłożem oscylacji wapniowych jest przepływ jonów wapnia pomiędzy magazynami wapniowymi ER a cytoplazmą. Wobec tego trwałe opróżnienie magazynów wapniowych powinno zablokować naturalne wytwarzanie oscylacji wapniowych. Jednocześnie kanały wapniowe w błonie komórkowej zostaną trwale otwarte. Na takim założeniu opiera się doświadczenie przedstawione przez Dolmetsch'a, Xu i Lewis'a [28]. ATP-aza wapniowa w ER która pompuje Ca^{2+} do magazynów wapniowych, zostaje zahamowana za pomocą tap-sygarginy. W wyniku tego następuje całkowite opróżnienie magazynów na drodze dyfuzji Ca^{2+} przez błonę ER, która powoduje otwarcie kanałów wapniowych w błonie komórkowej. Błona komórkowa staje się przepuszczalna dla jonów wapnia. Poprzez usuwanie bądź dodawanie Ca^{2+} do środowiska, w którym

znajduje się komórka, może wytwarzać sztuczne oscylacje wapniowe. Taki rezultat osiągnięto hodując komórki w specjalnych kapilarach, przez które w czasie trwania eksperymentu przepływa medium doświadczone. Może ono naprzemiennie wypływać z dwóch pojemników podłączonych do kapilary. Zmianę medium z bezwapniowego na wapniowe można w tych warunkach przeprowadzić otwierając wpływ z jednego pojemnika i zamykając drugi. Odbywa się to szybko i bez kłopotliwych procedur takich jak usuwanie medium i płukanie komórek. Cały proces jest zaprogramowany i sterowany komputerowo.

III-2. Metoda wykorzystująca fotolabilną pochodną IP_3 ,

Druga metoda, opracowana w laboratorium T s i e n ' a [29], opiera się na założeniu, że oscylacyjne zmiany $[Ca^{2+}]_c$ są efektem cyklicznych zmian poziomu IP_3 . Aby móc wytwarzać tego rodzaju zmiany zsyntetyzowano sztuczną pochodną IP_3 , nieaktywną biologicznie, której aktywacja następuje po naświetleniu UV. W cząsteczce tego związku do grupy hydroksylowej w pozycji 6 trisfosfoinozytolu, odpowiedzialnej za specyficzne wiązanie IP_3 z receptorem, jest przyłączona w miejsce wodoru grupa 4,5-dimetyksy-2-nitrobenzylowa. Wiązanie to jest wrażliwe na promieniowanie UV i ulega fotolizie w czasie naświetlania. W odróżnieniu od wcześniej stosowanych podobnych pochodnych IP_3 ma ona wszystkie grupy fosforanowe estryfikowane propionyloksymetylem, co umożliwia jej swobodne przenikanie przez błonę komórkową. W komórce wiązania estrowe są hydrolizowane przez niespecyficzne esterazy. Cząsteczki pochodnej, nie mogąc już dyfundować przez błony, nagromadzają się w cytoplazmie. Są one jednak nadal nieaktywne i dopiero naświetlanie komórki pulsami UV powoduje fotolizę określonej ilości pochodnej, która staje się aktywna biologicznie. Jej aktywność odpowiada 75% aktywności tej samej ilości naturalnego IP_3 , co sprawia, że jest to najbardziej aktywna pochodna IP_3 z wszystkich dotychczas zsyntetyzowanych. Odpowiednie dobranie mocy i długości trwania pulsów UV pozwala na uzyskiwanie oscylacji wapniowych o określonych parametrach. Metoda ta umożliwia wytwarzanie sztucznych oscylacji bez przerywania ciągłości błon i sztucznego blokowania kanałów, jest więc w pełni nieinwazyjna w stosunku do komórki.

IV. Badania przeprowadzone w oparciu o nowe metody

Przedmiotem badań z zastosowaniem nowych metod był wpływ parametrów oscylacji wapniowych na stopień aktywacji czynników transkrypcyjnych. Wykrycie takich zależności stanowiłoby niepodważalny dowód na to, że przekazywanie sygnału wapniowego w postaci oscylacji pełni bardzo istotną funkcję bio-

logiczną, pozwalając na regulację metabolizmu na tak podstawowym poziomie jakim jest indukcja ekspresji genów.

IV-1. Doświadczenia wykorzystujące trwale otwarcie kanałów wapniowych

Grupa L e w i s ' a badała aktywację trzech zależnych od wapnia czynników transkrypcyjnych: NFAT, Oct/OAP i NFκB, oraz genów kodujących interleukiny IL2 i IL8, których transkrypcja jest indukowana przez te czynniki. Do monitorowania aktywności czynników transkrypcyjnych posłużyli się aktywowanymi przez nie genami reporterowymi: *lac Z* lub genem lucyferazy. Miarę aktywności danego czynnika transkrypcyjnego stanowiła ekspresja *lac Z* lub genu lucyferazy w komórce, mierzone za pomocą standardowych testów.

W komórkach zawierających gen reporterowy NFAT/*lac Z* wywoływano zmiany $[Ca^{2+}]_c$ dwojakiego rodzaju: trwale podwyższenie lub oscylacje. Oscylacje miały tak dobrą amplitudę, żeby średnie stężenie jonów wapnia w cytoplazmie było takie samo jak przy trwałym podwyższeniu. Przy średnim stężeniu wapnia wyższym niż 300nM aktywność czynnika transkrypcyjnego była w obu przypadkach jednakowo wysoka. Gdy obniżono średnie stężenie wapnia, tylko w komórkach, w których wytwarzano oscylacje wapniowe aktywność NFAT utrzymywała się na tym samym wysokim poziomie. Stałe $[Ca^{2+}]_c$ niższe niż 300nM aktywowało ten czynnik transkrypcyjny w znacznie słabszym stopniu. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że przekazywanie sygnału wapniowego w postaci oscylacji wapniowych pozwala uzyskać, przy niższym średnim $[Ca^{2+}]_c$, taką samą odpowiedź komórkową jaką wywołuje trwałe podwyższenie $[Ca^{2+}]_c$. Jest to korzystne dla komórki, ponieważ długo utrzymujący się wysoki poziom wapnia zaburza przebieg procesów komórkowych [30].

Dalsze badania, dotyczące aktywacji także dwóch innych czynników transkrypcyjnych (Oct/OAP i NFκB) przeprowadzono w celu sprawdzenia, czy sygnał wapniowy przekazywany w postaci oscylacji w jednakowym stopniu oddziałuje na różne procesy regulowane przez wapń. Już z wcześniejszych badań wynikało, że w wielu komórkach częstotliwość oscylacji, a w niektórych także amplituda, rośnie w miarę wzrostu siły bodźca pobudzającego [11, 12]. Wykazanie związku pomiędzy parametrami oscylacji wapniowych a aktywacją określonych czynników transkrypcyjnych stanowiłoby dowód, że oscylacje mogą, w zależności od rodzaju bodźca, indukować specyficzną odpowiedź na poziomie ekspresji genów. Zespół L e w i s ' a potwierdził istnienie takiego związku porównując aktywację trzech czynników transkrypcyjnych w zależności od amplitudy i częstotliwości oscylacji. Dodatkowo porównano indukcję wytwarzania dwóch interleukin, IL2 i IL8. Jak wiadomo, ekspresja

genu kodującego IL2 jest regulowana przez wszystkie trzy badane czynniki transkrypcyjne, natomiast genu kodującego IL8 tylko przez NFκB. Różny stopień indukcji tych dwóch interleukin powinien wobec tego odzwierciedlać różnice w aktywacji czynników transkrypcyjnych przez oscylacje wapniowe o określonych parametrach.

Badania wykazały, że przy stałym podwyższeniu $[Ca^{2+}]_c$ aktywności badanych czynników transkrypcyjnych są podobne, a w miarę rozwoju $[Ca^{2+}]_c$ zmieniają się w taki sam sposób. Natomiast oscylacje wapniowe, w zależności od częstotliwości, mają zróżnicowany wpływ na stopień aktywacji tych czynników. Aktywność NFAT i Oct/OAP utrzymywała się na wysokim poziomie tylko przy oscylacjach o okresie poniżej 400 s, przy mniejszych częstotliwościach gwałtownie spadała. Podwyższona aktywność czynnika NFκB utrzymywała się dłużej, nawet przy dwukrotnie mniejszej częstotliwości oscylacji. Ponieważ w naturalnych warunkach okres oscylacji może mieć rozpiętość od kilku sekund do kilkunastu minut [31, 32], można wyciągnąć wniosek, że oscylacje o niskiej częstotliwości indukują tylko NFκB i regulowane przez ten czynnik geny, a oscylacje o wysokiej częstotliwości także pozostałe dwa czynniki. Przyjmując założenie, że różna wrażliwość na częstotliwość oscylacji dotyczy wielu występujących w komórce czynników transkrypcyjnych, można wysunąć hipotezę, że jest ona czynnikiem zapewniającym specyfikę odpowiedzi w zależności od sygnału. Wynika to z tego, że od rodzaju uaktywnianych czynników transkrypcyjnych zależy, jaka pula genów ulegnie ekspresji. Oznaczona w badaniach indukcja produkcji interleukin IL2 i IL8 dokładnie odpowiadała aktywacji regulujących ją czynników transkrypcyjnych, co dodatkowo potwierdza taką hipotezę.

U podstaw zróżnicowanego wpływu częstotliwości oscylacji na aktywność różnych czynników transkrypcyjnych może leżeć długość okresu trwania w jądrze komórkowym aktywnej formy danego czynnika. W przypadku NFAT cytoplazmatyczny kompleks tego związku jest defosforylowany przez Ca^{2+} -zależną fosfotazę, kalcyneurynę. Aktywna podjednostka przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie indukuje transkrypcję określonych genów [33, 34]. Podjednostka ta ulega w jądrze szybkiej refosforylacji i powraca do cytoplazmy w czasie krótszym niż jedna minuta [35, 36], dlatego utrzymanie podwyższonej aktywności NFAT wymaga wysokiej częstotliwości impulsów wapniowych. Natomiast aktywny NFκB pozostaje w jądrze przez ponad 16 min. [36], co tłumaczy utrzymującą się, podwyższoną aktywność tego czynnika, nawet przy długim okresie oscylacji.

IV-2. Doświadczenia wykorzystujące nową pochodną IP_3

Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFAT była

również przedmiotem badań przeprowadzonych w laboratorium T s i e n a z wykorzystaniem nowej pochodnej IP_3 . Do jej monitorowania posłużono się genem reporterowym β-galaktozydazy. Stosując odpowiednio dobrane czas trwania i intensywność naświetlania UV uwalniano określoną ilość IP_3 . W każdym eksperymencie całkowita ilość uwalnianego IP_3 była taka sama, ale jego stężenie w komórce podwyższało się w różny sposób. Uzyskiwano jego trwałe podwyższenie, krótkotrwałe i wysokie lub niewielkie i rozciągnięte w czasie, albo wytwarzano oscylacje o różnych częstotliwościach. Także te badania wykazały, że w określonych granicach częstotliwości oscylacje w większym stopniu aktywują czynnik transkrypcyjny niż stałe podwyższenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, zwiększając w ten sposób efektywność działania słabych bodźców. Wyniki tych doświadczeń pozwoliły grupie T s i e n a wysunąć hipotezę, że przekazywanie sygnału w postaci oscylacji wapniowych, u podłoża których leżą cykliczne zmiany poziomu IP_3 , zapobiega odwracaniu receptorów IP_3 .

V. Podsumowanie

Badania oscylacji wapniowych przeprowadzone w obu laboratoriach stanowią przełom w próbach wyjaśnienia biologicznej funkcji tego zjawiska. Metody uzyskiwania oscylacji o dobranych parametrach, z ominięciem uaktywniania w komórce szeregu różnych szlaków sygnałowych, pozwalają na powtarzalność eksperymentów i interpretację wyników w odniesieniu do warunków doświadczalnych. Już wcześniejsze badania wykazały, że oscylacyjne zmiany stężenia wapnia w cytoplazmie powodują większy i dłużej trwający wzrost aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych niż utrzymujące się podwyższenie poziomu wapnia [37]. Potwierdzało to przypuszczenia, że przekazywanie sygnału wapniowego w postaci oscylacji może być sposobem odróżnienia rzeczywistego pobudzenia od przypadkowego, niewielkiego podwyższenia $[Ca^{2+}]_c$ oraz zapobiegać odwracaniu receptorów przy silniejszym pobudzeniu komórki. Nie było jednak wówczas możliwe znalezienie ścisłych powiązań pomiędzy parametrami oscylacji a zmianami aktywności enzymów. Wyniki uzyskane przez obie grupy badaczy wykazują taką zależność. Ponadto można na ich podstawie wysunąć hipotezę, że oscylacje wapniowe są sposobem zróżnicowanego przenoszenia informacji pomiędzy powierzchnią komórki i jej materiałem genetycznym. Częstotliwość oscylacji, w połączeniu z jej zróżnicowanym wpływem na aktywację czynników transkrypcyjnych, determinuje rodzaj genów, które ulegają ekspresji w odpowiedzi na pobudzenie komórki. W ten sposób siła bodźca pobudzającego znajduje odzwierciedlenie w procesach leżących u podstaw funkcjonowania komórki. W przyszłości nowe metody zastosowane w obu laboratoriach mogą się przyczynić do wyjaśnienia sposobu regulacji wielu

procesów komórkowych zależnych od wapnia.

Artykuł otrzymano 11 stycznia 1999 r.
Zaakceptowano do druku 15 lutego 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Berridge MJ (1997) *J Physiol* (Lond) **499**: 291-306
2. Callamaras N, Marchant JS, Sun X, Parker J (1998) *J Physiol* **509**: 81-91
3. Clapham DE (1995) *80*: 259-268
4. Taylor CW (1995) *Biochem Soc. Trans.* **23**: 637-642
5. Lawrence YM, Cuthbertson KSR (1995) *Cell Calcium* **17**: 154-164
6. Meyer T, Stryer L (1991) *Annu Rev Biophys Chem* **20**: 153-174
7. Lin C, Hajnóczka G, Thomas AP (1994) *Cell Calcium* **16**: 247-258
8. Sanderson MJ, Charles AC, Dirksen ER (1990) **1**: 585-596
9. Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ (1992) *Science* (Washington DC) **258**: 292-295
10. Charles A, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) **6**: 983-992
11. Dupont G, Goldbeter A (1992) *BioEssays* **14**: 485-493
12. Tsien R W, Tsien R Y (1990) *Annu Rev Cell Biol* **6**: 715-760
13. Makowska A, Duszyński J (1996) *Post Biochem* **42**: 146-153
14. Meyer T, Stryer L (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5051-5055
15. Cuthbertson KSR, Chay TR (1991) *Cell Calcium* **12**: 97-109
16. Sneyd J, Wilkins M, Strahonja A, Sanderson MJ (1998) *Biophys Chem* **72**: 101-109
17. Goldbeter A, Dupont G, Berridge MJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1461-1465
18. Atri A, Amundson J, Clapham D, Sneyd J (1993) *Biophys J* **65**: 1727-1739
19. Shen P, Larter R (1995) *Cell Calcium* **17**: 225-232
20. Dupont G, Erneux Ch (1997) *Cell Calcium* **22**: 321-331
21. Speake T, Elliott AC (1998) *J Physiol* **506**: 415-430
22. Kenyon JL, Goff HR (1998) *Cell Calcium* **24**: 35-48
23. Shuttleworth TJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 21720-21725
24. Shuttleworth TJ, Thompson JL (1996) *Biochem J* **316**: 819-824
25. Kraus M, Wolf B, Wolf B (1996) *Cell Calcium* **19**: 461-472
26. Reetz G, Reiser G (1996) *Cell Calcium* **19**: 143-156
27. Hajnóczky G, Thomas A (1997) *EMBO J* **16**: 3533-3543
28. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998) *Nature* (Lond) **392**: 933-936
29. Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien R Y (1998) *Nature* (Lond) **392**: 936-941
30. Nicoterra P, Zhivotovsky B, Orrenius S (1994) *Cell Calcium* **16**: 2769-288
31. Berridge MJ, Galione A (1988) *FASEB J* **2**: 3074-3082
32. Gu X, Spitzer NC (1995) *Nature* (Lond) **375**: 784-787
33. Crabtree GR, Clipstone NA (1994) *Annu Rev Biochem* **63**: 1045-1083
34. Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR (1996) *Nature* (Lond) **383**: 837-840
35. Shibasaki F, Price F, Milan D, McKeon F (1996) *Nature* (Lond) **382**: 370-373
36. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JJ (1997) *Nature* (Lond) **386**: 855-858
37. Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995) *Cell* **82**: 415-424

Redakcja „*Postępów Biochemii*” chcąc uniknąć przypadków drukowania prac o podobnej tematyce prosi autorów artykułów kierowanych do naszego czasopisma o wcześniejsze informowanie o zamiarze ich napisania. Informacja obok tytułu powinna zawierać także orientacyjny spis treści. Poczynając od stycznia 1999 roku uzyskanie wstępnej akceptacji proponowanej tematyki będzie warunkiem koniecznym do przyjęcia artykułu do dalszej pracy redakcyjnej.

Efekt Crabtree wyrazem strategii metabolicznej szybko rosnących nowotworów i innych komórek proliferujących

The Crabtree effect as a metabolic strategy of fast growing tumours and other rapidly proliferating cells

KRYSTYNA BOGUĆKA¹,
LECH WOJTCZAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Przyczyny przestawienia komórek z metabolizmu tlenowego na glikolityczny w procesach proliferacji i transformacji nowotworowej
 - II-1. Utrzymanie wysokiego potencjału redukcyjnego
 - II-2. Ochrona przed stresem oksydacyjnym
- III. Mechanizmy powodujące przestawienie się komórek proliferujących na glikolizę
 - III-1. W mitochondriach
 - III-1.1. Redukcja liczby mitochondriów oraz zmiany aktywności enzymów oksydacyjnej fosforylacji
 - III-1.2. Rola jonów Ca^{2+}
 - III-2. W cytosolu
- IV. Efekt Crabtree
 - IV-1. Hamowanie oddychania przez glukozę
 - IV-2. Udział jonów Ca^{2+} w efekcie Crabtree

Contents:

- I. Introduction
- II. Reasons why the aerobic metabolism undergoes transformation to glycolysis in proliferating and malignant cells
 - II-1. Maintaining of high redox potential
 - II-2. Protection against oxidative stress
- III. Mechanisms of the metabolic transformation towards glycolysis in proliferating cells
 - III-1. In mitochondria
 - III-1.1. Reduction of the amount of mitochondria and decrease in enzymes involved in oxidative phosphorylation
 - III-1.2. The role of Ca^{2+}
 - III-2. In cytosol
- IV. The Crabtree effect
 - IV-1. Inhibition of respiration by glucose
 - IV-2. The role of Ca^{2+} in the Crabtree effect

I. Wstęp

Podstawowym źródłem energii w komórkach organizmów o metabolizmie tlenowym jest mitochondrialny proces oksydacyjnej fosforylacji. Dostarcza on ponad 90% ATP. Pozostałe około 10% powstaje w procesie glikolizy zachodzącej w cytosolu. W warunkach hipoksji komórki mogą przeżywać kosztem przemian glikolitycznych. Podczas reoksydacji i włączenia mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji szybkość glikolizy ulega obniżeniu. Jest to tak zwany efekt Pasteura.

W komórkach proliferujących, w tym także w szybko rosnących nowotworach nieodróżnionych, następuje przełączenie metabolizmu tlenowego na glikolityczny. Jest to spowodowane między innymi wzmożoną ekspresją genów kodujących syntezę enzymów glikolitycznych. W wyniku tego ponad 80% ATP niezbędnego dla potrzeb metabolicznych komórki te czerpią z rozpadu glukozy (glikolizy). Glikoliza pozwala na przeżywanie komórek nowotworowych nawet kilkadziesiąt godzin w warunkach beztlenowych, a reoksydacja nie prowadzi do jej zahamowania. W komórkach tych glukoza powoduje obniżenie in-

tensywności metabolizmu tlenowego, zjawisko znane jako efekt Crabtree, zwany również odwrotnym efektem Pasteura.

W wolno rosnących nowotworach nie obserwuje się przestawienia fenotypu tlenowego na glikolityczny. Należy dodać, że komórki szybko rosnących nowotworów, na przykład nowotworów wątroby, w przeciwieństwie do nietransformowanych hepatocytów, mają niską aktywność enzymów regulujących szlak glukoneogenezy [1].

Mimo 75-letniej historii badań — tyle bowiem czasu upłynęło od odkrycia przez Warburga [2] przewagi glikolizy nad oddychaniem tlenowym w nowotworach (nazywanej niekiedy efektem Warburga) — zjawisko to wciąż nie jest w pełni zrozumiałe. Wciąż mało wiemy o przyczynach, dla których komórki normalne uruchamiające procesy proliferacji oraz transformowane nowotworowo rezygnują z niewspółmiernie bardziej wydajnej energetycznie oksydacyjnej fosforylacji na rzecz mniej efektywnej glikolizy oraz jakie włączają mechanizmy w celu realizacji tej strategii. Jedną z tych przyczyn jest upośledzony dostęp tlenu. Dotyczy to zwłaszcza nowotworów wysiękowych oraz innych rosnących szybko i tworzących zbitki komórek (ang. *clusters*), w których dyfuzja tlenu jest ograniczona. Na skutek tego ich wewnętrzne środowisko znajduje się w stanie hipoksji.

¹Dr. ²prof. Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

II. Przyczyny przestawienia komórek z metabolizmu tlenowego na glikolityczny w procesach proliferacji i transformacji nowotworowej

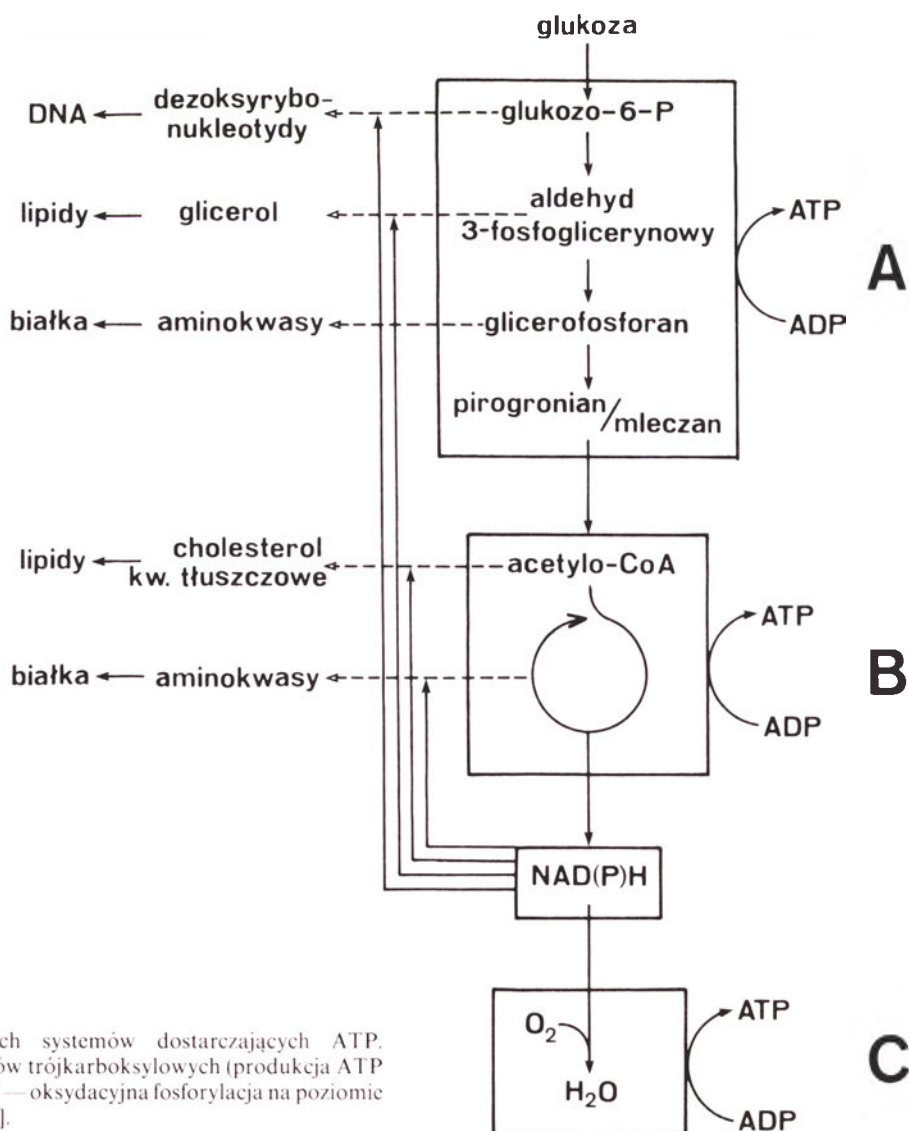
Mimo znacznie gorszej wydajności energetycznej glikolizy w porównaniu z oksydacyjną fosforylacją, ta pierwsza pod pewnymi względami może okazać się korzystniejsza. Dlatego w toku ewolucji wykształcone zostały mechanizmy przekształcające jeden typ przemian energetycznych w drugi. Rozpatrzmy tu dwa takie cele, którym może służyć przestawienie metabolizmu tlenowego na glikolityczny.

II-1. Utrzymanie wysokiego potencjału redukcyjnego

W komórkach transformowanych nowotworowo i prawidłowych szybko proliferujących obserwuje się korelację szybkości glikolizy z szybkością wzrostu i intensywnością biosyntezy DNA, RNA, białek i lipidów. Procesy te, poza zapotrzebowaniem na energię w postaci ATP, wymagają wysokiego stosunku NAD(P)H/NAD(P) czyli potencjału redukcyjnego.

Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie współzależność glikolizy (A), cyklu kwasów trójkarboksylowych (B) oraz oksydacyjnej fosforylacji (C). Procesy te współzawodniczą ze sobą o ADP, a glikoliza i cykl kwasów trójkarboksylowych dostarczają substratów i NAD(P)H do biosyntezy. NADH pochodzenia glikolitycznego utlenia się w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym dzięki istnieniu mechanizmów, przekazujących równoważniki redukcyjne z cytosolu do mitochondriów.

W komórkach proliferujących istnieje zatem konkurencja między zapotrzebowaniem na energię a zapotrzebowaniem na równoważniki redukcyjne do procesów biosyntezy. W związku z tym komórki proliferujące muszą dysponować specjalnymi mechanizmami regulatorowymi utrzymującymi optymalny stosunek aktywności glikolizy do aktywności oksydacyjnej fosforylacji w celu zachowania potrzebnego poziomu potencjału redukcyjnego, a zarazem uzyskiwania wymaganych ilości ATP. Zachodzi to na drodze częściowego przełączania metabolizmu tlenowego na glikolityczny. Warto dodać, że przygotowanie komórek do zmiany fenotypu tlenowego na glikolityczny zaczyna się już w bardzo wczesnych stadiach transfor-



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie trzech systemów dostarczających ATP. A — Układ glikolizy; B — cykl kwasów trójkarboksylowych (produkcja ATP w wyniku fosforylacji substratowej); C — oksydacyjna fosforylacja na poziomie łańcucha oddechowego. Według [77].

macji nowotworowej (przed proliferacją).

II-2. Ochrona przed stresem oksydacyjnym

Podczas transportu elektronów przez łańcuch oddechowy około 2% tlenu pobieranego przez komórki o metabolizmie tlenowym zostaje zredukowane do tzw. reaktywnych form tlenu, przede wszystkim anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru. Związki te powstają głównie w reakcjach z tlenem białek zawierających żelazo w „cyklu Q” łańcucha oddechowego. Przy niedoborze antyoksydantów, a więc przy zachwianiu równowagi prooksydanty/antyoksydanty, oddziaływanie reaktywnych form tlenu z kwasami nukleinowymi, białkami i lipidami może prowadzić do drastycznego zaburzenia funkcji komórki. Niedawno Brand i Hermfisse [3, 4] opublikowali ciekawe dane z doświadczeń nad tymocytami. Komórki te są znakomitym modelem w badaniach przejścia metabolizmu tlenowego w glikolityczny [5]. Można bowiem pobudzić je do wejścia w cykl komórkowy (proliferaacji) przy pomocy mitogenów, komórki zaś niepobudzone, spoczynkowe, traktować jako materiał porównawczy. Wyniki tych badań wykazały, że w komórkach spoczynkowych 88% syntetyzowanego ATP było pochodzenia mitochondrialnego, podczas gdy w komórkach proliferujących tylko 14%. Przejściu tymocytów ze stanu spoczynkowego w cykl komórkowy towarzyszy niemal całkowite zahamowanie produkcji reaktywnych form tlenu. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach z ludzkimi promiencytami HL-60 [3]. Znacznie obniżona zdolność do peroksydacji lipidów jest dobrze udokumentowaną cechą tkanek szybko rosnących i szybko proliferujących komórek nowotworowych [6]. Zatem przejście na metabolizm glikolityczny może być sposobem na zminimalizowanie produkcji reaktywnych form tlenu podczas krytycznych stadiów wzmożonej biosyntezy i podziałów komórkowych. W dodatku przejście to nie tylko ogranicza produkcję reaktywnych form tlenu, ale także wzmacnia system antyoksydacyjny przez wzmożoną produkcję kwasu pirogronowego, będącego niezwykle aktywnym wymiataczem tych związków [7-9]. Potwierdzają to doświadczenia z nieproliferującymi tymocytami inkubowanymi w obecności pirogronianu, który już w stężeniu 10 μ M hamował w tych komórkach produkcję reaktywnych form tlenu o 50%, a w stężeniu 1 mM znosił ją całkowicie.

Jest rzeczą znaną, że brak glukozy w środowisku komórek nowotworowych wywołuje ich śmierć. Prawdopodobnie jest to spowodowane między innymi upośledzeniem funkcji komórek przez stres oksydacyjny. Pracując z komórkami ludzkiego raka sutka (MCF-7/ADR), Lee i wsp. [10] wykazali, że kinaza białkowa MAPK (*mitogen activated protein kinase*) była aktywowana, kiedy komórki były pozbawione glukozy. Brak cukru wywoływał po 3 godzinach stres oksydacyjny przejawiający się, między innymi, trzy-

krotnym wzrostem zawartości utlenionego glutationu. Podanie glukozy hamowało aktywność kinazy. Wzmożona aktywność MAPK towarzysząca stresowi oksydacyjnemu sugeruje, że kinaza ta bierze udział w przenoszeniu sygnału. Powiązanie metabolizmu glukozy z przenoszeniem sygnału przez kinazę aktywowaną przez mitogen może przyczynić się do zrozumienia mechanizmu zmian fenotypowych związanych z nowotworzeniem.

Jak widać, fenotyp glikolityczny komórek proliferujących zapewnia tym komórkom obronę przed stresem oksydacyjnym przez wyłączenie źródła reaktywnych form tlenu, wzmożoną produkcję kwasu pirogronowego i utrzymanie wysokiego potencjału redukcyjnego.

III. Mechanizmy powodujące przestawienie się komórek proliferujących na glikolizę

III-1. W mitochondriach

III-1.1. Redukcja liczby mitochondriów oraz zmiany aktywności enzymów oksydacyjnej fosforylacji

Już Warburg [11] przypuszczał, że powodem przewagi metabolizmu glikolitycznego nad tlenowym mogą być zmiany w łańcuchu oddechowym powstałe podczas transformacji nowotworowej. Hipoteza ta inspirowała późniejsze badania porównawcze energetyki komórek normalnych i transformowanych. Wykazały one, że mitochondrialny DNA jest bardziej podatny na działanie czynników kancerogennych niż jądrowy. Zatem mutacje mitochondrialnego DNA mogłyby być powodem powstawania defektów w mechanizmie oksydacyjnej fosforylacji [12-14]. Wiele nowego w tej dziedzinie wniosły prace Luciakovej i Kuželí [15], którzy badając szybko rosnące nowotwory wątroby zaobserwowali paradoksalną sytuację w bioenergetyce tych komórek. Okazało się bowiem, że ekspresja genów jądrowych kodujących niektóre podjednostki mitochondrialnej F_1F_0 -ATP-azy (syntazy ATP, kompleksu F_1F_0) oraz oksydazy cytochromowej, a także ekspresja genów mitochondrialnych kodujących niektóre podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego w nowotworach wątroby były nieoczekiwanie wyższe niż w hepatocytach zdrowej wątroby. Należało zatem oczekiwać, że aktywność oksydacyjnej fosforylacji w komórkach nowotworowych będzie wyższa niż w komórkach normalnych. Tymczasem była ona niższa. Okazało się jednak, że półokres trwania syntetyzowanych białek był krótszy w komórkach nowotworów. Wnioskowano zatem, że przyczyną zmniejszonej aktywności oddechowej nowotworów może być zredukowana liczba mitochondriów (opisywana już dawniej [1]) spowodowana wzmożoną ich degradacją na skutek zwiększonej aktywności mitochondrialnych proteaz w nowotworach [16]. Luciaková i Kuželá [15] wykazali,

że badane przez nich szybko rosnące nowotwory wątroby zawierały pięciokrotnie mniej mitochondriów niż hepatocyty normalnej wątroby.

Wielce przydatnym modelem w badaniach porównawczych nad metabolizmem energetycznym komórek nieproliferujących i proliferujących, ale nietransformowanych nowotworowo jest regenerująca wątroba. W procesie regeneracji hepatocyty przechodzą przez stadium przejściowe „retoróżnicowania” (ang. *redifferentiation*). W stadium tym podstawowym źródłem energii jest glikoliza. Procesowi retoróżnicowania, podobnie jak w komórkach proliferujących transformowanych nowotworowo, towarzyszy obniżenie aktywności kompleksu F_1F_0 . Zgodnie z wynikami badań zespołu Papy [19-23] obniżenie aktywności oksydacyjnej fosforylacji jest związane z upośledzeniem syntezy podjednostki β syntazy ATP oraz peptydów kompleksu F_0 , przy jednoczesnym wzroście mRNA- βF_1 . Oznacza to, że we wczesnej fazie retoróżnicowania zachodzi aktywacja replikacji DNA oraz transkrypcji genów podjednostki β i prawdopodobnie peptydów kompleksu F_0 . Zjawisko to w końcowym efekcie podobne jest do opisanego wyżej dotyczącego szybko rosnących nowotworów wątroby. Proces translacji podjednostek syntazy ATP był mniej aktywny w tej fazie retoróżnicowania. W drugiej fazie regeneracji wątroby, mianowicie intensywnego wzrostu masy wątroby, nie obserwowano już represji translacji podjednostki β . Enzymy mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji odzyskiwały normalną aktywność równoległe z odzyskiwaniem pierwotnej masy wątroby. Podobnie dzieje się w wątrobie noworodków. Można zatem wnioskować, że podczas regeneracji oraz postnatalnego rozwoju wątroby wymagana jest harmonijna ekspresja podjednostek kompleksu F_1F_0 . Inaczej jest w komórkach nowotworowych, w których zwiększona ekspresja genów kodujących podjednostki tego enzymu prowadzi do „nieproduktywnego” poziomu mRNA. Można zatem wnioskować, że defekt w biosyntezie F_1F_0 wyrażający się obniżeniem syntezy najważniejszej (bo zawierającej centrum aktywne enzymu) podjednostki β oraz atak enzymów proteolitycznych na zsyntetyzowane już białka mitochondrialne są głównymi przyczynami niskiej aktywności oddechowej nowotworów.

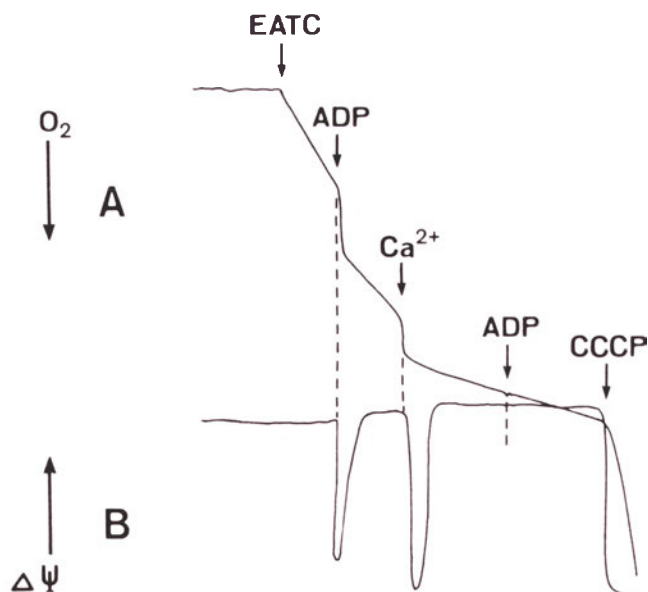
W rozważaniach nad zmniejszoną aktywnością syntazy ATP w mitochondriach nowotworów nie sposób pominąć roli naturalnego inhibitora tego enzymu. Jest to niewielki peptyd (około 10 kDa) [24-27], który

* Mitochondrialny kompleks enzymatyczny, oznaczony jako F_1F_0 , w energetycznie sprzężonych i zenergizowanych mitochondriach funkcjonuje jako syntaza ATP; w mitochondriach zdeenergizowanych katalizuje reakcję odwrotną, czyli hydrolizę ATP, i dlatego bywa określany jako F_1F_0 -ATP-aza. W dalszym kontekście oba te terminy będą używane wymiennie. Czytelnika zainteresowanego budową i funkcją kompleksu F_1F_0 odsyłamy do opublikowanych przez autorów niniejszego opracowania artykułów przeglądowych [16, 17].

wiąże się odwracalnie z enzymem, pełniąc funkcje regulatora jego aktywności. Podczas wzmożonej glikolizy, na skutek zakwaszenia wnętrza komórki, występują szczególnie dogodne warunki wiązania inhibitora. Ponadto, zgodnie z danymi Lucia i Kuzeli [28], w komórkach nowotworowych zachodzi wzmożona ekspresja genu kodującego ten inhibitorowy peptyd. Jego zawartość w tych komórkach jest czterokrotnie wyższa niż w komórkach normalnych, nietransformowanych. Może być on zatem ważnym czynnikiem w regulowaniu stosunku aktywności oksydacyjnej fosforylacji do glikolizy w komórkach nowotworowych. Zgodnie z sugestią Papy i w s p. [29], którzy zsyntetyzowali segmenty peptydu odpowiedzialne za hamowanie F_1F_0 -ATP-azy, mógłby on nawet odegrać ważną rolę w terapii nowotworów, bowiem poli- i monoklonalne przeciwciała inhibitora mogą mieć zastosowanie w diagnostyce nowotworów.

III-1.2. Rola jonów Ca^{2+}

Mitochondria tkanek prawidłowych, zróżnicowanych, zdolne są do gromadzenia w matriks ograniczonych ilości jonów Ca^{2+} bez istotnych zmian w mechanizmie oksydacyjnej fosforylacji [30-32]. Inaczej jest w mitochondriach nowotworów. Zaobserwowano, że po nagromadzeniu nawet niewielkich ilości wapnia w mitochondriach raka wysiękowego Ehrlicha oraz nowotworów wątroby zachodzi hamowanie oddychania sprzężonego z oksydacyjną fosforylacją [32-35]. Należy dodać, że przy niemal całkowitym zahamowa-



Ryc. 2. Hamowanie oksydacyjnej fosforylacji przez jony Ca^{2+} w uprzedczalonych komórkach raka wysiękowego Ehrlicha. A — Zużycie tlenu mierzone przy pomocy elektrody tlenowej; B — potencjał błonowy mitochondriów. $\Delta\Psi$, rejestrowany przy pomocy elektrody jonoselektywnej wrażliwej na jon tetrafenylofosfoniowy. Oznaczenia: EATC — Zawieszina komórek raka Ehrlicha uprzedczalonych digitoniną; CCCP — karbonylocyjanek m-chlorofenylhydrazonu.

niu oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach tych nie obserwowano zmian przepuszczalności błony mitochondrialnej indukowanej jonami wapnia (*permeability transition effect*), co ma miejsce w mitochondriach tkanek prawidłowych „przeładowanych” jonami Ca^{2+} i prowadzi do spadku mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\psi$) i rozprężenia oksydacyjnej fosforylacji [36]. Jak pokazano na rycinie 2, po akumulacji Ca^{2+} i zahamowaniu oksydacyjnej fosforylacji $\Delta\psi$ w komórkach raka wąsiekowego Ehrlicha utrzymuje się na wysokim poziomie i co więcej, nie ulega obniżeniu przez ADP. Jednak czynniki rozprzegające oksydacyjną fosforylację w pełni znoszą efekt hamowania przez Ca^{2+} oddychania mitochondriów, co wyklucza hamowanie łańcucha oddechowego przez jony wapnia. Wszystko to wskazuje, że w komórkach nowotworowych akumulacja Ca^{2+} hamuje oksydacyjną fosforylację nie na zasadzie jej rozprzegania (jak w mitochondriach tkanek prawidłowych) lecz przez zahamowanie syntazy ATP. Podobnie działa np. używany często w badaniach oksydacyjnej fosforylacji antybiotyk oligomycyna.

Badając wpływ jonów wapnia na aktywność kompleksu F_1F_0 w komórkach raka wąsiekowego Ehrlicha [37] oraz wątrobiaka Zajdela [37A] autorzy niniejszego artykułu stwierdzili, że — w przeciwieństwie do zdrowej wątroby — jony te już w mikromolarnych stężeniach hamowały ATP-azę mitochondrialną. Co więcej, okazało się, że efekt hamowania można było obserwować jedynie w cząstkach submitochondrialnych zawierających naturalny inhibitor ATP-azy. Pozbawienie mitochondriów tego peptydu znosiło hamowania ATP-azy przez Ca^{2+} . Można zatem przypuszczać, że jony wapnia sprzyjały wiązaniu się inhibitora z enzymem w mitochondriach komórek nowotworowych. Być może, do hamowania enzymu przez Ca^{2+} przyczynia się także większa zawartość tego naturalnego inhibitora w komórkach nowotworowych niż w komórkach nietransformowanych [28]. Przyczyny tak znacznej wrażliwości ATP-azy mitochondrialnej nowotworów na hamujące działanie jonów wapnia nie są jednak w pełni wyjaśnione.

III-2. W cytosolu

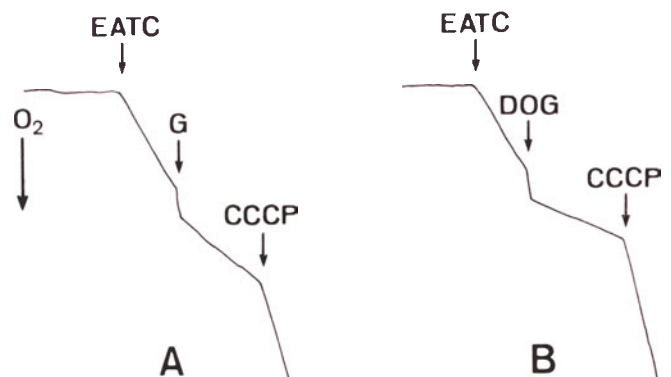
Badania ostatnich dwudziestu lat wykazały, że heksokinaza (enzym rozpoczynający szlak przemian glikolitycznych), a szczególnie jej izoforma II, odgrywa kluczową rolę w inicjowaniu i zachowywaniu wysokiej szybkości glikolizy w szybko rosnących niezróżnicowanych nowotworach [38-40]. Glukoza-6-fosforan, produkt reakcji heksokinazy i początkowy intermedial szlaku przemian glikolitycznych, jest również, poprzez cykl pentozowy, prekursorem syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych (Ryc. 1) a także dostarcza NADPH, dawcy elektronów dla redukcyjnych procesów biosyntezy. W komórkach nowotworowych obserwowano wzrost liczby kopii genu heksokinazy typu II,

co wpływa na zwiększoną zawartość tego izoenzymu w komórce. Heksokinaza II ma szczególną właściwość wiązania się z zewnętrzną błoną mitochondrialną. Wiązanie to zachodzi przede wszystkim w miejscach fuzji między błoną zewnętrzną a wewnętrzną, tak zwanych miejscach kontaktowych [41]. W pobliżu tych miejsc zlokalizowana jest również poryna, białko kanałowe błony zewnętrznej, oraz translokaza nukleotydów adeninowych, specyficzny transporter ATP i ADP wewnętrznej błony mitochondrialnej. Dzięki takiej topografii heksokinaza, związana z błoną mitochondrialną, ma łatwiejszy dostęp do syntetyzowanego w mitochondriach ATP, natomiast chroniona jest przed obecnym w cytosolu glukoza-6-fosforanem, inhibitorem tego enzymu. Innymi słowy, taki „kanałowy” system transportu ułatwia heksokinazie „przechwytywanie” mitochondrialnego ATP [42-45].

Wymienione szczególnie właściwości heksokinazy II charakterystycznej dla komórek szybko rosnących nowotworów pozwalają przypuszczać, że może być ona głównym ogniwem w łańcuchu przemian zachodzących w procesie „przełączania” metabolizmu tlenowego na glikolityczny.

Innym ważnym enzymem w tych przemianach jest kinaza pirogronianowa [46]. Wzmoczona ekspresja genu tego enzymu powoduje, że, podobnie jak heksokinaza, odgrywa on istotną rolę w metabolizmie energetycznym komórek nowotworowych. Zwiększenie zawartości enzymu w cytosolu wywołuje zwiększone zapotrzebowanie na ADP (substrat kinazy pirogronianowej). Podtrzymaniu aktywności enzymu sprzyja zapewne wzmoczona aktywność heksokinazy, jednego z „dostawców” ADP. Jednak głównym dostawcą ADP według Rackera [47] jest Na^+ , K^+ -ATP-aza, której aktywność w komórkach nowotworów jest wysoka.

Na uwagę zasługuje też stwierdzona w niektórych nowotworach wzmoczona ekspresja genu kodującego izoformę A dehydrogenazy mleczanowej, LDH-A, wywołana aktywacją genu przez czynnik transkrypcyjny c-Myc [48] odpowiedzialny także za nadekspresję omówionych wyżej enzymów glikolitycznych [49].



Ryc. 3. Efekt Crabtree w komórkach raka wąsiekowego Ehrlicha wywołany glukozą (A) i dezyksyglukozą (B). Oznaczenia: EATC — zawiesina komórek raka Ehrlicha; G — glukoza (ostateczne stężenie 10 mM); DOG — dezyksyglukoza (10 mM); CCCP 2 μM .

Izoforma A enzymu komórek normalnych, w przeciwieństwie do izoformy B, wykazuje większe powinowactwo do pirogronianu. Zatem reakcja przekształcenia pirogronianu w mleczan z jej udziałem przebiega szybciej.

W cytosolu komórek nowotworowych istnieją też inne mechanizmy mogące ograniczać aktywność oksydacyjnej fosforylacji. Na przykład La Noue i w s p. [50] zwrócili uwagę, że oba znane mechanizmy przenoszenia równoważników redukcyjnych z cytosolu do mitochondriów, mianowicie glicerolo-3-fosforanowy i jabłczanowo-asparaginianowy, są mniej aktywne w komórkach nowotworowych niż w normalnych. Upośledzony transport elektronów z cytosolowego NADH na łańcuch oddechowy sprzyja utrzymaniu cytosolowego potencjału redukcyjnego na wysokim poziomie.

IV. Efekt Crabtree

IV-1. Hamowanie oddychania przez glukozę

Wyrazem przełączenia metabolizmu energetycznego z tlenowego na glikolityczny w komórkach proliferujących jest hamowanie przez glukozę intensywności ich oddychania, zjawisko nazwane od nazwiska jego odkrywcy efektem Crabtree. Crabtree [51] pierwszy zaobserwował, że zużycie tlenu przez skrawki niektórych tkanek nowotworowych ulega obniżeniu po dodaniu glukozy, podczas gdy w tkankach normalnych, przeciwnie, obserwuje się nawet nieznaczną aktywację. Po latach stosunkowo małego zainteresowania efektem Crabtree zaczął on przyciągać uwagę badaczy dopiero w latach 50-tych, kiedy to wykazano hamowanie oddychania przez glukozę komórek raka wąsiekowego Ehrlicha [52-58].

Na rycinie 3 przedstawiono efekt Crabtree w komórkach raka Ehrlicha zarejestrowany przy pomocy elektrody tlenowej. Jak widać z przebiegu krzywych, glukozą będącą substratem glikolizy i dezoksyglukoza będąca jej inhibitorem hamują oddychanie komórek po jego krótkotrwałej aktywacji. Hamowaniu oddychania przez glukozę towarzyszy zakwaszenie środowiska w wyniku aktywacji glikolizy oraz redukcja nukleotydów nikotynamidowych (nie pokazana na rycinie). Początkowa aktywacja pobierania tlenu przez komórkę jest wynikiem fosforylowania obu cukrów przez ATP i powstania ADP. Aktywacja zaś zahamowanego pod wpływem obu cukrów oddychania przez czynnik rozprzęgający oksydacyjną fosforylację (CCCP) może świadczyć o przypuszczalnym miejscu hamowania — kompleksie enzymatycznym F_1F_0 .

Zwraca uwagę podobieństwo hamowania przez glukozę oddychania całych komórek do pokazanego na rycinie 2 hamowania pobierania tlenu przez izolowane mitochondria raka Ehrlicha pod wpływem jonów Ca^{2+} . Obecnie, kiedy wiemy już dużo o fenotypie glikolitycznym komórek nowotworowych, efekt

Crabtree wydaje się być jego naturalną konsekwencją, a przebieg wydarzeń prowadzących do hamowania oddychania przez glukozę można przedstawić następująco: 1) aktywacja glikolizy po podaniu glukozy; 2) na skutek aktywacji glikolizy zmniejsza się podaż ADP (substratu syntazy ATP) oraz fosforanu, których niedobór powinien ograniczać oksydacyjną fosforylację; 3) mitochondria przechodzą na wyższy poziom energetyczny i następuje hamowanie oddychania sprzężonego z oksydacyjną fosforylacją. Model ten zakłada zatem konkurencję o ADP i prawdopodobnie fosforan nieorganiczny między glikolizą a oksydacyjną fosforylacją.

Jednakże dokładniejsze badania wykazały, że mechanizm ten nie wyjaśnia wszystkich danych doświadczalnych dotyczących efektu Crabtree. Na przykład kwasy jodo- i bromooctowy oraz aldehyd glicerynowy, inhibitory glikolizy, nie znoszą efektu hamowania oddychania przez glukozę [55]. Dezoksyglukoza, cukier łatwo transportowany do komórek, który obniża w nich poziom ATP a podwyższa ADP na skutek fosforylowania go przez heksokinazę, natomiast nie ulega dalszym przemianom w szlaku glikolizy, wywołuje podobny do glukozy efekt hamowania oddychania (patrz Ryc. 3). Wskazuje to, iż nie konkurencja o ADP między glikolizą a oksydacyjną fosforylacją jest głównym mechanizmem efektu Crabtree. Nie należy jednak zapominać, że drastyczny spadek ATP w komórce wywołany przez fosforylowanie dezoksyglukozy może zaburzyć jej podstawowe funkcje. Może się okazać, że mechanizm hamowania oddychania przez dezoksyglukozę jest inny niż w przypadku glukozy, a podobieństwo jest przypadkowe. Innym faktem doświadczalnym, trudnym do wyjaśnienia przy pomocy „modelu konkurencyjnego”, jest brak znoszenia efektu Crabtree przez podwyższenie stężenia fosforanu w komórce. W niektórych przypadkach obserwuje się nawet pogłębienie hamowania przez glukozę oddychania w obecności nadmiaru fosforanu [57].

Ta sytuacja skłoniła do poszukiwań innych mechanizmów mogących tłumaczyć efekt Crabtree.

IV-2. Udział jonów Ca^{2+} w efekcie Crabtree

Jedną z podstawowych funkcji mitochondriów (obok oksydacyjnej fosforylacji) jest zależne od energii gromadzenie jonów wapniowych. Wysoki potencjał (około - 180 mV) na błonie mitochondrialnej, wraz z obecnością specyficznego transportera jonów Ca^{2+} , stanowi niezwykle aktywny system transportu Ca^{2+} do mitochondriów. Do niedawna uważano, że system ten służy głównie do regulowania stężenia wolnego wapnia w cytosolu. Stosunkowo niedawno wykazano [59-73], że ważną funkcją tego systemu jest również przekazywanie sygnałów Ca^{2+} do matriks mitochondrialnej podczas zależnej od hormonów [59, 72, 73] lub ATP (agonisty receptorów purynergiczych) [65] mobilizacji jonów Ca^{2+} w cytosolu. Może on zatem

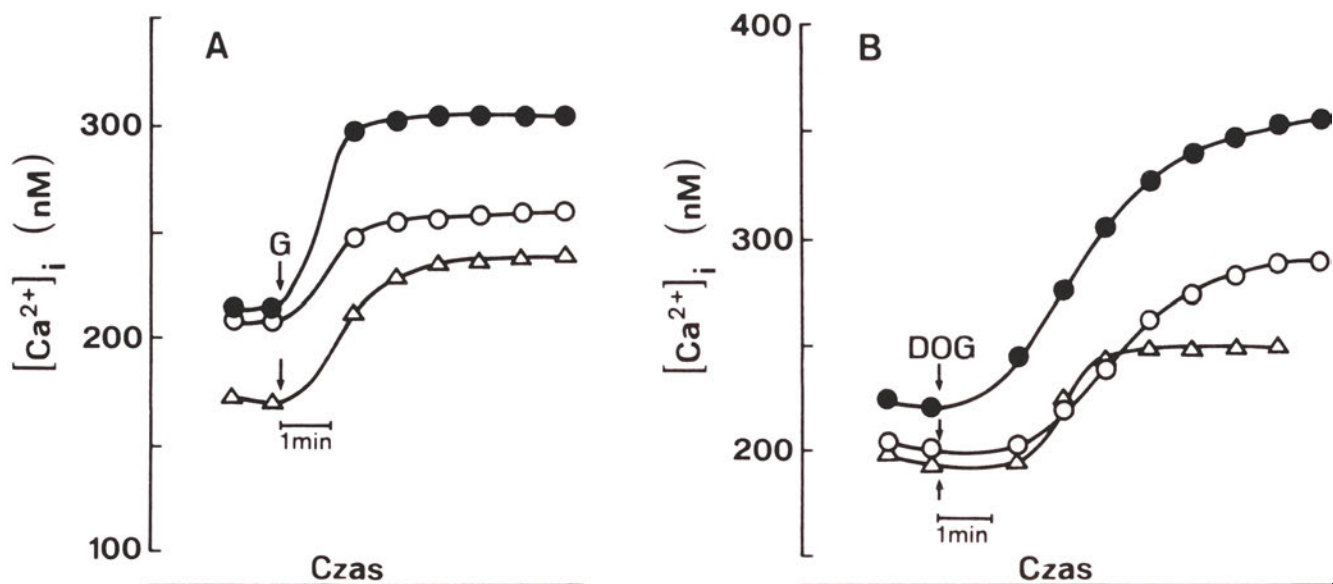
odgrywać rolę czynnika regulatorowego metabolizmu mitochondriów *in vivo*.

Obecność jonów Ca^{2+} w matriks mitochondrialnej aktywuje dehydrogenazy α -ketoglutaranową, izocytrynianową i pirogronianową, powodując zwiększenie podaży równoważników redukcyjnych na łańcuch oddechowy, co w efekcie prowadzi do aktywacji oksydacyjnej fosforylacji, a więc syntezy ATP. Ostatnio **Robb-Gaspers i wsp.** [73], badając wpływ wazopresyny na mobilizację Ca^{2+} w cytosolu hepatocytów, stwierdzili, że niezależnie od aktywacji wymienionych dehydrogenaz, również aktywność łańcucha oddechowego ulega stymulacji przez jony Ca^{2+} . W komórkach prawidłowych stymulacja dehydrogenaz oraz łańcucha oddechowego przez jony wapnia daje w rezultacie wzmoczoną syntezę ATP, co umożliwia podwyższenie aktywności pompy wapniowej w błonie plazmatycznej. Inaczej jest prawdopodobnie w komórkach nowotworowych (raka Ehrlicha, hepatomy Zajdela), w których być może hamujący wpływ jonów Ca^{2+} na syntazę ATP przewyższa ich wpływ aktywujący na oksydacyjną fosforylację, prowadząc w konsekwencji do hamowania syntezy ATP.

Autorzy niniejszego artykułu wraz ze współpracownikami wykazali istotnie, że jony Ca^{2+} wprowadzone do komórek raka Ehrlicha (dzięki ich uprzepuszczeniu) powodują obniżenie szybkości syntezy ATP już w stężeniach nieco wyższych od tych, jakie występują w cytosolu [74]. Już wcześniej jednak, stosując fluorescencyjną „sondę molekularną”, fura-2, którą można przyżyciowo wprowadzić do komórki, pokazaliśmy, że w komórkach raka wsiętkowego Ehrlicha [75] oraz wątrobiaka Zajdela [37A] glukoza i dezoksyglukoza wywołują podwyższenie stężenia jonów Ca^{2+} w cytosolu (Ryc. 4). Wyniki te, otrzymane dla zawiesiny komórek, udało się następnie potwierdzić, analizując za pomocą komputerowego systemu obróbki obrazu,

w pojedynczych komórkach nowotworu [76]. Ponieważ podwyższenie cytosolowego stężenia Ca^{2+} pod wpływem glukozy lub dezoksyglukozy zachodziło również w środowisku bezwapniowym, można było sądzić, iż pojawiające się jony wapnia pochodziły z wewnątrzkomórkowych magazynów Ca^{2+} a nie z zewnątrz. Potwierdziły to obserwacje, że po podwyższeniu stężenia wolnych jonów wapnia w cytosolu przez glukozę, inne czynniki wywołujące mobilizację Ca^{2+} z magazynów siateczki endoplazmatycznej, jak ATP (agonista receptorów purynergetycznych) i tapsigargina (inhibitor Ca^{2+} -ATP-azy), działały znacznie słabiej. Można zatem przypuszczać, że podwyższenie pod wpływem glukozy lub dezoksyglukozy cytosolowego stężenia jonów Ca^{2+} w komórkach nowotworowych pociąga za sobą zwiększone pobieranie tych jonów przez mitochondria, co z kolei wywołuje hamowanie oksydacyjnej fosforylacji przez hamowanie kompleksu F_1F_0 .

Przytoczone obserwacje nie wyjaśniają jednak mechanizmu, w jaki glukoza powoduje podwyższenie stężenia jonów wapnia w cytosolu. Jednym z proponowanych wyjaśnień [77] jest wzmoczona w komórkach nowotworowych aktywność heksokinazy (opisana wyżej) prowadząca do gwałtownego fosforylowania glukozy (i dezoksyglukozy), a co za tym idzie, do szybkiego spadku stężenia ATP wywołującego spadek szybkości usuwania jonów wapnia przez obie Ca^{2+} -ATP-azy — w błonie plazmatycznej oraz w błonie siateczki endoplazmatycznej. Hamowanie pierwszej z wymienionych mogłoby prowadzić do upośledzenia procesu wypompowywania jonów Ca^{2+} z cytosolu na zewnątrz komórki, hamowanie zaś drugiej do obniżenia transportu wapnia z cytosolu do magazynów siateczki endoplazmatycznej. Oba procesy mogłyby zakłócić istniejącą w normalnych warunkach równowagę między napływem Ca^{2+} a jego wypompowywa-



Ryc. 4. Wpływ glukozy (A) i dezoksyglukozy (B) na stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w cytosolu komórek raka Ehrlicha. Stężenie Ca^{2+} w cytosolu ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mierzono fluorymetrycznie przy pomocy sondy molekularnej fura-2. Środowisko inkubacyjne zawierało CaCl_2 w stężeniach: (●) 2 mM, (○) 0.1 mM lub (▲) 0 mM (= 2 mM EGTA). Według [75].

niem. W przypadku glukozy jednak tłumaczenie takie nie wydaje się prawdopodobne, gdyż wysoka aktywność glikolizy zapobiega niedoborowi ATP. Innym możliwym wyjaśnieniem mechanizmu mobilizacji jonów Ca^{2+} przez oba cukry może być hamowanie obu Ca^{2+} -ATP-az na skutek ich nieenzymatycznej glikozylacji. Taki efekt glukozy na pompę wapniową zaobserwowano w błonie erytrocytów [78, 79]. Glikozylacja Ca^{2+} -ATP-azy w siateczce endoplazmatycznej mogłaby prowadzić do efektu podobnego do wywołanego przez tapsigarginę. Natomiast glikozylacja Ca^{2+} -ATP-azy w błonie plazmatycznej komórek nowotworowych uniemożliwiłaby wypompowywanie jonów Ca^{2+} z cytosolu do środowiska. W obu przypadkach wzrastałby w cytosolu poziom jonów Ca^{2+} , które przy dostatecznie wysokim stężeniu mogłyby być pobierane przez mitochondria. Ostatnie badania istotnie wykazały kowalencyjne wiązanie się glukozy i dezoksyglukozy do białek komórek raka Ehrlicha oraz zwolnienie tempa usuwania Ca^{2+} z cytosolu po zadziaaniu na te komórki glukozą [37A].

Podsumowując wyniki tych badań, można postawić tezę, że jony wapnia pełnią w komórkach proliferujących rolę wtórnego przekąźnika przełączającego metabolizm energetyczny z tlenowego na glikolityczny. W myśl zaproponowanej hipotezy [37, 37A, 80] efekt Crabtree jest wynikiem następującej sekwencji wydarzeń:

1. Glukoza wywołuje uwolnienie jonów Ca^{2+} z magazynów siateczki endoplazmatycznej komórek nowotworowych lub/i ich napływ do cytosolu ze środowiska.

2. Zwiększenie stężenia jonów Ca^{2+} w cytosolu powoduje ich akumulację w mitochondriach. Sprzyja temu szczególnie aktywny system transportu wapnia obserwowany w mitochondriach nowotworowych.

3. Nagromadzony w mitochondriach wapń hamuje syntazę ATP (kompleks F_1F_0) prawdopodobnie poprzez wzmaganie działania naturalnego inhibitora tego enzymu.

4. Hamowanie kompleksu F_1F_0 prowadzi do obniżenia intensywności zużycia tlenu sprzężonego z syntezą ATP, co jest istotą efektu Crabtree.

Można również oczekiwać, że inne czynniki wywołujące mobilizację jonów Ca^{2+} w cytosolu, na przykład niektóre hormony, będą miały podobny efekt. Propozycja hipotezy może zatem przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu zmiany fenotypu metabolicznego komórek w procesie nowotworzenia.

Artykuł otrzymano 4 stycznia 1999 r.
Zaakceptowano do druku 4 lutego 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Pedersen PL (1978) *Prog Exp Tumor Res* **22**: 190-274
2. Warburg O, Poesner K, Negelein E (1924) *Biochem J* **152**: 309-344
3. Brand KA, Hermfisse U (1997) *FASEB J* **11**: 388-395

4. Brand KA (1997) *J Bioenerg Biomembr* **29**: 355-364
5. Greiner EF, Guppy M, Brand K (1994) *J Biol Chem* **269**: 31484-31490
6. Dianzani MU (1993) *Crit Rev Oncol Hematol* **15**: 125-147
7. Andrae U, Singh J, Ziegler-Skylakakis K (1985) *Toxicol Lett* **28**: 93-98
8. O'Donnell-Tormey J, Nathan CF, Lanks K, DeBoer CJ, de la Harpe J (1987) *J Exp Med* **165**: 500-514
9. Dröge W, Roth S, Altmann A, Mihm S (1987) *Cell Immunol* **108**: 405-416
10. Lee YJ, Galsforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz D (1998) *J Biol Chem* **273**: 5294-5299
11. Warburg O (1956) *Science* **123**: 309-314
12. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7915-7922
13. Singh G, Sharkey SM, Moorehead R (1992) *Pharmacol Ther* **54**: 217-230
14. King MP (1995) *J Mol Med* **73**: B34
15. Luciaková K, Kuželá S (1992) *Eur J Biochem* **205**: 1187-1193
16. Goldberg AL (1992) *Eur J Biochem* **203**: 9-23
17. Bogucka K (1997) *Kosmos* **46**: 137-146
18. Wojtczak L (1998) *Post Biochem* **44**: 2-5
19. Buckle M, Guerrieri F, Papa S (1985) *FEBS Lett* **188**: 345-351
20. Buckle M, Guerrieri F, Paziencia A, Papa S (1986) *Eur J Biochem* **155**: 439-445
21. Guerrieri F, Kalous M, Capozza G, Muolo L, Drahotá Z, Papa S (1994) *Biochem Mol Biol Int* **33**: 117-129
22. Guerrieri F, Muolo L, Cocco T, Capozza G, Turturro N, Cantatore P, Papa S (1995) *Biochim Biophys Acta* **1272**: 95-100
23. Capuano F, Guerrieri F, Papa S (1997) *J Bioenerg Biomembr* **29**: 379-384
24. Pullman ME, Monroy GC (1963) *J Biol Chem* **238**: 3762-3769
25. Harris DA, von Tschärner V, Radda GK (1979) *Biochim Biophys Acta* **548**: 72-84
26. Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Ernster L (1979) *Biochim Biophys Acta* **547**: 252-257
27. Schwerzmann K, Pedersen PL (1981) *Biochemistry* **20**: 6305-6311
28. Luciaková K, Kuželá S (1984) *FEBS Lett* **177**: 85-88
29. Papa S, Zanotti F, Cocco T, Perrucci C, Candita C, Minuto M (1996) *Eur J Biochem* **240**: 461-467
30. Rossi CS, Lehninger AL (1964) *J Biol Chem* **239**: 3971-3980
31. Vercesi A, Reynefarje B, Lehninger AL (1978) *J Biol Chem* **253**: 6379-6385
32. Teplova VV, Zinchenko VP, Evtodienko YuV (1985) *Studia Biophys* **109**: 65-72
33. Thorne RFW, Bygrave FL (1974) *Nature (Lond)* **248**: 348-351
34. Thorne RFW, Bygrave FL (1974) *Biochem J* **144**: 551-558
35. Villalobo A, Lehninger AL (1980) *J Biol Chem* **255**: 2457-2464
36. Gunter TE, Pfeiffer DR (1990) *Amer J Physiol* **258**: C755-C786
37. Bogucka K, Teplova VV, Wojtczak L, Evtodienko YuV (1995) *Biochim Biophys Acta* **1228**: 261-266
- 37A. Wojtczak L, Teplova VV, Bogucka K, Czyż A, Makowska A, Więckowski MR, Duszyński J, Evtodienko YuV (1999) *Eur J Biochem*, w druku
38. Knull HR, Taylor WF, Wells WW (1973) *J Biol Chem* **248**: 5414-5418
39. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL (1995) *J Biol Chem* **270**: 16918-16925
40. Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL (1997) *J Biol Chem* **272**: 22776-22780
41. Brdiczka D (1991) *Biochim Biophys Acta* **1071**: 291-312
42. Adams V, Bosch W, Schlegel J, Wallimann T, Brdiczka D (1989) *Biochim Biophys Acta* **981**: 213-225
43. Kottke M, Adams V, Riesinger I, Bremm G, Bosch W, Brdiczka D, Sandri G, Panfili E (1988)

- Biochim Biophys Acta* **935**: 87-102
44. Dorbani L, Jancsik V, Linden M, Leterrier JF, Nelson BD, Rendon A (1987) *Arch. Biochem Biophys* **252**: 188-196
 45. Laterveer FD, Gellerich FN, Nicolay K (1995) *Eur J Biochem* **232**: 569-577
 46. Oude Weernink PA, Rijksen G, van der Heijden MCM, Staal GEJ (1979) *Cancer Res* **50**: 4604-4610
 47. Racker E (1976) *J Cell Physiol* **89**: 697-700
 48. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu C-S, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997) *Proc Natl Sci USA* **94**: 6658-6663
 49. Dang CV, Lewis BC, Dolde C, Dang G, Shim H (1997) *J Bioenerg Biomembr* **29**: 345-354
 50. LaNoue KF, Hemington JG, Onishi JG, Morris HP, Williamson JR (1977) W: Kenneth W. McKerns W (red) *Hormones and Cancer*, Academic Press, New York, str 319-329
 51. Crabtree HG (1929) *Biochem J* **23**: 536-545
 52. Kun E, Talalay P, Williams-Ashman HG (1951) *Cancer Res* **11**: 855-863
 53. Racker E (1956) *Ann NY Acad Sci* **63**: 1017-1021
 54. Chance B, Hess B (1959) *J Biol Chem* **234**: 2416-2420
 55. Ibsen KH, Coe EL, McKee RW (1958) *Biochim Biophys Acta* **30**: 384-400
 56. Wu R, Racker E (1959) *J Biol Chem* **234**: 1036-1041
 57. Ibsen KH, Coe EL, McKee RW (1960) *Cancer Res* **20**: 1399-1407
 58. Ibsen KH (1961) *Cancer Res* **21**: 829-841
 59. Biden TJ, Wolkheim CB, Schlegel W (1984) *J Biol Chem* **261**: 7223-7229
 60. Assimacopoulos-Jeannet F, McCormack JG, Jeanrenaud B (1986) *Biochem J* **261**: 8799-8804
 61. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM (1990) *Physiol Rev* **70**: 391-425
 62. Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, Pozzan T (1992) *Nature (Lond)* **358**: 325-327
 63. Duchen MR (1992) *Biochem J* **283**: 41-50
 64. Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) *Science* **262**: 745-746
 65. Loew LM, Carrington W, Tuft RA, Fay FS (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12579-12583
 66. Hajnóczky G, Lin C, Thomas AP (1994) *J Biol Chem* **269**: 10280-10287
 67. Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995) *Cell* **82**: 415-424
 68. Rutter GA, Burnett P, Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T, Tavaré JM, Denton RM (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5489-5494
 69. Ichas F, Jouaville LS, Mazat J-P (1997) *Cell* **89**: 1145-1153
 70. Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B (1997) *J Cell Biol* **136**: 833-844
 71. Hoth M, Fanger CM, Lewis RS (1997) *J Cell Biol* **137**: 633-648
 72. Lawrie AM, Zolle O, Simpson AWM (1997) *Cell Calcium* **22**: 229-234
 73. Robb-Gaspers LD, Burnett P, Rutter GA, Denton RM, Rizzuto R, Thomas AP (1998) *EMBO J* **17**: 4987-5000
 74. Evtodienko YuV, Teplova VV, Duszyński J, Bogucka K, Wojtczak L (1994) *Cell Calcium* **15**: 439-446
 75. Teplova VV, Bogucka K, Czyż A, Evtodienko YuV, Duszyński J, Wojtczak L (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1148-1154
 76. Czyż A, Teplova VV, Sabała P, Czarny M, Evtodienko YuV, Wojtczak L (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 539-544
 77. Evtodienko YuV, Teplova VV (1996) *Biochimija* **61**: 1995-2004; ang. *Biochemistry (Moscow)* **61**: 1423-1431
 78. Deziel MR, Safer RS, Davis PJ (1992) *Biochim Biophys Acta* **1110**: 119-122
 79. González Flecha FL, Castello PR, Caride AJ, Gagliardino JJ, Rossi JPF (1993) *Biochem J* **293**: 369-375
 80. Wojtczak L (1996) *Acta Biochim Polon* **43**: 361-368

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

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

Współdziałanie receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu z integrynami podczas adhezji i migracji komórek

Interaction of urokinase-type plasminogen activator receptor with integrins during cell adhesion and migration

CZESŁAW S. CIERNIEWSKI¹,
ALEKSANDRA CIERNIEWSKA-CIEŚLAK²,
ZOFIA PAWŁOWSKA³

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Oddziaływanie komórek z macierzą zewnątrzkomórkową podczas adhezji i migracji
- III. Aktywacja plazminogenu na powierzchni komórek
 - III-1. Receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu
 - III-1.1. Rola receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu w wytwarzaniu plazminy na powierzchni komórkowej
 - III-1.2. Bezpośrednie oddziaływanie receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu ze składnikami macierzy
 - III-1.3. Receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu i transdukcja sygnału
- IV. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; GM-CSF — czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe; IFN — interferon; IL — interleukina; M-CSF — czynnik stymulujący kolonie makrofagowe; NGF — czynnik wzrostu nerwu; PAI-1 — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1; PAI-2 — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 2; PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostu; TGFβ — transformujący czynnik wzrostu β; TNF — czynnik martwicy nowotworów; t-PA — tkankowy aktywator plazminogenu; u-PA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego; u-PAR — receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego.

I. Wprowadzenie

Aktywacja plazminogenu stanowi nie tylko podstawowy etap procesu fibrynolizy, ale także zachodzi wszędzie tam, gdzie pojawia się potrzeba proteolitycznego rozpuszczenia barier biologicznych. Ma to miejsce podczas procesów zapalnych, implantacji trofoblastu, owulacji, rozwoju tkanek, angiogenezy, regeneracji

Contents:

- I. Introduction
- II. Interaction of cells with extracellular matrix during adhesion and migration
- III. Activation of plasminogen on cell surface
 - III-1. Receptor of urokinase-type plasminogen activator
 - III-1.1. Role of urokinase-type plasminogen activator receptor in generation of plasmin on cell surface
 - III-1.2. Direct interaction of urokinase-type plasminogen activator receptor with components of matrix
 - III-1.3. Receptor of urokinase-type plasminogen activator and signal transduction
- IV. Concluding remarks

nerwu, gojenia ran, procesów nowotworowych i inwazji komórek nowotworowych [1-4]. Tak olbrzymia różnorodność procesów związanych z działaniem plazminy podkreśla znaczenie precyzyjnych mechanizmów kontrolujących jej aktywność i ograniczających jej miejsce oraz czas działania. Obejmują one zarówno inaktywację plazminy, jak i zahamowanie jej powstawania. Ten ostatni mechanizm jest szczególnie istotny podczas regulacji pojawiania się aktywności proteolitycznej plazminy, a kontrolowany jest przez inhibitory aktywatorów plazminogenu (PAI-1, PAI-2).

Przebieg wyżej wymienionych procesów uwarunkowany jest także harmonijnym oddziaływaniem wielu białek błony komórkowej, zwłaszcza receptorów integrynowych, z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej [5-8]. Tak więc, również i swoista adhezja komórek odgrywa w nich kluczową rolę. Z tego powodu białka błony komórkowej odpowiedzialne za adhezję komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej oraz składniki układu fibrynolitycznego znajdują się w centrum zainteresowania wielu dziedzin biologii

¹ Prof. dr hab., ² dr hab., Zakład Biofizyki, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź. ³ mgr, Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi, ul. Lodowa 106, Łódź.

* Artykuł opracowany na podstawie wykładu wygłoszonego podczas XXIV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku.

i medycyny. Ostatnio, do grupy białek odpowiedzialnych za adhezję i migrację komórek dołączono również receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu, określane jako u-PAR [9]. Tak splatają się ciągi reakcji, które z jednej strony prowadzą do specyficznego „rozpoznania cząsteczkowego”, a z drugiej odpowiedzialne są za pojawienie się aktywności proteolitycznej. Warto tu wspomnieć, iż również PAI-1 oprócz funkcji inhibitora enzymów proteolitycznych bezpośrednio może wpływać na adhezję komórek [10]. Krótka charakterystyka u-PAR oraz udział tego białka w progresji nowotworów przedstawiona została ostatnio w *Postęпах Biochemii* w artykule J. Błasiaka i wsp. (zeszyt 1, tom 45, 1999).

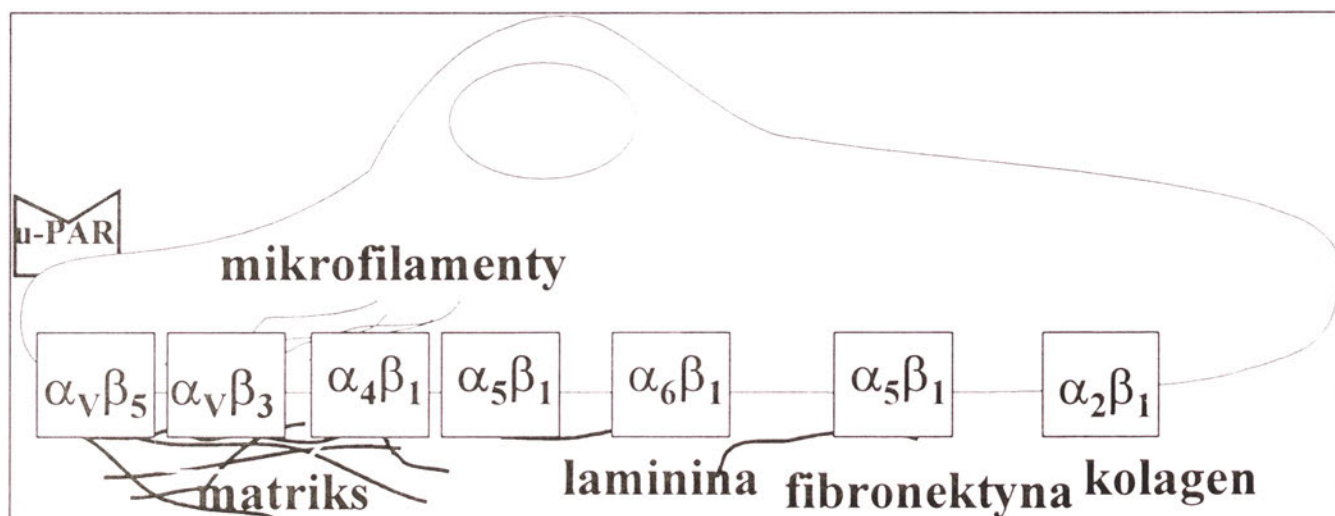
II. Oddziaływanie komórek z macierzą zewnątrzkomórkową podczas adhezji i migracji

W zależności od typu komórki i składu macierzy zewnątrzkomórkowej, adhezja komórek może zachodzić dzięki różnym zestawom receptorów adhezyjnych. Wśród nich, w końcowej fazie zaangażowane są zawsze receptory integrynowe. Budowa receptorów integrynowych, mechanizm ich działania i udział w sygnalizacji komórkowej, rozmieszczenie w komórkach i specyficzność tkankowa, ekspresja oraz ocena ich roli w adhezji komórkowej, rodzaj rozpoznawanych przez nie ligandów, a także znaczenie dla morfologii i ruchliwości komórek — były przedmiotem wielu prac przeglądowych [6, 11-14]. Receptory integrynowe tworzą dużą rodzinę białek odpowiedzialnych za rozpoznawanie i przyleganie komórek do elementów macierzy zewnątrzkomórkowej oraz oddziaływanie komórek między sobą. Charakterystyczną cechą tych receptorów jest to, że wymagają one aktywacji i w ten sposób odwracalnie zwiększają powinowactwo wiązania cząsteczek białek adhezyjnych, niezależnie od tego, czy są one unieruchomione w macierzy zewnątrzkomórkowej lub w błonie innych komórek, czy też są

rozpuszczone w płynach ustrojowych. Receptory integrynowe mają heterodimeryczną cząsteczkę zbudowaną z podjednostki α i β . Najczęściej reagują z fibronektyną ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$), witronektyną ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$), lamininą ($\alpha_6\beta_1$), a także kolagenem ($\alpha_2\beta_1$) (Ryc. 1).

Zestaw receptorów biorących udział w adhezji zależy również od rodzaju aktywatora komórkowego. Aktywacja receptorów często wiąże się ze zmianą konformacyjną cząsteczki receptora w części zewnątrzkomórkowej, zachodzącą pod wpływem sygnałów wysłanych z wnętrza komórki. Samo przyłączenie liganda białkowego do receptora również pobudza wysłanie serii sygnałów, tym razem w przeciwnym kierunku, tj. do wnętrza komórki.

Mechanizmy powodujące wyjście komórek z tego pozornie stabilnego stanu, w jakim znajdują się podczas adhezji, nie są jeszcze znane. Osłabienie przyczepności oraz ukierunkowana migracja komórek jest efektem harmonijnego współdziałania wielu białek komórkowych, w tym wielu odmiennych receptorów [13], które ze względu na budowę i mechanizm działania możemy ująć w pięć grup (Ryc. 2), tj. (a) zbudowane z siedmiu transbłonowych domen (tzw. receptory serpentynowe), sprzężone i współpracujące z heterotrimetrycznymi białkami G. Należą tu np. receptory trombiny, katepsyny G, adrenaliny, czynnika aktywującego płytki (PAF) i tromboxanu A_2 . (b) receptory zawierające domenę o aktywności kinazy tyrozynowej (receptory czynników wzrostu), (c) receptory cytokin powiązane z układem kinaz JAK i białek STAT (szlak JAK-STAT) oraz ze szlakiem sfingolipidowym, (d) receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu oraz (e) receptory pozbawione aktywności kinazowej, ale mogące po związaniu liganda tworzyć kompleksy z rozpuszczalnymi wewnątrzkomórkowymi kinazami tyrozynowymi, jak np. receptory integrynowe. Przyłączenie aktywującej cząsteczki do receptora z pierwszych czterech grup przekształca ten, przeważnie uśpiony, receptor w stan aktywny. Wyzwala to ciąg bardzo szybkich reakcji, polegających na



Ryc. 1. Oddziaływanie komórek z macierzą zewnątrzkomórkową podczas procesu adhezji. Receptory integrynowe biorące udział w adhezji: $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ — receptory fibronektyny; $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ — receptory witronektyny; $\alpha_6\beta_1$ — receptor lamininy; $\alpha_2\beta_1$ — receptor kolagenu.

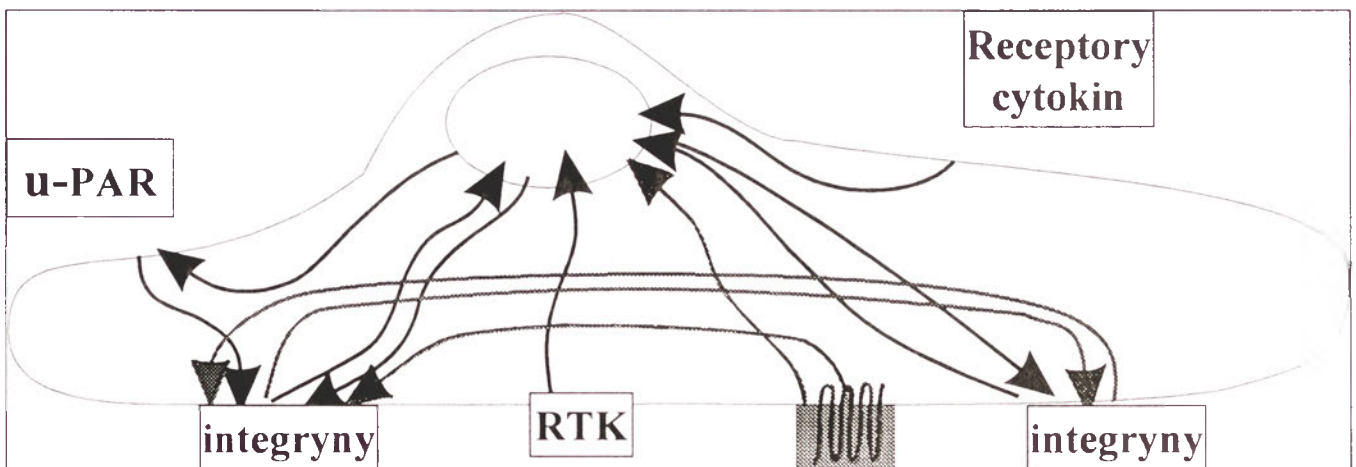
fosforylacji i defosforylacji różnych białek, tworzeniu kompleksów dwu- i więcej cząsteczkowych oraz translokacji różnorodnych białek do odpowiednich, przeważnie okołobłonowych przestrzeni w komórce. Doprządza to do szeroko rozumianej reakcji na przesłane sygnały, odmiennej w poszczególnych komórkach. Zanim jednak nastąpią zmiany morfologiczne, uruchomione zostają ciągi reakcji biochemicznych przesyłające sygnał o aktywacji. Receptory białek adhezyjnych, w tym receptory integrynowe, nie mają własnej drogi transdukcji sygnałów, a korzystają w tym celu z białek zbierających sygnały z receptorów zawierających domenę kinazową. Są to receptory głównie czynników wzrostu, które mają również znaczny wpływ na poziom ekspresji integryn, zmieniając często ich skład i tym samym stan komórki. Np. komórki śródbłónka, w stanie normalnym mające wysoki poziom receptora witronektyny ($\alpha_v\beta_3$), tworzą monomolekularną warstwę wyścielającą ścianę naczyń krwionośnych. Pod wpływem czynnika wzrostu fibroblastów bFGF, receptor $\alpha_v\beta_3$ zamieniony zostaje przez $\alpha_v\beta_5$, a komórki śródbłónka nabierają zdolności do przemieszczania się, zapoczątkowując proces angiogenezy [15].

Sygnały przesyłane przez odpowiednie receptory błony komórkowej docierają do układu białek Ras i po przekazaniu do jądra, mogą wpłynąć na poziom ekspresji integryn, jak również i innych białek komórkowych. W niektórych przypadkach, sygnały zebrane z jednych receptorów integrynowych przez białka Ras, przekazywane są do innych integryn obecnych w błonie modyfikując ich aktywność ligandową [16]. Tak więc, ten pozornie stabilny proces adhezji komórkowej obejmuje niezwykle złożony układ sygnalizacyjny, w którym sygnały generowane przez różne receptory błonowe są przetwarzane przez białka regulujące. Więcej szczegółów na temat budowy i funkcji białek Ras w procesie adhezji można znaleźć w naszej ostatnio opublikowanej pracy [17].

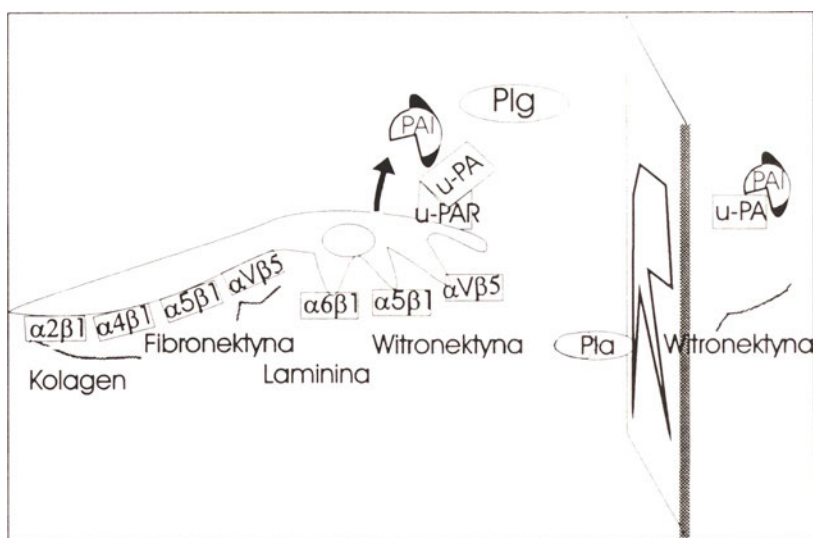
Tuż przed migracją, w komórkach, które odrywają się od macierzy zewnątrzkomórkowej obserwuje się wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca [18], fosforylację kilku białek [13], a także zmianę zestawu receptorów integrynowych i ich aktywności na powierzchni błony komórkowej [11], wzrost ekspresji u-PAR [1], indukcję genu PAI-1 [19, 20] i aktywatorów plazminogenu typu tkankowego lub urokinazowego [21], oraz wyłączenie genu kolagenu, indukcję genu kolagenaz i zmianę ekspresji genu inhibitorów metaloproteinaz [22]. Powyższe zmiany pojawiają się w komórkach normalnych, np. w fibroblastach podczas gojenia się ran, czy też w komórkach śródbłónka podczas angiogenezy, ale również w komórkach nowotworowych. Morfologicznie, komórki zmieniają swój wygląd, na biegunie przednim (w kierunku poruszania się) pojawiają się lamellopodia (Ryc. 3), a na ich powierzchni skupiają się receptory integrynowe oraz u-PAR [23]. Uwolnione z komórki aktywatory i inhibitory aktywatorów plazminogenu wiążą się z różnymi receptorami, ograniczając w ten sposób do bezpośredniego sąsiedztwa tych receptorów strefę, w której pojawia się aktywność proteolityczna.

III. Aktywacja plazminogenu na powierzchni komórek

Szczególną rolę w regulacji generacji plazminy na powierzchni komórek mają tzw. (a) receptory aktywujące czyli te, które przyczyniają się do lokalnego zagęszczenia aktywatorów i inhibitorów aktywatorów plazminogenu na błonie komórkowej oraz (b) receptory umożliwiające „clearance” tych białek [24]. Wykazano obecność receptorów komórkowych plazminogenu w płytkach krwi, monocytach, granulocytach, limfocytach, komórkach śródbłónka, itp. Wśród tych receptorów należy wymienić α -enolazę, białko spokrewnione z receptorem LDL, amphoterynę, białko o masie 45 kDa, a także aneksynę II, która funkcjonuje



Ryc. 2. Szlaki przesyłania sygnałów. Receptory z aktywnością kinazy tyrozynowej (RTK), receptory aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (u-PAR), receptory serpentynowe zbudowane z siedmiu transbłonowych domen. Przyłączenie aktywującej cząsteczki do receptora (oprócz receptora integrynowego) przekształca go w stan aktywny, co wywołuje ciąg bardzo szybkich reakcji, wzajemnie ze sobą powiązanych i samoczynnie regulujących się za pomocą wielu pętli ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego, przesyłających sygnał o aktywacji.



Ryc. 3. Migracja komórek. Zmianie przyczepności komórek do matryksu towarzyszy pojawienie się na biegunie przednim (w kierunku poruszania się) lamellopodium, a na ich powierzchni skupiają się receptory integrynowe oraz u-PAR. Uwolnione z komórki aktywatory i inhibitory aktywatorów plazminogenu wiążą się z różnymi receptorami, ograniczając w ten sposób do bezpośredniego sąsiedztwa tych receptorów strefę, w której pojawia się aktywność proteolityczna.

również jako receptor t-PA. Poszczególne rodzaje komórek charakteryzują się odmiennym zestawem receptorów plazminogenu i tym można wytłumaczyć różne powinowactwo, z jakim plazminogen się do nich wiąże. Stosunkowo wysokie powinowactwo jest wówczas, gdy wiązanie odbywa się poprzez struktury *kringle* (głównie trzy pierwsze) z resztami Lys, najczęściej znajdującymi się na C-końcu łańcucha białka błonowego. Aktywatory i inhibitory aktywatorów plazminogenu usuwane są z krążenia w znacznym stopniu za pomocą białka o budowie podobnej do receptora LDL. Receptor ten początkowo opisany był jako białko umożliwiające endocytozę β -VLDL i α_2 -makroglobuliny, a ostatnio wykazano również, że usuwa kompleksy t-PA-PAI-1.

III-1. Receptor u-PA

Szczególne znaczenie fizjologiczne ma receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu (u-PAR) [25-27]. Jest to pojedynczy łańcuch peptydowy o masie 55 kDa. Aż 40% masy u-PAR stanowią reszty cukrowe. Receptor u-PA nie posiada domeny transbłonowej i związany jest z błoną komórkową poprzez glikozylofosfoinytyl. Powinowactwo wiązania u-PAR z urokinazowym aktywatorem plazminogenu opisane jest stałą dysocjacji równą 5×10^{-10} M. Ekspresja receptora u-PA wzrasta w komórce pod wpływem różnych czynników, w tym bFGF, EGF, TGF β oraz estrów forbolu i osiąga wysoki poziom w komórkach migrujących, tak normalnych jak i nowotworowych [28]. Ze wzrostem liczby cząsteczek receptora u-PA na powierzchni komórek obserwuje się zwiększenie ich niejednorodności oraz spadek ich powinowactwa wiązania urokinazowego aktywatora plazminogenu. Obserwowana niejednorodność u-PAR w takich warunkach wynika z różnego stopnia glikozylacji cząsteczek receptora [28]. W osoczu krwi spotyka się również rozpuszczalną formę u-PAR.

Doświadczenia, w których zastosowano różne przeciwciała do immunoprecypitacji białek błonowych

wykazały, że u-PAR występuje w kompleksie z integrzynami β_1 , β_2 lub β_3 , a także innymi białkami, np. kaweoliną [15, 29-31]. Tworzenie odwracalnych kompleksów z określonymi białkami błony jest warunkiem właściwego funkcjonowania receptora u-PA. Dowodzą tego ostatnie obserwacje, które również dokumentują znaczną rolę u-PAR w procesie adhezji i migracji komórki polegającą na: (a) bezpośrednim udziale w generowaniu aktywności proteolitycznej na powierzchni komórki, (b) wiązaniu niektórych składników macierzy lub błony innych komórek, a także (c) regulacji przyczepności komórek przez przesyłanie sygnałów, które mogą modulować ekspresję receptorów integrzynowych.

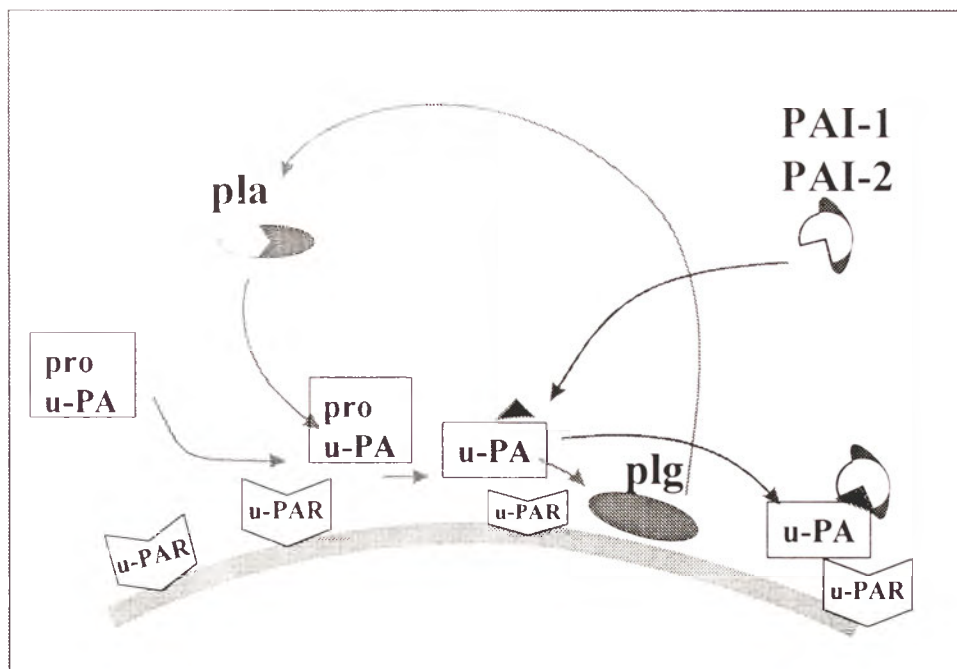
III-1.1. Rola u-PAR w wytwarzaniu plazminy na powierzchni komórkowej

Proenzym (pro-u-PA) oraz forma czynna u-PA wiąże się z receptorem przez N-końcową domenę cząsteczki o budowie podobnej do struktury EGF [32, 33]. Występowanie u-PA i pro-u-PA, a także śladowych ilości plazminy powiązanej z błoną komórkową, umożliwia bardzo szybką kinetykę aktywacji plazminogenu (Ryc. 4).

Łańcuch reakcji aktywujących rozpoczyna plazmina, która przekształca pro-u-PA, po hydrolizie pojedynczego wiązania peptydowego, w czynny u-PA, a ten z kolei aktywuje związany z błoną plazminogen. Rola receptora u-PA w tym procesie polega na swoistym „zageszczaniu” na powierzchni komórki, substratów i enzymów biorących udział w generowaniu aktywności proteolitycznej [34]. Plazmina powstała w ten sposób nie ulega inaktywacji przez α_2 -antypłazminę, natomiast u-PA nawet wówczas, gdy jest związany z receptorem, może być hamowany przez PAI-1 i PAI-2 [35-37]. Powstałe kompleksy u-PA/u-PAR są usuwane na drodze internalizacji bądź degradacji [38], przy udziale receptora α_2 -makroglobuliny [39].

Receptor u-PA w kompleksie z urokinazowym aktywatorem plazminogenu najczęściej znajduje się

Ryc. 4. Aktywacja plazminogenu na powierzchni komórek. Występowanie zarówno u-PA jak i pro-u-PA na powierzchni komórki umożliwia bardzo szybką kinetykę aktywacji plazminogenu. Śladowe ilości plazminy powiązanej z błoną komórkową mogą aktywować pro-u-PA, po hydrolizie pojedynczego wiązania peptydowego, do u-PA, który z kolei aktywuje związany z błoną plazminogen. W tym mechanizmie aktywacji plazminogenu, receptor u-PA służy jako „matryca”, która umożliwia zbliżenie u-PA i pro-u-PA do ich substratu — plazminogenu, na powierzchni błony komórkowej. Działanie u-PA po jego związaniu z receptorem może być hamowane przez inhibitory PAI-1 i PAI-2.



w miejscach kontaktu komórek z macierzą zewnątrzkomórkową [40]. Ulega on przemieszczeniu w komórkach migrujących do prowadzącej krawędzi lamellopodiów (*the leading edge*). Taka lokalizacja receptora u-PA wraz z ligandem w migrujących komórkach normalnych i nowotworowych, a także wzrost ekspresji u-PAR w takich komórkach pozwala przypuszczać, że może on być bezpośrednio odpowiedzialny za inwazyjność komórek nowotworowych [23]. Potwierdziły to doświadczenia z liniami komórek nowotworowych, w których zablokowanie powierzchniowej aktywności enzymatycznej u-PA za pomocą swoich przeciwciał, w znacznym stopniu hamowało zdolność komórek do infiltracji różnych błon biologicznych [41].

Ze względu na swoją rolę w generacji aktywności proteolitycznej na powierzchni komórek, receptor u-PAR pośrednio uczestniczy w aktywacji różnych cytokin i w ten sposób wpływa na przebieg proliferacji i różnicowania się komórek (Tab. 1). u-PA, a zwłaszcza plazmina przekształca nieaktywne formy cytokin, które po uwolnieniu z komórek można znaleźć na powierzchni komórek. Wiadomo, że plazmina i u-PA przekształcają nieaktywne cząsteczki prekursorowe odpowiednio IL-1 i TGF β oraz HGF/SF do aktywnych biologicznie cytokin, a te z kolei bezpośrednio indukują, podobnie jak inne cytokiny, ekspresję genu u-PAR, u-PA i PAI-1 w różnych komórkach [9]. Co więcej, powstałe cytokiny zmieniają również ekspresję odpowiednich podjednostek receptorów integrzynowych, przyczyniając się do zmiany „garnituru” integrzyn eksponowanych na powierzchni komórek. Powstaje w ten sposób wiele pętli sprzężenia zwrotnego dodatniego, które potęgują działanie czynników systemu fibrynolitycznego.

Tak więc, aktywność proteolityczna pojawiająca się w pobliżu komórki pochodzi zarówno od plazminy,

Tabela 1.

Wpływ cytokin na ekspresję białek układu fibrynolizy oraz podjednostek integrzyn	
u-PAR	TGF β , IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, bFGF, GM-CSF, M-CSF
u-PA	TGF β , IFN γ , IL-1, IL-2, IL-3, GM-CSF, M-CSF
PAI-1	TGF β , TNF α , IL-1,
PAI-2	TNF α , IL-1, IL-2
	<ul style="list-style-type: none"> • α_1 — TGFβ, TNFα, IFNγ, IL-1β, NGF • α_2 — TGFβ, bFGF, EGF, PDGF, IL-1β • α_5 — TGFβ, bFGF, IL-1β, IL-6, M-CSF • α_4 — TGFβ, IL-4 • β_1 — TGFβ, PDGF, IL-6 • β_3 — TNFα, bFGF, GM-CSF, IFNγ (obniża)

u-PA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego; u-PAR — receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego; PAI-1 — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1; PAI-2 — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 2; TGF — transformujący czynnik wzrostu; IL — interleukina; bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; GM-CSF — czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe; M-CSF — czynnik stymulujący kolonie makrofagowe; IFN — interferon; TNF — czynnik martwicy nowotworów; NGF — czynnik wzrostu nerwu; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostu.

jak i u-PA. Plazmina, ze względu na szersze spektrum działania, jest w stanie hydrolizować nie tylko fibrynogen i włóknik, ale i większość składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto, gra bardzo ważną rolę w uaktywnianiu cząsteczek prekursorowych cytokin, a także podczas aktywacji proenzymu u-PA. Z kolei u-PA, poza aktywacją plazminogenu, może częściowo hydrolizować witronektynę. W ten sposób odsłania prawdopodobnie nowe epitopy tego białka i umożliwia jego oddziaływanie z innymi cząsteczkami białkowymi. Posiada również ograniczony wpływ na aktywację niektórych cytokin.

Receptor u-PA prawdopodobnie bierze udział także w chemotaksji neutrofilii, a mechanizm tego działania

nie zależy od aktywności proteolitycznej [42]. Również w neutrofilach, u-PAR lokalizuje się na wiodącej krawędzi wędrujących komórek w gradiencie czynnika chemotaktycznego. Preinkubacja monocytów z przeciwciałem blokującym u-PAR oraz antysensowymi oligonukleotydami dla mRNA u-PAR znosi reakcję komórek na formyloMet-Leu-Phe i chemotaktyczny peptyd 1 [43]. Chemotaksja neutrofilii nie zmienia się jednak pod wpływem przeciwciał neutralizujących aktywność u-PA.

III-1.2. Bezpośrednie oddziaływanie u-PAR ze składnikami macierzy

Inhibitory enzymów proteolitycznych, w tym PAI-1 i PAI-2, a także przeciwciała dla u-PA, które neutralizują aktywność tego enzymu, tylko częściowo hamują migrację komórek. Oznacza to, że oprócz aktywności proteolitycznej generowanej na powierzchni migrujących komórek, migrację regulują jeszcze inne procesy zachodzące na błonie komórkowej. Wiadomo, że u-PAR stanowi główne miejsce przyłączenia rozpuszczalnej witronektyny do komórek śródbłonna, a oddziaływanie to zachodzi przez inny region receptora niż ten, z którym wiąże się u-PA. Co więcej, powinowactwo wiązania witronektyny wzrasta o rząd wielkości wówczas, gdy receptor ten przyłączy najpierw cząsteczkę u-PA [44, 45]. Receptor u-PA może więc bezpośrednio oddziaływać z macierzą zewnątrzkomórkową i w ten sposób brać udział w adhezji komórek. Co więcej, dzięki utworzeniu kompleksu z odpowiednimi integrzynami, u-PAR może zmieniać nie tylko ich powinowactwo wiązania, ale również specyficzność wiązania w stosunku do różnych składników macierzy. Wskazują na to doświadczenia, w których transfekowano komórki embrionalne nerki plazmidem zawierającym cDNA dla u-PAR i w ten sposób podwyższano poziom ekspresji u-PAR w badanych komórkach. Tak zmienione komórki traciły zdolność adhezji do fibronektyny, a w zamian za to przylegały do witronektyny. Wykazano też, że w takich komórkach, u-PAR tworzył kompleks z integrzynami β_1 i powstanie takiego kompleksu było warunkiem pojawienia się zdolności komórek do reagowania z witronektyną. Dowodzi tego fakt, iż swoiste rozdysocjowanie kompleksu u-PAR z integrzynami przywracało wyjściową zdolność komórek do reakcji z fibronektyną. Oddziaływanie u-PAR z integrzyną β_1 zachodziło znacznie łatwiej wtedy, kiedy receptor integrzynowy był w formie aktywnej, np. wówczas, gdy przejście w stan aktywny receptora wymuszano za pomocą przeciwciał aktywujących (anty LIBS). Procesy prowadzące do takiego fenotypu były odwracalne i można je było zahamować przeciwciałami blokującymi u-PAR, a także inhibitorami peptydowymi, które uniemożliwiały tworzenie kompleksu u-PAR z receptorem integrzynowym, a nie miały wpływu na wiązanie witronektyny i u-PA do u-PAR.

Bezpośrednie oddziaływanie u-PAR z receptorem integrzynowym, tym razem $\alpha_M\beta_2$, wykazano także w monocytach. W komórkach tych, po aktywacji estrami forbolu, pojawiają się na powierzchni aktywne cząsteczki $\alpha_M\beta_2$ oraz receptory integrzynowe należące do grupy β_1 (30). Te pierwsze wiążą wiele różnorodnych ligandów, w tym fibrynogen. Te drugie natomiast umożliwiają adhezję monocytów do fibronektyny. Przeciwciała dla u-PAR wybiórczo hamują wiązanie fibrynogenu do stymulowanych estrami forbolu monocytów, a nie mają wpływu na ich adhezję do fibronektyny [30]. Również obniżenie ekspresji u-PAR za pomocą antysensowych oligonukleotydów wywoływało ten sam efekt, który można było odwrócić dodaniem rozpuszczalnej formy receptora u-PAR. Tak więc zablokowanie syntezy u-PAR i obniżenie stężenia receptora na powierzchni komórek wywołało wzmocnioną adhezję komórek do fibrynogenu, czyli wspomagało funkcję $\alpha_M\beta_2$, tj. adhezję komórek do fibrynogenu.

TGF α oraz PMA podwyższają ekspresję u-PAR i u-PA w komórkach nowotworowych linii FG i równocześnie pobudzają ich migrację na powierzchniach opłaszczonych witronektyną [46]. Migracja tych komórek hamowana jest przez (a) przeciwciała swoiste dla receptora witronektyny $\alpha_V\beta_5$, (b) przeciwciała dla u-PAR, które blokują wiązanie u-PA do u-PAR, (c) inhibitory proteolityczne, w tym PAI-1, a także (d) rozpuszczalną formę u-PAR. PAI-1 wiąże się z witronektyną poprzez miejsce, które w cząsteczce witronektyny znajduje się w pobliżu sekwencji RGD, tj. motywu rozpoznawanego przez receptory integrzynowe [47]. W pobliżu tego miejsca znajduje się również region, poprzez który witronektyna oddziałuje z u-PAR [48]. Dzięki temu, prawdopodobnie przez zawadę przestrzenną, PAI-1 może hamować nie tylko wiązanie witronektyny z u-PAR, ale także adhezję komórek do witronektyny. Warto wspomnieć, że komórki mogą również przylegać do PAI-1. Oznacza to więc, że PAI-1 wpływa na przebieg adhezji i migracji komórek bezpośrednio, dostarczając miejsc wiążących dla komórek oraz pośrednio — hamując generację plazminy na powierzchni błony komórkowej.

III-1.3. u-PAR i transdukcja sygnału

Liczne obserwacje wskazują na to, że przyłączenie u-PA do u-PAR wiąże się z przekazaniem różnorodnych sygnałów do wnętrza komórki. Wykazano bowiem, że u-PAR — (a) współizoluje się z niektórymi kinazami z rodziny src (p60^{lyn}, p53/p56^{lyn}, p56/p59^{hck}, p59^{lck}) co wskazuje na to, że białka te mogą występować w kompleksie z receptorem urokinazy [49]. — (b) w niektórych komórkach u-PAR powoduje aktywację szlaku JAK 1/STAT 1 [31], — (c) indukuje fosforylację tyrozyny białka p38 [50], — (d) wzmaga syntezę cAMP [51] oraz — (e) syntezę *de novo* diacyloglicerolu [52], — (f) przyczynia się do wzrostu

wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca [53]. — (g) podwyższa ekspresję genu c-fos [50]. — (h) jest powiązany z cytoszkieletem [54].

Receptor u-PA, jako białko nie posiadające domeny cytoplazmatycznej, w celu przesłania sygnału do wnętrza komórki musi tworzyć kompleks z białkami integralnymi błony, prawdopodobnie z integrzynami typu β_1 , β_2 i β_3 oraz kaweoliną, aby w ten sposób połączyć się z różnymi wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnalizacyjnymi. Przypuszcza się, że w zależności od typu komórki, u-PAR może również w tym celu wykorzystywać komórkowo-specyficzne białka, tak jak np. w komórkach nabłonka nerki w tym celu prawdopodobnie służy gp130 [31].

IV. Uwagi końcowe

Przedstawione obserwacje jednoznacznie wskazują na to, że u-PAR jest białkiem wielofunkcyjnym, które odgrywa nie tylko podstawową rolę podczas komórkowej aktywacji procesu fibrylizacji, ale także bierze udział w adhezji i migracji komórek, bezpośrednio wiążąc witronektynę oraz pośrednio, przez modyfikowanie funkcji receptorów integrzynowych. Migracja komórek jest więc efektem współdziałania wielu różnorodnych białek, a u-PAR umożliwia aktywację plazminogenu na powierzchni komórek i zmienia preferencje receptorów integrzynowych w stosunku do białek adhezyjnych. Generowana w pobliżu u-PAR aktywność proteolityczna może być wykorzystana do usuwania barier biologicznych, na które napotyka komórka, a także prowadzi do aktywacji wielu cytokin. W ten sposób układ u-PAR/u-PA pośrednio wpływa na wiele funkcji komórkowych, w tym proliferację i różnicowanie się komórek. u-PAR przekazuje sygnały do wnętrza komórki za pomocą transbłonowego białka adaptorowego, którym w zależności od typu komórki mogą być integryny jak i inne białka. u-PAR bezpośrednio wpływa na ruchliwość komórek dzięki oddziaływaniu z witronektyną. Przypuszcza się, że zmiany w ekspresji elementów tego układu mogą leżeć u podstaw mobilności komórek, a w przypadku komórek nowotworowych — ich inwazyjności.

Artykuł otrzymano 2 listopada 1998 r.

Zaakceptowano do druku 14 stycznia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Pepper MS, Sappino AP, Stocklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1993) *J Cell Biol* **122**: 673-684
2. Jensen PJ, Rodeck U (1993) *J Cell Physiol* **155**: 333-339
3. Dent MA, Sumi Y, Morris RJ, Seeley PJ (1993) *Eur J Neurosci* **5**: 633-647
4. Schmitt M, Janicke F, Graeff H (1992) *Fibrinolysis* **6** (Suppl 4): 3-26
5. Edelman GM, Crossin K L (1991) *Ann Rev Biochem* **60**: 155-190
6. Shatili SJ (1995) *Thromb Haemost* **74**: 149-155
7. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM (1992) *Immunol Today* **13**: 93-100
8. Zetter BR (1993) *Semin Cancer Biol* **4**: 219-229
9. Plesner T, Behrendt N, Ploug M (1997) *Stem Cells* **15**: 398-408
10. Kost C, Stuber W, Ehrlich HJ, Pannekoek H, Preissner KT (1992) *J Biol Chem* **267**: 12098-12105
11. Hynes RO (1987) *Cell* **48**: 549-554
12. Haas TA, Plow EF (1994) *Current Opinion in Cell Biology* **6**: 656-662
13. Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R (1995) *Biochim Biophys Acta* **1242**: 77-98
14. Cierniewski CS (1994) *Post Biochem* **40**: 45-54
15. Klemke LR, Yebra M, Bayna EM, Cheresch DA (1994) *J Biol Chem* **269**: 859-866
16. Fox JEB (1996) *Haemostasis* **26** (Suppl 4): 102-131
17. Janiak A, Cierniewski CS (1997) *Acta Haematologica Polonica* **28**: 15-29
18. Sikorski J, Andersson R, Patarroyo M, Andersson T (1991) *Exp Cell Res* **195**: 504-508
19. Tietze L, Elbrecht A, Schauerte C, Klosterhalfen B, Amo-Takvi B, Gehlen J, Winkeltau G, Mittermayer C, Handt S (1998) *Thromb Haemost* **79**: 362-370
20. Loskutoff DJ, Sawdey M, Keeton M, Schneiderman J (1993) *Thromb Haemost* **70**: 135-137
21. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD (1996) *Enzyme Protein* **49**: 138-162
22. DeBart AC, Quax PH, Lowik CW, Verheijen JH (1995) *J Bone Miner Res* **10**: 1374-1384
23. Estreicher A, Muhihauser J, Carpentier IL, Orci L, Vassalli JD (1990) *J Cell Biol* **111**: 783-792
24. Hajjar KA (1995) *Thromb Haemost* **74**: 294-301
25. Vassalli JD, Baccino D, Bellin D (1985) *J Cell Biol* **100**: 86-92
26. Cubellis MV, Nolli ML, Cassani G, Blasi F (1986) *J Biol Chem* **261**: 15819-15822
27. Nielsen LS, Kallerman GM, Behrendt N, Picone R, Dano K, Blasi F (1988) *J Biol Chem* **263**: 2358-2363
28. Lund LR, Ronne E, Roldan AL, Behrendt N, Romer J, Blasi F, Dano K (1991) *J Biol Chem* **266**: 5177-5181
29. Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Champan HA (1996) *Science* **273**: 1551-1555
30. Sitrin RG, Todd RF 3rd, Albrecht E, Gyetko MR (1996) *J Clin Invest* **97**: 1942-1951
31. Koshelnick Y, Ehart M, Hufnagi P, Heinrich PC, Binder ER (1997) *J Biol Chem* **272**: 28563-28567
32. Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ, Stoppelli MP, Corti A, Cassani G, Blasi F (1987) *J Biol Chem* **262**: 4437-4440
33. Stoppelli MP, Corti A, Soffientini A, Cassani G, Blasi F, Assoian RK (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4939-4943
34. Ellis V, Dano K (1993) *J Biol Chem* **268**: 4806-4813
35. Cubellis MV, Andreasen P, Ragno P, Mayer M, Dano K, Blasi F (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4828-4832
36. Ellis V, Wun TC, Behrendt N, Ronne E, Dano K (1990) *J Biol Chem* **265**: 9904-9908
37. Baker MS, Bleakley P, Woodrow GC, Doe WF (1990) *Cancer Res* **50**: 4676-4684
38. Olson D, Pollanen J, Hoyer-Hansen G, Ronne F, Sakaquchi K, Wun TC, Appella E, Dano K, Blasi F (1992) *J Biol Chem* **267**: 9129-9133
39. Nykjaer A, Petersen CM, Moller B, Jensen PH, Moestrup SK, Holtet TL, Etzerodt M, Thøgersen HC, Munch M, Andreasen PA (1992) *J Biol Chem* **267**: 14543-14546
40. Pollanen J, Hedman K, Nielsen LS, Dano K, Vaheri A (1988) *J Cell Biol* **106**: 87-95
41. Ossowski L (1988) *Cell* **52**: 321-328
42. Odekon I E, Gilboa N, Del Vecchio P, Gudewicz P W (1992) *Circ Shock* **37**: 169-175
43. Gyetko MR, Todd RF, Wilkinson CC, Sitrin RG (1994) *J Clin Invest* **93**: 1380-1387
44. Waltz DA, Chapman HA (1994) *J Biol Chem* **269**: 14746-14750

45. Kanse SM, Kost C, Wilhelm OG, Andreasen PA, Preissner KT (1996) *Exp Cell Res* **224**: 344-353
46. Yebra M, Parry GCN, Stromblad S, Mackman N, Rosenberg S, Mueller BM, Cheresh DA (1996) *J Biol Chem* **271**: 29393-29399
47. Suzuki S, Pierschbacher MD, Hayman EG, Nguyen K, Ohgren K, Ruoslahti F (1984) *J Biol Chem* **259**: 15307-15314
48. Moser TL, Enghild JJ, Pizzo SV, Stack S (1995) *Biochem J* **307**: 867-873
49. Resnati M, Guttering M, Valcamonica S, Sidenius N, Blasi F, Fazioli F (1996) *EMBO J* **15**: 1572-1582
50. Dumler L, Petri T, Schleuning WD (1993) *FEBS Lett* **322**: 37-40
51. Li C, Liu JN, Gurevich (1995) *J Biol Chem* **270**: 30282-30285
52. Anichini J, Fibbi G, Pucci M, Caldini R, Chevanne M, Del Rosso M (1994) *Exp Cell Res* **213**: 438-448
53. Van den Berg CW, Cinek T, Hallett MB, Horejsi V, Morgan BP (1995) *J Cell Biol* **131**: 669-677
54. Wang N, Planus E, Pouchelet M, Fredberg JJ, Barlovatz Meimon G (1995) *Am J Physiol* **268**: C1062-C1066

Białka choroby Alzheimera

Proteins of Alzheimer's disease

AGNIESZKA PIEKIELKO*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. β APP i β -amyloid
- III. Preseniliny
- IV. Apolipoproteina E
- V. Przebieg choroby na poziomie molekularnym
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AA—aminokwasy; AD—choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer's disease*); A β — β -amyloid; β APP—białko prekursorowe β -amyloidu (ang. *amyloid precursor protein*); ApoE—apolipoproteina E; kDa—tys. daltonów; koniec C—koniec karboksylowy białka; koniec N—koniec aminowy białka; PS—presenilina.

I. Wstęp

Choroba Alzheimera (AD) jest najczęstszą formą postępującego zespołu otępiennego, powodującego stopniową utratę pamięci, zdolności myślenia i orientacji. Chorobie towarzyszą zmiany patologiczne w mózgu, prowadzące do neurodegeneracji i powstawania tzw. splotów neurofibrylarnych oraz płytek amyloidowych [1-4]. AD najczęściej występuje w formie sporadycznej [2], znane są również formy dziedziczne: wczesna (zachorowania przed 60 rokiem życia) i późna (zachorowania po 60 roku życia) [1,3].

Wydaje się, że molekularnym podłożem AD jest wadliwe funkcjonowanie w układzie nerwowym kilku białek. Obecne badania koncentrują się na następujących białkach: β APP (ang. *amyloid precursor protein*),

Contents:

- I. Introduction
- II. β APP and β -amyloid
- III. Presenilins
- IV. Apolipoprotein E
- V. Molecular model of Alzheimer's disease
- VI. Summary

presenilinie 1 (PS1), presenilinie 2 (PS2), oraz apolipoproteinie E (ApoE). Powodem szczególnego zainteresowania β APP jest fakt, że powstający z niego β -amyloid jest głównym składnikiem płytek amyloidowych, podstawowej zmiany patologicznej w chorobie Alzheimera [2, 5]. Jak stwierdzono, mutacje w genach presenilin odpowiadają za większość przypadków wczesnej formy AD [6, 7]. Natomiast apolipoproteina E, a zwłaszcza jej forma alleliczna ϵ 4, została uznana za „czynnik ryzyka”: homozygotyczność pod względem allelu ϵ 4 predestynuje do zachorowania na AD [1, 3, 8, 9]. Dotyczy to zarówno form dziedzicznych choroby, jak i formy sporadycznej.

Dotychczasowe dane pozwoliły na skonstruowanie modelu rozwoju AD. Model ten przypomina mechanizm chorób wywołanych przez priony, zaproponowany przez S. Prusiner'a (Nobel w 1997 r.): normalnie występujące w organizmie białko (w przypadku AD: β APP) przyjmuje konformację β -kartki, co z kolei prowadzi do powstawania nierozpuszczalnych agregatów białkowych, indukujących szereg zmian, kończących się śmiercią komórki [10]. Możliwe, że mechanizm ten nie jest czymś wyjątkowym lecz dotyczy wielu chorób neurodegeneracyjnych (np. choroby Huntingtona, Parkinsona).

Niniejsza praca jest próbą zwięzłego podsumowania

* Studentka V roku Wydziału Biologii UW, Instytut Biochemii Zakład Biologii Molekularnej, ul. Żwirki i Wigury 93 02-089 Warszawa

Tabela 1.

Udział białek w różnych formach choroby Alzheimera. β APP: białko prekursorowe β -amyloidu; ApoE: apolipoproteina E [wg 2, 3, 7, 44].

Forma choroby	Charakterystyka	Wzór dziedziczenia	Gen	Produkt
1. dziedziczna 1.1. wczesna (ang. <i>early onset</i>) 1.2. późna (ang. <i>late onset</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ● zachorowania przed 60. rokiem życia; ● zachorowania po 60. roku życia; 	<ul style="list-style-type: none"> ● autosomalne, dominujące; ● autosomalne, dominujące, wpływ wielu dodatkowych czynników; 	<ul style="list-style-type: none"> ● 21q21.2 ● 14q24.3 ● 1q31-42 ● 19q13.2 ● 19q13.2 	<ul style="list-style-type: none"> ● βAPP ● presenilina-1 ● presenilina-2 ● ApoE ● ApoE
2. sporadyczna	<ul style="list-style-type: none"> ● większość przypadków; najczęściej związana z uszkodzeniami głowy 		<ul style="list-style-type: none"> ● 19q13.2 	<ul style="list-style-type: none"> ● ApoE

obecnej wiedzy na temat udziału białek w patologii AD. Krótko charakteryzuje poszczególne białka i przedstawia molekularny model choroby.

II. β APP i β -amyloid

β APP jest prekursorem β -amyloidu — głównego składnika płytek amyloidowych [2, 5]. Gen β -APP, znajdujący się na chromosomie 21 zawiera co najmniej 19 eksonów [11-14]. Fragmenty eksonów 16 i 17 kodują sekwencje β -amyloidu. [11, 15]. Dzięki kilku drogom składania pierwotnego transkrypty powstaje więcej niż 10 form β APP. Głównymi produktami, zawierającymi sekwencję β -amyloidu są formy: 695, 714, 751 i 770 — aminokwasowa [1, 2, 12, 13, 16]. Gen β APP ulega ekspresji we wszystkich typach tkanek [11, 17], jednak forma 695-aminokwasowa syntetyzowana jest niemal wyłącznie w neuronach [17, 18].

β APP jest transbłonową glikoproteiną [2, 14, 19] o masie ~90-130 kDa [1, 18, 20]. Zaczynając od N-końca polipeptydu można wyróżnić w β APP następujące rejony: 1. sekwencja sygnałowa, kierująca syntetyzowany peptyd do retikulum endoplazmatycznego, 2. rejon bogaty w reszty cysteiny, 3. domena o wysokiej zawartości aminokwasów o ładunku ujemnym, 4. domena transbłonowa, zawierająca sekwencję β -amyloidu. 5. domena cytoplazmatyczna (dane dla formy 695-aminokwasowej) [12, 14].

β APP jest kontranslacyjnie transportowany do retikulum endoplazmatycznego, a następnie do aparatu Golgiego. W trakcie tej podróży białko podlega: fosforylacji, N- i O-glikozylacji oraz przyłączaniu grup siarczanowych [5, 18, 21-23]. Po dotarciu do błony komórkowej β APP poddawany jest dalszej obróbce na jednej z dwóch możliwych dróg.

W pierwszej z tych dróg, tzw. nieamyloidogennej, sekretaza α rozcina łańcuch polipeptydowy β APP między między Lys687 a Leu688, co odpowiada pozycjom 16 i 17 w sekwencji β -amyloidu (numeracja formy 770 aminokwasowej). W wyniku tego powstaje tzw. rozpuszczalny APP ($sAPP\alpha$), oraz związany z błoną fragment o masie 9-10-kDa, zawierający jedynie część sekwencji β -amyloidu [2, 5, 20, 24, 25]. Podczas drugiej

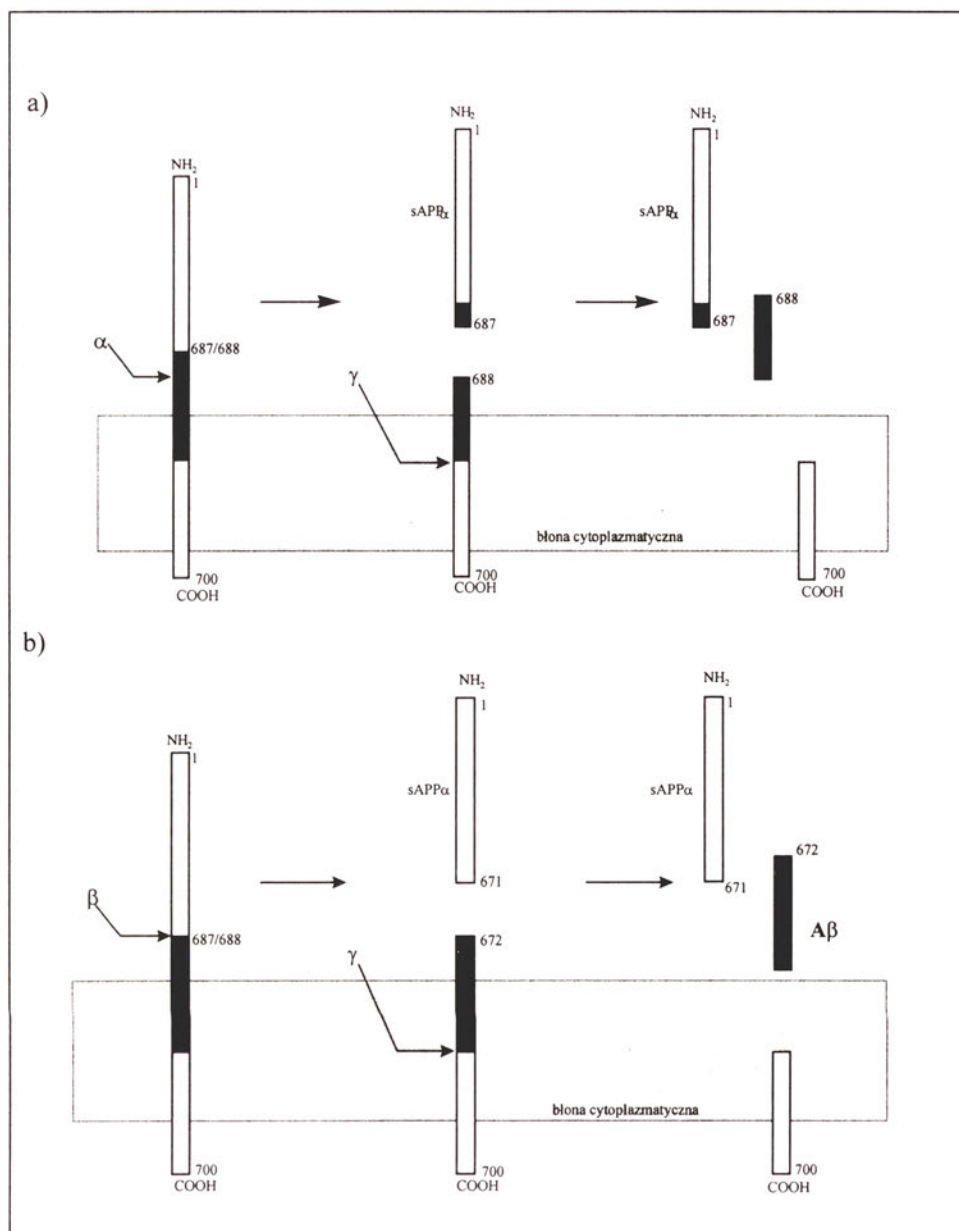
drogi obróbki, tzw. amyloidogennej, β APP ulega endocytozie dzięki sekwencji YENPTY [25]. Następnie sekretaza β tnie β APP między Met671 a Asp672, w wyniku czego powstaje rozpuszczalny $sAPP\beta$, oraz zakotwiczony w błonie fragment o masie 11-12-kDa. Ten ostatni jest dalej rozcinany przez sekretazę γ , co daje w efekcie fragment będący β -amyloidem [2, 5, 21, 23, 26-30].

Jak wynika z powyższego schematu, dwie drogi obróbki proteolitycznej β APP prowadzą do całkowicie różnych konsekwencji fizjologicznych. Efektem obróbki na drodze nieamyloidogennej (częstszej) jest cząstka $sAPP\alpha$, która łącząc się ze swoim receptorem w błonie komórkowej neuronów, chroni te ostatnie przed zwyrodnieniem [31]. Obróbka na drodze amyloidogennej prowadzi do powstania β -amyloidu, który następnie może agregować, indukując szereg zmian doprowadzających do śmierci komórek nerwowych (patrz rozdz. V).

Stosowany przy opisie przekształceń β APP termin „sekretazy” jest umowny, gdyż enzymy te nie zostały dotąd zidentyfikowane. Wydaje się, że cięcia przypisywane poszczególnym sekretazom są w istocie wynikiem działania kilku enzymów [25].

Funkcje β APP nie są znane. W większości form β APP stwierdzono w części N-końcowej sekwencję homologiczną z sekwencją inhibitora proteinaz serynowych z rodziny Kunitza [12, 13, 16, 17, 19, 32]. Stwierdzono także, że $sAPP\alpha$ ma aktywność czynnika wzrostu i wywiera pozytywny wpływ na wzrost neuronów w hodowlach komórkowych [33]. $sAPP\alpha$ stymuluje kaskadę sygnałową kinaz MAP w hodowlach komórkowych [34]. Wydaje się również, że $sAPP\alpha$ może być składnikiem substancji zewnątrzkomórkowej i pośredniczyć zarówno w interakcjach międzykomórkowych jak i kontaktach komórki z innymi czynnikami [33, 35].

Znanych jest szereg mutacji genu β APP. Mutacjom w pozycjach 670 671, 717 oraz 692 towarzyszy zwiększony poziom β -amyloidu oraz powstawanie długich, bardziej amyloidogennych form tego białka [2, 36]. Można przypuszczać, że opisywane mutacje mogą wpływać na obróbkę β APP. Przemawia za tym także



Ryc. 1. Schemat obróbki proteolitycznej β APP. a) droga niamyloidogenna, b) droga amyloidogenna; czarny prostokąt: sekwencja β -amyloidu; α , β , γ : sekretazy; liczby oznaczają pozycje w 770-aminokwasowym β APP. Szczegóły w tekście. [wg 2, 7, 16, zmodyfikowane].

to, że mutacje zlokalizowane są w pobliżu miejsc cięcia dla sekretaz [2].

β -amyloid ($A\beta$) jest peptydem o masie ~ 4 kDa [29, 37]. Składa się z 39-43 aminokwasów. Płytki amyloidowe są zbudowane głównie z formy 42/43-aminokwasowej [14, 38]. β -amyloid angiopatii amyloidowej ma w większości długość 39/40 AA [39], ale znaleziono także formy 42-aminokwasowe [40]. Obecność β -amyloidu (tzw. rozpuszczalnego β -amyloidu, sA β) stwierdzono również w płynach ustrojowych i mediach hodowli komórkowych [1, 37, 41, 42]. Pewne dane wskazują na to, że za agregację cząsteczek β -amyloidu może być odpowiedzialna dłuższa, 42/43-aminokwasowa forma $A\beta$ [43]. Ustalono, że β -amyloid indukuje apoptozę w hodowlach neuronów na drodze związanej z generowaniem wolnych rodników i napływem jonów Ca^{2+} do cytoplazmy [44-46].

III. Preseniliny

Większość przypadków wczesnej formy AD wiąże

się z mutacjami w genach presenilin: pierwszej (PS1) — na chromosomie 14 i drugiej (PS2) — na chromosomie 1 [6, 7, 47]. Kodują one, odpowiednio, 467-aminokwasowe białko PS1 o masie 43-50 kDa [47-52] i białko PS2, zbudowane z 448 aminokwasów, o masie 53-55 kDa [7, 48]. Oba białka wykazują wysoki stopień homologii (63%), najwyższy w obrębie domen transbłonowych (61-95%) [7].

Obecnie znanych jest 45 mutacji w genie PS1 i 3 w genie PS2 [48, 53, 54]. Ekspresja presenilin zachodzi w neuronach mózgu i wielu innych tkankach [3, 7 54].

Miejscem lokalizacji komórkowej presenilin jest błona retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego [49, 54, 53]. Białka prawdopodobnie posiadają 6 do 8 domen transbłonowych [47, 49, 53, 55].

Preseniliny podlegają obróbce proteolitycznej. W jej wyniku PS1 jest cięta na dwa polipeptydy o masie 27-28 kDa (część N-końcowa) i 16-18 kDa (część C-końcowa) [51, 52]. Obróbka PS2 prowadzi do powstania fragmentu N-końcowego o masie 35 kDa

i fragmentu C-końcowego o masie 20 kDa [48]. Preseniliny są również fosforylowane w resztach seryny [49].

Rolę presenilin próbuje się ustalić poszukując homologii z innymi białkami o znanej funkcji, a także na podstawie efektów fenotypowych mutacji w genach presenilin.

Stwierdzono homologię genów presenilin do dwóch genów *Caenorhabditis elegans*: *spe4* i *sel12* [56, 57]. *spe4* reguluje transport białek w aparacie Golgiego w procesie spermatogenezy [58]. Być może preseniliny spełniają podobną funkcję, uczestnicząc w transporcie β APP. 80% znanych mutacji w genach presenilin dotyczy sekwencji konserwowanej w *sel12* [1, 57]. Białko to współdziała z jednym z receptorów rodziny Notch, związanej z determinowaniem losów komórek [57-59]. Rola *sel12* nie jest jednak dokładnie poznana. Myszy pozbawione genu *PS1* wykazują fenotyp podobny do obserwowanego u myszy z mutacjami Notch [60, 61], oraz zaburzenia rozwoju centralnego układu nerwowego [60]. Na związek presenilin z rozwojem mózgu i funkcjonowaniem neuronów wskazują też dane o zmiennej na różnych etapach rozwoju obróbce proteolitycznej tych białek [50].

Preseniliny wywierają też wpływ na uwalnianie jonów wapnia z wnętrza retikulum endoplazmatycznego, na co wskazują zaburzenia tego procesu w komórkach ekspresujących zmutowaną *PS1* [62].

Stwierdzono, że mutacje w genach presenilin uwrażliwiają hodowane neurony na apoptozę indukowaną β -amyloidem [62, 63]. Zwiększoną wrażliwość na apoptozę zaobserwowano również w komórkach z nadekspresją genu *PS2* [64].

Preseniliny biorą prawdopodobnie udział w obróbce β APP. W hodowlach komórkowych i myszach transgenicznym mutacje w genach presenilin powodują wzrost produkcji dłuższej, 42-aminokwasowej formy β -amyloidu i zmniejszenie poziomu sAPP α , działającego jako neuroprotektor [65-67]. Być może mutacje w genach presenilin faworyzują w jakiś sposób jedną z sekretaz [50]. Może to stanowić wskazówkę co do roli presenilin w patologii AD (patrz rozdz. V).

IV. Apolipoproteina E

Apolipoproteina E (ApoE) jest 299-aminokwasową glikoproteiną o masie 34 kDa. Fizjologicznie związana jest z transportem cholesterolu [68].

Gen ApoE zlokalizowany jest na chromosomie 19 i zawiera 4 eksony [69]. Ulega ekspresji w większości tkanek. Głównym miejscem syntezy ApoE jest wątroba, na drugim miejscu pod tym względem znajduje się mózg [68]. Znanych jest kilka alleli ApoE, z których najczęściej występują: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. Formy alleliczne białka różnią się między sobą jednoaminokwasowymi podstawieniami w pozycjach 112 i 158. Dla $\epsilon 3$ są to: Cys112 i Arg 158, dla $\epsilon 2$: Cys112 i Cys158, dla $\epsilon 4$: Arg 112 i Arg 158 [69]. Źródłem polimorfizmu białka

ApoE oprócz istnienia alleli jest jego glikozylacja [68].

ApoE a zwłaszcza forma Apo $\epsilon 4$ jest uznawana za czynnik ryzyka w chorobie Alzheimera. Częstość występowania allelu $\epsilon 4$ w ogóle populacji wynosi 11-15% [69], natomiast w grupie chorych na późną formę AD, częstość jest zwiększona do 50% [70]. Białko Apo $\epsilon 4$ wiąże się do β -amyloidu *in vitro* i jest składnikiem płytek amyloidowych oraz splotów neurofibrilarnych [70-72].

Stwierdzono silne powiązanie allelu Apo $\epsilon 4$ z wczesną [8], późną [70, 73, 74] i sporadyczną [73] formą choroby Alzheimera. Występowaniu Apo $\epsilon 4$ towarzyszy zwiększone odkładanie złogów β -amyloidu [75]. Należy jednak zaznaczyć, że nie wszyscy nosiciele allelu $\epsilon 4$ zapadają na chorobę Alzheimera i odwrotnie, osoby nie posiadające tej formy ApoE także chorują na AD. Zmniejszoną częstość zachorowań zaobserwowano wśród nosicieli allelu Apo $\epsilon 2$ [76].

Nie wiadomo, w jaki sposób ApoE bierze udział w patologii AD. Uważa się, że białko to jest czynnikiem ułatwiającym rozwój i wpływającym na przebieg choroby. Eksperymenty na myszach transgenicznym pokazały, że Apo $\epsilon 4$ sprzyja agregacji β -amyloidu *in vivo* [77]. Stwierdzono także, że ApoE wiąże się do rozpuszczalnej formy β -amyloidu *in vitro* [78]. Prawdopodobnie więc apolipoproteina E wiążąc się do β -amyloidu zmniejsza jego rozpuszczalność, co może ułatwiać agregację peptydu. Sugeruje się, że ApoE pełni rolę tzw. patologicznego białka chaperonowego, które wiążąc się do innego białka — w tym wypadku β -amyloidu — wymusza zmianę konformacyjną prowadzącą do rozwoju choroby [71].

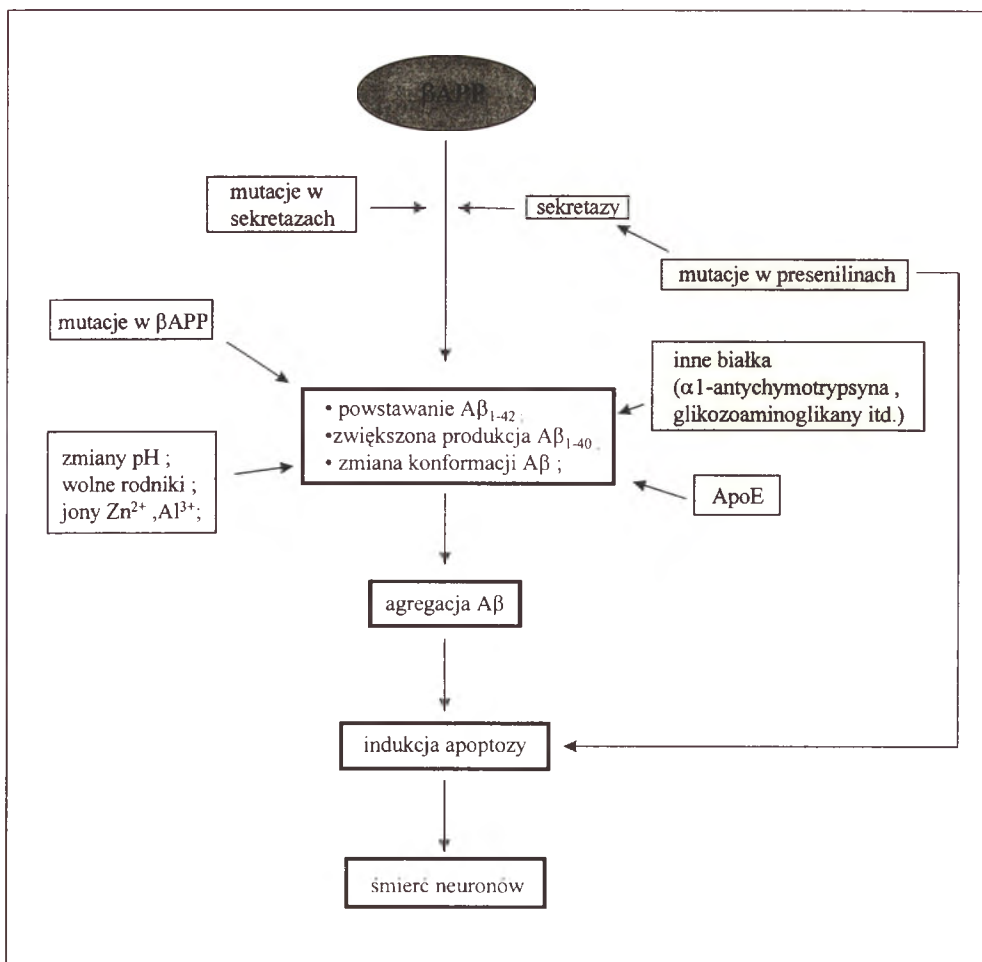
V. Przebieg choroby na poziomie molekularnym

Szereg danych wskazuje na to, że kluczową rolę w rozwoju AD odgrywa β -amyloid. Zagregowany β -amyloid jest toksyczny dla neuronów *in vitro* [79, 80], oraz komórek siatkówki *in vivo* [81].

Płytki amyloidowe są głównie zbudowane z dłuższej, 42-aminokwasowej formy β -amyloidu ($A\beta_{1-42}$) [38, 82]. Forma ta jest mniej rozpuszczalna niż β -amyloid 40-aminokwasowy ($A\beta_{1-40}$) [83, 84].

Badania nad agregacją różnych form β -amyloidu wskazują na to, że tworzenie płytek amyloidowych przez $A\beta_{1-40}$ może być indukowane przez śladowe ilości form $A\beta_{1-43}$ i $A\beta_{1-42}$ [43].

U transgenicznym myszy, w których komórkach zachodzi ekspresja zmutowanego β APP [85], lub jego C-końcowego fragmentu [86] rozwijają się zmiany patologiczne, charakterystyczne dla AD. Stwierdzono, że mutacje β APP w pozycjach: 717, 670/671, 692 (numeraacja formy 770-aminokwasowej) związane są ze zwiększoną produkcją β -amyloidu [36, 87-90]. Omawiane mutacje zlokalizowane są w pobliżu miejsc cięcia sekretaz. Sugeruje to wpływ mutacji na obróbkę β APP, a przez to na poziom uwalnianego amyloidu



Ryc. 2. Przebieg choroby Alzheimera na poziomie molekularnym. Opis w tekście. [wg 7, 16, 85]

i potencjalną agregację [2].

Agregacja β -amyloidu może być związana ze zmianą struktury drugorzędowej peptydu. Pewne dane wskazują na to, że sekwencja aminokwasowa β -amyloidu pozwala na przyjmowanie w części N-końcowej dwóch stanów konformacyjnych: α -heliksu i β -kartki. Rozpuszczalny β -amyloid (sA β), normalnie występujący w płynach ustrojowych ludzi, przyjmuje konformację α -helikalną. Konformacja β -kartki jest charakterystyczna dla β -amyloidu nierozpuszczalnego, tworzącego złoży amyloidowe, występujące u osób chorych na AD [90, 91]. Wydaje się, że zmiana konformacji może zachodzić w wyniku działania szeregu czynników związanych ze starzeniem (np. zmiany pH, obecność wolnych rodników), zwiększonego poziomu β -amyloidu, powstawania formy A β_{1-42} , interakcji z pewnymi jonami metali (np. Zn²⁺, Al³⁺), modyfikacji posttranslacyjnych, obecności tzw. patologicznego białka chaperonowego [84, 90-92]. Według tej ostatniej hipotezy ApoE wiąże się do β -amyloidu, wymuszając zmianę konformacji, bądź wspomagając utrzymanie już zmienionej struktury [71]. Za tą ostatnią możliwością przemawia fakt preferencyjnego wiązania ApoE do β -amyloidu w konformacji β -kartki [92].

Z przedstawionych tutaj danych wyłania się następujący możliwy przebieg choroby: bezpośrednią przyczyną śmierci neuronów wydaje się być apoptoza indukowana zagregowanym β -amyloidem. Agregacja peptydu może zachodzić na skutek zwiększonej produ-

kcji β -amyloidu, zwłaszcza formy A β_{1-42} (powstającej w wyniku zmiennej obróbki proteolitycznej prekursora, β APP), oraz zmian konformacyjnych, obejmujących przejście α -helisy \rightarrow β -kartki. Powodem nieprawidłowej obróbki β APP mogą być: 1. mutacje β APP, zlokalizowane w pobliżu miejsc cięcia dla sekretaz, 2. działanie zmutowanych presenilin (np. poprzez faworyzowanie jednej z sekretaz), 3. mutacje w genach sekretaz. Zmiany konformacji β -amyloidu mogą zachodzić na skutek oddziaływania z patologicznym białkiem chaperonowym (np. ApoE).

VI. Podsumowanie

Przedstawiony tutaj przebieg AD na poziomie molekularnym nie jest do końca potwierdzony. Stwierdzono, że podwyższone stężenie β -amyloidu u myszy transgenicznych niekoniecznie musi prowadzić do agregacji peptydu [93]. Wykazano, że nie ma wyraźnej korelacji między poziomem β -amyloidu w płynie mózgowo-rdzeniowym a zapadalnością na AD [42]. Możliwe więc, że w agregacji β -amyloidu biorą również udział inne czynniki.

β APP i β -amyloid, preseniliny oraz apolipoproteina E nie są jedynymi białkami związanymi z AD. Z powstawaniem płytek starczych wydają się też być związane ApoJ [78], NAC (nieamyloidowy składnik płytek starczych — ang. *non-A β component Alzheimer's plaque* = *α -synucleina*) [94], osoczowy składnik amyloid

P [95], glikoaminoglikany [96], α 1-antychymotrypsyna [97, 98], składniki dopełniacza [98]. Oprócz płytek starczych, drugą główną zmianą patologiczną w mózgu ludzi chorych na AD, są sploty neurofibrylarne, których podstawowym składnikiem jest τ -białko związane z mikrotubulami, ufosforylowane ponad normalny poziom [99, 100].

Mechanizm choroby Alzheimerera jest złożony i nie do końca poznany. Stąd też problem stanowi znalezienie skutecznej metody leczenia. Spośród wielu czynników uczestniczących w rozwoju choroby centralną rolę wydaje się pełnić β -amyloid i jego prekursor β APP. Opierając się na tej hipotezie Soto i wsp. [101, 102] skonstruowali 5-aminokwasowy peptyd, hamujący tworzenie włókien amyloidowych przez formy $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$ *in vitro*. Peptyd zapobiega również indukowanej zagregowanemu β -amyloidem śmierci hodowanych neuronów i zmniejsza odkładanie złożeń amyloidowych u szczurów, u których wywołało objawy AD.

Proponowany wyżej przebieg agregacji β -amyloidu wskutek zmiany struktury drugorzędowej przypomina przedstawiony przez noblistę z 1997 r., S. Prusiner'a, mechanizm rozwoju chorób prionowych, opierający się na przyjmowaniu konformacji β -kartki przez białko PrPc [10]. Przejście konformacyjne katalizowane jest przez hipotetyczne białko „X”. Być może mechanizm ten dotyczy całego szeregu chorób neurodegeneracyjnych (np. Parkinsona, Huntingtona, czy Creutzfeldta-Jakoba) [103]. Wskazuje na to również obecność ApoE w złożeń amyloidowych obserwowanych w mózgach ludzi chorych na choroby prionowe [72]. Intensywne badania prowadzone obecnie nad rolą białek w rozwoju AD mogą więc pomóc w wyjaśnieniu patologii całej grupy chorób atakujących układ nerwowy i w znalezieniu skutecznych metod leczenia.

Podziękowanie

Autorka pragnie podziękować panu prof. dr hab. Krzysztofowi Staronowi za cenne uwagi w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 28 grudnia 1998 r.

Zaakceptowano do druku 21 stycznia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B (1997) *Neurobiol Dis* 3: 313-328
2. Hendriks L, van Broeckhoven C (1996) *Eur J Biochem* 237: 6-15
3. Tanzi RE i wsp (1996) *Neurobiol Dis* 3: 159-168
4. Schorderet M (1995) *Experientia* 51: 99-105
5. Selkoe DJ (1994) *Annu Rev Cell Biol* 10: 373-403
6. Clark RF i wsp (1995) *Nature Genet* 11: 219-222
7. Rogaeve E i wsp (1995) *Nature (Lond)* 376: 775-778
8. van Duijn CM i wsp (1994) *Nature Gen* 7: 74-78
9. Saunders AM i wsp (1993) *Neurology* 43: 1467-1472
10. Prusiner SB (1996) *TIBS* 21: 482-487
11. König G i wsp (1992) *J Biol Chem* 267: 10804-10809
12. Kitaguchi N i wsp (1988) *Nature (Lond)* 331: 530-532
13. Tanzi RE i wsp (1988) *Nature (Lond)* 331: 528-530

14. Kang J i wsp (1987) *Nature (Lond)* 325: 733-736
15. Yoshikai S i wsp (1990) *Gene* 87: 257-263
16. Ponte P i wsp (1988) *Nature (Lond)* 331: 525-527
17. Tanzi RE, St George-Hyslop PH, Crusella JF (1989) *TINS* 12: 152-158
18. Weidemann A i wsp (1989) *Cell* 57: 115-126
19. Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS (1995) *Biochem J* 311: 1-16
20. Wang R, Meschia JF, Cotter RJ, Sisodia SS (1991) *J Biol Chem* 266: 16960-16964
21. Selkoe DJ (1996) *J Biol Chem* 271: 18925-18928
22. Hung AY, Selkoe DJ (1994) *EMBO J* 13: 534-542
23. Oltersdorf T i wsp (1990) *J Biol Chem* 265: 4492-4497
24. Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ (1995) *Neuron* 14: 661-670
25. Esh FS i wsp (1990) *Science* 248: 1122-1128
26. Golde TE i wsp (1992) *Science* 255: 728-730
27. Haass C i wsp (1992) *Nature (Lond)* 357: 500-502
28. Citron M i wsp (1996) *Neuron* 17: 171-179
29. Tischer E, Cordell B (1996) *J Biol Chem* 271: 21914-21919
30. Seubert P i wsp (1993) *Nature (Lond)* 361: 260-262
31. Mattson MP, Furukawa K (1997) *Nature (Lond)* 387: 457-458
32. Sinha S i wsp (1990) *J Biol Chem* 265: 8983-8985
33. Small DH i wsp (1994) *J Neurosci* 14: 2117-2127
34. Greenberg SM i wsp (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7104-7108
35. Schubert D, Jin L-W, Saitoh T, Cole G (1989) *Neuron* 3: 689-694
36. Citron M i wsp (1992) *Nature (Lond)* 360: 672-674
37. Haass C i wsp (1992) *Nature (Lond)* 359: 322-325
38. Gravina SA i wsp (1995) *J Biol Chem* 270: 7013-7016
39. Prelli F, Castano E, Glenner GG, Frangione B (1988) *J Neurochem* 51: 648-651
40. Roher AE i wsp (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10836-10840
41. Seubert P i wsp (1992) *Nature (Lond)* 359: 325-327
42. Shoji M i wsp (1992) *Science* 258: 126-129
43. Jarret JT, Berger EP, Lansbury PT Jr (1993) *Biochemistry* 32: 4693-4697
44. Kruman I i wsp (1997) *J Neurosci* 17: 5089-50100
45. Mattson MP i wsp (1997) *J Neurosci Res* 49: 681-697
46. Mattson MP, Partin J, Begley JG (1998) *Brain Res* 807: 167-176
47. Sherrington R i wsp (1995) *Nature (Lond)* 375: 754-760
48. Mattson MP, Guo Q, Furukawa K, Pedersen WA (1998) *J Neurochem* 70: 1-14
49. De Strooper B i wsp (1997) *J Biol Chem* 272: 3590-3598
50. Hartmann H i wsp (1997) *J Biol Chem* 272: 14505-14508
51. Podlisy MP i wsp (1997) *Neurobiol Dis* 3: 325-327
52. Thinakaran G i wsp (1996) *Neuron* 17: 181-190
53. Kovacs DM, Tanzi RE (1998) *Cell Mol Life Sci* 54: 902-909
54. Renbaum P, Levy-Lahad E (1998) *Cell Mol Life Sci* 54: 910-919
55. Lehmann S, Chiesa R, Harris DA (1997) *J Biol Chem* 272: 12047-12057
56. Levitan D i wsp (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14940-14944
57. Levitan D, Greenwald I (1995) *Nature (Lond)* 377: 351-354
58. L'Hernault SW, Arduengo M (1992) *J Cell Biol* 119: 55-68
59. Jarriault S i wsp (1995) *Nature (Lond)* 377: 355-358
60. Shen J i wsp (1997) *Cell* 89: 629-639
61. Wong PC i wsp (1997) *Nature (Lond)* 387: 288-292
62. Guo Q i wsp (1996) *NeuroReport* 8: 379-383
63. Guo Q i wsp (1997) *J Neurosci* 17: 4212-4222
64. Deng G, Pike CJ, Cotman CW (1996) *FEBS Lett* 397: 50-54
65. Sudoh S i wsp (1998) *J Neurochem* 71: 1535-1543
66. Borchelt DR i wsp (1996) *Neuron* 17: 1005-1013
67. Duff K i wsp (1996) *Nature (Lond)* 383: 710-713
68. Mahley RW (1988) *Science* 240: 622-630
69. Breslow JL (1985) *Ann Rev Biochem* 54: 699-727
70. Strittmatter WJ i wsp (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1977-1981

71. Wisniewski T, Frangione B (1992) *Neurosci Lett* **135**: 235-238
72. Namba Y i wsp (1991) *Brain Res* **541**: 163-166
73. Strittmatter WJ i wsp (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8098-8102
74. Corder EH i wsp (1993) *Science* **261**: 921-923
75. Schemmel DE i wsp (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9649-9653
76. Corder EH i wsp (1994) *Nature Genet* **7**: 180-184
77. Bales KR i wsp (1997) *Nature Genet* **17**: 263-264
78. Wisniewski T i wsp (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 359-365
79. Takadera T, Sakura N, Mohri T, Hashimoto T (1993) *Neurosci Lett* **16**: 41-44
80. Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1991) *Brain Res* **563**: 311-314
81. Jen LS i wsp (1998) *Nature (Lond)* **392**: 140-141
82. Miller DL i wsp (1993) *Arch Biochem Biophys* **301**: 41-52
83. Burdick D i wsp (1992) *J Biol Chem* **267**: 546-554
84. Barrow CJ, Zagorski MG (1991) *Science* **253**: 179-182
85. Games D i wsp (1995) *Nature (Lond)* **373**: 523-527
86. Nalbantoglu J i wsp (1997) *Nature (Lond)* **387**: 500-505
87. Perez RG, Squazzo SL, Koo EH (1996) *J Biol Chem* **271**: 9100-9107
88. Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994) *J Biol Chem* **269**: 17741-17748
89. Suzuki N i wsp (1994) *Science* **264**: 1336-1340
90. Soto C, Frangione B (1995) *Neurosci Lett* **186**: 115-118
91. Soto C, Castano EM, Frangione B, Inestrosa NC (1995) *J Biol Chem* **270**: 3063-3067
92. Golabek AA, Soto C, Vogel T, Wisniewski T (1996) *J Biol Chem* **271**: 10602-10606
93. Johnson-Wood K i wsp (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1550-1555
94. Ueda K i wsp (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11282-11286
95. Coria F i wsp (1988) *Lab Invest* **58**: 454-458
96. Snow AD, Willmer J, Kisilewski R (1987) *Lab Invest* **56**: 120-123
97. Wang X i wsp (1998) *Ann Neurol* **44**: 387-390
98. McGeer PL, Rogers J (1992) *Neurology* **42**: 447-449
99. Friedhoff P, Schneider A, Mandelkow E-M, Mandelkow E (1998) *Biochemistry* **37**: 10223-10230
100. Hasegawa M, Crowther RA, Jakes R, Goedert M (1997) *J Biol Chem* **272**: 33118-33124
101. Soto C i wsp (1998) *Nature Med* **4**: 822-826
102. Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **226**: 672-680
103. Welch WJ, Gambetti P (1998) *Nature (Lond)* **392**: 23-24

Bakteryjna oporność na wankomycynę i inne antybiotyki glikopeptydowe: rosnące zagrożenie

Bacterial resistance to vancomycin and other glycopeptides: an emerging threat

MAŁGORZATA KŁOSZEWSKA¹
ZDZISŁAW MARKIEWICZ²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa wankomycyny
- III. Mechanizm działania glikopeptydów
- IV. Genetyczne i biochemiczne podstawy oporności na wankomycynę
 - IV-I. Enterokoki
 - IV-I.I. Wankomycyno-oporność klasy A
 - IV-I.II. Wankomycyno-oporność klasy B
 - IV-I.III. Wankomycyno-oporność klasy C
 - IV-I.IV. Wankomycyno-oporność klasy D
 - IV-II. Gronkowce i paciorkowce
 - IV-III. Inne bakterie gramdodatnie
- V. Perspektywy

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of vancomycin
- III. Mechanism of glycopeptide action
- IV. Genetic and biochemical basis of vancomycin resistance
 - IV-I. Enterococci
 - IV-I.I. Class A vancomycin resistance
 - IV-I.II. Class B vancomycin resistance
 - IV-I.III. Class C vancomycin resistance
 - IV-I.IV. Class D vancomycin resistance
 - IV-II. Staphylococci and streptococci
 - IV-III. Other gram-positive bacteria
- V. Outlook

Wykaz stosowanych skrótów: PBP (ang. *Penicillin Binding Protein*) — białko wiążące penicylinę; numer przy skrótach PBP, np. PBP2 oznacza kolejną na fluorogramie białko z kilku charakterystycznych dla danej bakterii wiążące

znakowaną penicylinę; MIC (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) — najniższe stężenie antybiotyku całkowicie hamujące wzrost bakterii; NCCLS (ang. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) - USA, ORF (ang. *Open Reading Frame*) — otwarta ramka odczytu; PG — peptydoglikan, syn. mureina; ASM (ang. *American Society for Microbiology*), CDC (ang. *Center for Disease Control*) - Atlanta, USA.

¹ Mgr, ² prof. dr hab., Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski, Nowy Świat 67, 00-046 Warszawa

I. Wstęp

Przez wiele lat od wprowadzenia penicyliny do użytku w 1942 r. antybiotyk ten, oraz jego liczne syntetyczne i półsyntetyczne pochodne, był głównym lekiem z wyboru w przypadku wielu chorób spowodowanych przez bakterie, przede wszystkim gramdodatnie. Jednak już pod koniec lat czterdziestych opisano pierwsze przypadki bakteryjnej oporności na penicylinę, spowodowane aktywnością β -laktamazy (penicylinazy). Obecnie oporność taka jest bardzo szeroko rozpowszechniona [1] i w różnym stopniu dotyczy prawie wszystkich stosowanych antybiotyków β -laktamowych — odsetek metycyliny-opornych szczepów gronkowca złocistego, produkujących dodatkowo białko wiążące penicylinę, PBP2, wzrósł w Stanach Zjednoczonych od 2% w 1975 r. do 35% w 1996 r., a w Japonii ponad 60% wszystkich szczepów gronkowca złocistego, zbadanych w latach 1992-1993, było opornych na ten antybiotyk [2]. Obecnie w niektórych szpitalach w USA i Hiszpanii odsetek metycyliny-opornych szczepów gronkowca sięga nawet 90%. Szybko wzrasta liczba szczepów dwoinki zapalenia płuc wyizolowanych ze środowiska szpitalnego (potocznie zwanych szczepami szpitalnymi), wobec których minimalne stężenie hamujące (MIC) penicyliny jest nawet do 5 tysięcy razy wyższe niż wobec szczepu standardowego R6 [3]. Podobna jest sytuacja w przypadku wielu innych bakterii gramdodatnich, ale oporność na beta-laktamy nie jest też rzadkością wśród bakterii gramujemnych. Na to zjawisko nakłada się, coraz powszechniej spotykana u bakterii, oporność wieloraka, zwana też wielokrotną. Liczne szczepy dwoinki zapalenia płuc, oprócz oporności na penicylinę, wykazują równocześnie oporność na aminoglikozydy, tetracyklinę oraz antybiotyki fluorochinolowe. Podobnie enterokoki, które zajmują niechlubne trzecie miejsce, po gronkowcach i *Escherichia coli*, jako przyczyna zakażeń szpitalnych, są coraz częściej odporne na praktycznie wszystkie powszechnie stosowane antybiotyki [4-6]. Według amerykańskiego ośrodka CDC w Atlancie, w 1996 r. w Stanach Zjednoczonych na zwalczanie infekcji powodowanych przez bakterie odporne na antybiotyki wydano ponad 4 miliardy dolarów [7].

W przypadku bakterii gramdodatnich wydawało się, że rolę antybiotyków β -laktamowych z powodzeniem przejmą antybiotyki glikopeptydowe, przede wszystkim wyizolowana w 1956 r. wankomycyna, a w 1978 r. teikoplanina [8]. Wprawdzie po wstępnych nadziejach związanych u wankomycyną, wprowadzenie metycyliny, bardzo aktywnej wobec penicyliny-opornych szczepów gronkowca złocistego, jak również toksyczność pierwszych preparatów samej wankomycyny ze względu na stopień ich zanieczyszczenia, spowodowało odwrócenie się od wankomycyny aż do momentu pojawienia się pierwszych gronkowców opornych na metycylinę [9, 10]. Po wielu latach

skutecznego stosowania wankomycyny i innych glikopeptydów, w drugiej połowie lat osiemdziesiątych wyizolowano pierwsze enterokoki niosące plazmidowo-kodowaną oporność zarówno na wankomycynę, jak i teikoplaninę, a następnie opisano pierwsze przypadki infekcji wywołanych przez wankomycyno-oporne szczepy *Enterococcus faecium* [11, 12]. Od 1989 r. do 1993 r. liczba opornych na wankomycynę enterokoków, izolowanych z materiału klinicznego, wzrosła 26-krotnie [13]. W 1993 r. wśród wszystkich enterokoków izolowanych z krwi pacjentów w centrum medycznym University of Pennsylvania, 28% wykazywało oporność na wankomycynę. W szpitalu miejskim w Cincinnati, USA, 43% wszystkich szczepów *E. faecium*, izolowanych z materiału klinicznego, było opornych na wankomycynę, a w ośrodku dla weteranów w innym dużym mieście amerykańskim odsetek opornych na wankomycynę szczepów *E. faecium* sięgał 67% [14]. Najbardziej niepokojące dane dotyczą dużego szpitala w Nowym Jorku — Cornell Medical Center, gdzie na oddziale dziecięcym liczba opornych szczepów szpitalnych *E. faecium* wzrosła od 16,7% w 1990 r. do 89,8% w 1995 r. [15].

Dane europejskie są dużo korzystniejsze. Wywiad obejmujący 70 ośrodków mikrobiologicznych w 9 krajach Zachodniej Europy wykazał obecność średnio 2,3% szczepów enterokoków opornych na wankomycynę, oraz 1,7% enterokoków opornych na teikoplaninę. Oporność na antybiotyki glikopeptydowe występuje dziesięć razy częściej u *E. faecium* niż u *E. faecalis* [16]. W jednym z mniejszych szpitali w Szwecji, po wprowadzeniu maksymalnych środków ostrożności, odsetek wankomycyno-opornych szczepów szpitalnych *E. faecium* wykazał nawet spadek do blisko zera na przestrzeni trzech lat. Jednakże na dane europejskie może wpływać technika badania enterokokowych szczepów szpitalnych. Wprowadzenie w kilku ośrodkach w Stanach Zjednoczonych bardziej rygorystycznych technik badawczych zaowocowało znacznym wzrostem liczby izolowanych enterokoków opornych na antybiotyki glikopeptydowe.

Oporność na wankomycynę nie jest ograniczona do *E. faecium* i *E. faecalis*. Liczne szczepy *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium* i *E. raffinosus* również przejawiają stosunkowo niski stopień oporności na wankomycynę, pozostając wrażliwymi na teikoplaninę [17-19]. W latach 1989-1996 opisano również szereg przypadków oporności na wankomycynę szczepów *Staphylococcus haemolyticus* i *S. epidermidis* [20], wyrażając przy okazji obawę przed pojawieniem się opornych na ten antybiotyk szczepów *S. aureus*, zwiastujących początek końca ery antybiotykowej. Obawy te były prorocze. W latach 1987-1994 opisano kilka szczepów gronkowca złocistego o jedynie 4- do 8-krotnie zmniejszonej wrażliwości na wankomycynę. *In vitro* z powodzeniem stwarzano też warunki do przejścia genów warunkujących oporność na wankomycynę z *E. faecium* do *Staphylococcus aureus* [21]. W 1996 r.

w laboratorium A. Tomasz [22] w wyniku presji antybiotykowej otrzymano spontanicznego mutantu *S. aureus* o 66-krotnie zwiększonej oporności na wankomycynę (wzrost MIC wankomycyny z 1,5 µg/ml do 100 mg/ml) a podobne mutanty *S. aureus* uzyskano m. in. w pracowniach R. Dama [23] i K. Hiramatsu [24]. W tym samym roku w Japonii, a w rok później w Stanach Zjednoczonych i ponownie w Japonii [5, 25], zidentyfikowano przypadki infekcji wywołanych szczepem gronkowca złocistego o pośredniej oporności na wankomycynę (MIC pomiędzy 8 i 16 mg/ml). Hodowla szczepów o pośredniej oporności w obecności wankomycyny prowadziła do zwiększenia MIC wobec tych szczepów do 32 mg/ml [26]. Znana jest też naturalna oporność na antybiotyki glikopeptydowe bakterii należących do rodzajów *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*, jak również bakterii *Bacillus popilliae* stosowanej z powodzeniem od kilkadziesiąt lat do zwalczania żuka *Popilia japonica* niszczącego wiele gatunków upraw [27]. W 1997 r. pojawiły się pierwsze doniesienia — o opornych na wankomycynę paciorkowcach — *Streptococcus bovis*, a w 1998 r. — o opornych szczepach *Bacillus circulans* [28].

W warunkach laboratoryjnych, w wyniku presji antybiotykowej, uzyskano szczepy *Listeria monocytogenes* o pośredniej oporności na wankomycynę (Markiewicz, dane nie publikowane). Jeszcze łatwiej udaje się na drodze koniugacji w laboratorium przekazać plazmid kodujący oporność z *E. faecium* do *L. monocytogenes*, uzyskując klony listerii odporne na 526 mg wankomycyny/ml [29, 30 oraz Markiewicz, dane nie publikowane]. Obydwa wspomniane gatunki współżyją w przewodzie pokarmowym bardzo wielu ludzi.

Rozpowszechnianie się oporności bakterii gram-dodatnich na wankomycynę, uważaną za lek ostatniej szansy, ma też swój wymiar ekonomiczny. Koszt leczenia jednego przypadku bakteriemii wywołanej przez wankomycyno-oporne enterokoki wynosi od 30 do 40 tysięcy dolarów, a i tak ponad 40% przypadków kończy się zgonem [31, 32].

II. Budowa wankomycyny

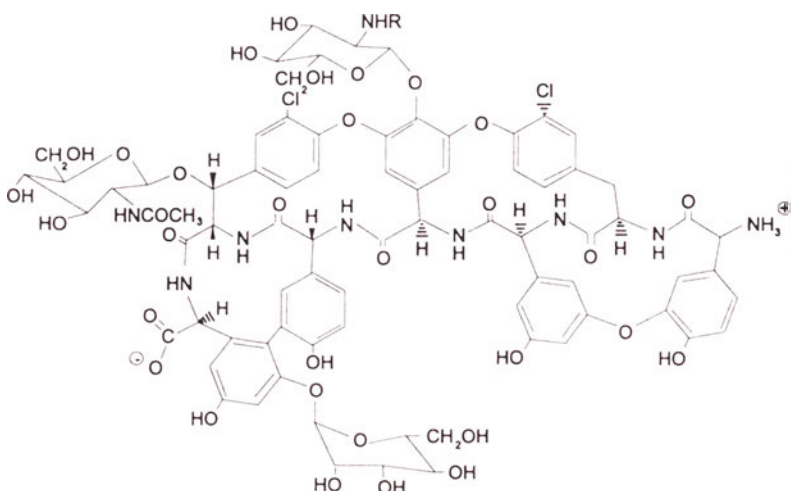
Wankomycyna została wyizolowana z produktów fermentacji prowadzonej przez *Streptomyces orientalis* (gatunku promieniowca znalezionej w próbce gleby pochodzącej z dżungli na Borneo), ale poznanie jej struktury było procesem tak trudnym, że zakończono go dopiero w latach 80-tych. Pomijając szczegóły budowy, które zostały już wcześniej zaprezentowane w licznych pracach, również przeglądowych [17, 33], a nie są istotne dla omawianego tutaj tematu, należy jednak nadmienić, że cząsteczka wankomycyny jest zbudowana z liniowego szkieletu heptapeptydowego. Jest to charakterystyczna cecha budowy wszystkich antybiotyków glikopeptydowych. Wankomycyna, odkryta jako pierwszy antybiotyk glikopeptydowy, jest jedynym antybiotykiem z tej grupy, który zawiera tylko pięć pierścieni aromatycznych — pozostałe mają ich siedem (Ryc. 1).

Teikoplanina (wyizolowana również z promieniowców — *Streptomyces teichomyceticus* — jako produkt prowadzonej przez nie fermentacji) została odkryta znacznie później, bo dopiero w 1978 r. Ma ona bardziej lipofilowy charakter niż wankomycyna, stąd lepiej penetruje tkanki i komórki, dłuższy jest też jej okres półtrwania w surowicy [34].

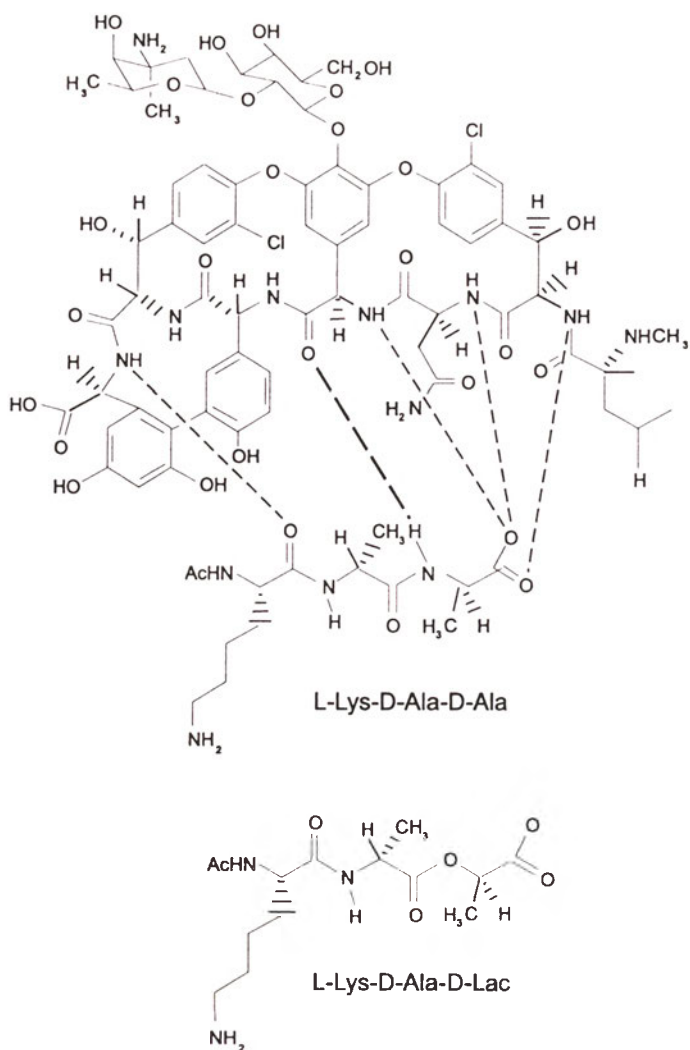
III. Mechanizm działania glikopeptydów

Wankomycyna, tak jak i inne glikopeptydy, zaburza trzeci i ostatni etap syntezy mureiny bakteryjnej, w którym β-1,4-disacharydopentapeptyd, prekursor peptydoglikanu, jest transportowany przez błonę cytoplazmatyczną i przyłączany do już istniejącej mureiny w reakcjach transglikozytacji (polimeryzacji powtarzających się jednostek disacharydo-pentapeptydowych do utworzenia liniowego łańcucha „nowego” peptydoglikanu) i transpeptydacji (tworzenia wiązań poprzecznych pomiędzy bocznymi łańcuchami peptydowymi [34] (Ryc. 2)).

Transpeptydazy oraz D,D-karboksy-peptydazy, enzymy tworzące wiązania poprzeczne między łańcucha-



Ryc. 1. Budowa cząsteczki teikoplaniny. Grupa R oznacza specyficzną resztę kwasu tłuszczowego.



Ryc. 3. Wiązanie terminalnych reszt prekursorów peptydoglikanu: pentapeptydowych (zakończonych N-acylo-D-alanylo-D-alaniną) i pentadepsypeptydowych (zakończonych N-acylo-D-alanylo-D-mleczanem) do cząsteczki wankomycyny. Wiązania tworzone między cząsteczką antybiotyku a terminalnymi resztami prekursorów zaznaczono liniami przerywanymi. Zamiana grupy amidowej w cząsteczce pentapeptydu na estrową w cząsteczce pentadepsypeptydu eliminuje wiązanie zaznaczone grubszą linią przerywaną.

bakterii gramujemnych [37-39].

IV. Genetyczne i biochemiczne podstawy oporności na wankomycynę

Aktywność wankomycyny i innych glikopeptydów jest zdeterminowana przez specyficzność substratową enzymów warunkujących strukturę prekursorów peptydoglikanu [16]. Mechanizm oporności na ten antybiotyk opisany dla szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus* polega na syntezie zmienionych prekursorów PG [20, 40] i jest zjawiskiem niezwykłym, bo wymagającym zmian specyficzność nie jednego białka, ale całego zestawu enzymów uczestniczących w biosyntezie mureiny [41]. Tak zmienione prekursory PG, syntetyzowane (podobnie jak „naturalne” prekursory) w cytoplazmie komórki bakteryjnej (I etap syntezy mureiny) i translokowane przez błonę cytoplazmatyczną w cyklu baktoprenolu (II etap syntezy mureiny) mają znacznie obniżone powinowactwo do wankomycyny i innych antybiotyków glikopeptydowych [42]. Podobnie dzieje się, jak się wydaje, także u paciorkowców z rodzaju *Streptococcus* [43]. Natomiast wankomycyno-oporne (VM^R) szczepy bakterii z rodzaju *Staphylococcus* syntetyzują pogrubioną ścianę komórkową i mają nieznacznie zmienione ilościowe propor-

cje białek związanych z osłonami komórkowymi [39].

Nie należy jednak zapominać, że oprócz, pojawiających się ostatnio coraz częściej, szczepów bakterii wykazujących różny poziom indukowanej oporności na antybiotyki glikopeptydowe, istnieje wiele gatunków mikroorganizmów legitymujących się naturalnym, stałym poziomem oporności na te antybiotyki. Dotyczy to promieniowców (producentów glikopeptydów) i gatunków bakterii kwasu mlekowego z rodzajów *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Lactobacillus* (wykazujące wysoki poziom oporności), a także szczepów *Enterococcus gallinarum* i *Enterococcus casseliflavus* (wykazujących niski poziom oporności) [44].

IV-I. Enterokoki

Już wczesne wyniki badań porównawczych preparatów błon komórkowych pochodzących z wankomycyno-opornych szczepów *Enterococcus faecalis* (wykazującego wysoki poziom oporności) lub *Enterococcus faecium* (wykazującego niski poziom oporności) wskazywały, że wankomycyna nie powoduje inaktywacji enzymów bakteryjnych, lecz indukcję ekspresji genów odpowiedzialnych za pojawianie się nowych białek, które nie występują w błonie cytoplazmatycznej enterokoków wankomycyno-wrażliwych [39, 45, 46].

Tabela 1.

Oporność enterokoków na wankomycynę.

Cechy charakterystyczne	Klasa fenotypowa		
	VanA	VanB	VanC
Charakter oporności MIC ($\mu\text{g/ml}$) wankomycyny	nabyta 64–1000	nabyta 4–1000	naturalna 2–32
teikoplaniny	16–512	0,5–1	0,5–1
Ekspresja	indukowana	indukowana	konstitutywna/indukowana
Lokalizacja genów <i>van</i>	plazmid	plazmid/chromosom	chromosom
Transfer przez koniugację	+	+	–
Elementy ruchome	Tn1546	90–250 kb	–
Geny kodujące			
specyficzne ligazy	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC-1</i> , <i>vanC-2</i> , <i>vanC-3</i>
Produkty tych ligaz	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser
Gatunki enterokoków	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. cassiflavus</i> , <i>E. flavescens</i>

Białka te różnią się nieznacznie masą (odpowiednio 39 i 39,5 kDa), nie dają antygenowych reakcji krzyżowych (co świadczy o istniejących między nimi różnicach strukturalnych), a skierowane przeciw nim przeciwciała nie reagują z białkami z preparatów błon cytoplazmatycznych komórek, które nie były wcześniej inkubowane z wankomycyną [47]. Wykazano także, że frakcje osłon komórkowych izolowane z wankomycyno-opornych szczepów *E. faecalis* A256 (wykazującego wysoki poziom oporności) i *E. faecium* D366 (wykazującego niski poziom oporności) miały zdolność wiązania wankomycyny, jeśli hodowla bakteryjna była prowadzona w podłożu bez antybiotyku. Te same frakcje izolowane z hodowli prowadzonych w podłożach zawierających niskie stężenie wankomycyny (8 $\mu\text{g/ml}$) nie miały prawie zupełnie zdolności wiązania antybiotyku, ale właściwość ta była przywracana po zagotowaniu próbek z 4% SDS w celu oczyszczenia preparatów z białek [48].

Białko o masie 39 kDa nazwano VanA, a kodujący je gen – *vanA* [45] natomiast dla białka o masie 39,5 kDa zaproponowano nazwę VanB (*vanB*).

Pod względem oporności na wankomycynę enterokoki nie są jednorodnie ani fenotypowo, ani genotypowo [49]. Na podstawie poziomu wankomycyno-oporności, możliwości jej indukowania oraz oporności krzyżowej na wankomycynę/teikoplaninę wśród enterokoków wankomycyno-opornych wyróżnia się trzy dobrze poznane klasy fenotypowe: VanA, VanB i VanC [20, 50, 51] (Tab. 1). Całkiem niedawno opisano enterokoki o nowych cechach oporności na antybiotyki glikopeptydowe, które wstępnie zaklasyfikowano do klasy VanD.

Zważywszy, że enterokoki Vm^R pojawiły się nagle, dopiero po około 30 latach używania wankomycyny do celów klinicznych, niezwykle interesującym pytaniem jest: skąd się wzięły? [52]. Rozprzestrzenianie się tego typu oporności jest efektem przekazywania genów *van* między komórkami bakterii, oraz eliminacji prekursorów naturalnie syntetyzowanych przez komórkę gospodarza [53]. Wiemy, że oporność na wankomycynę jest cechą kodowaną chromosomalnie

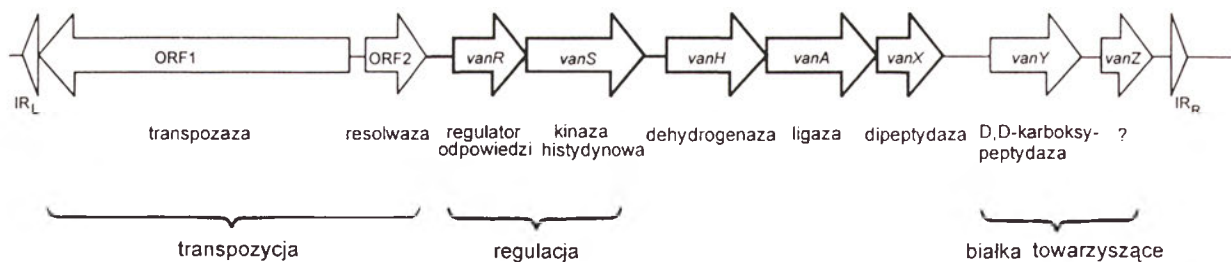
lub plazmidowo przez geny *van*, ale ich pochodzenie u enterokoków nadal jest zagadką.

Sekwencje aminokwasowe zarówno VanA, jak i VanB, wykazują wysoki stopień podobieństwa do sekwencji ligaz D-alanylo-D-alaninowych (Ddl) pochodzących ze *Streptomyces orientalis* (producenta wankomycyny) i *Streptomyces toyocaeusis* (producenta innego glikopeptydu – A47934) – ponad 60% podobieństwa. Ligaza D-Ala:D-Ala tego ostatniego wykazuje przy tym zdolność wykorzystywania jako substratu kwasu D-mlekowego [54]. Sugeruje to możliwość pozyskiwania przez enterokoki genów *vanA* i *vanB* od bakterii wytwarzających antybiotyki glikopeptydowe, być może poprzez jednego lub kilku „pośredników” bakteryjnych [54]. W świetle takiego przypuszczenia niepokojące mogą być doniesienia o wykrywaniu zanieczyszczeń niektórych partii antybiotyków przez DNA bakterii syntetyzujących te antybiotyki [55].

IV-1.1. Wankomycyno-oporność klasy A

Enterokoki należące do tej klasy wykazują indukowaną oporność zarówno na wysokie stężenie wankomycyny, jak i teikoplaniny [52, 56] (Tab. 1).

Dziewięć genów warunkujących fenotyp VanA wykryto na niosącym wysoki poziom oporności na wankomycynę, nie-koniugacyjnym plazmidzie pIP816 (34-kb) ze szczepu *E. faecium* BM4147. Szczep ten został wyizolowany w 1986 r. z komórek bakterii znajdujących się we krwi pacjenta zmarłego w wyniku infekcji enterokokami opornymi zarówno na antybiotyki β -laktamowe, jak i glikopeptydowe [57]. Wankomycyny i teikoplaniny hamujące wzrost tych bakterii M i C były dramatycznie wyższe (odpowiednio 1024 $\mu\text{g/ml}$ i 512 $\mu\text{g/ml}$) w porównaniu ze szczepem wrażliwym, wyleczonym z plazmidu (odpowiednio 4 $\mu\text{g/ml}$ i 1 $\mu\text{g/ml}$) [58]. Plazmid pIP816 jest pierwszym i stąd najlepiej poznany, ale nie jedynym plazmidem niosącym oporność na antybiotyki glikopeptydowe, występującym w tej grupie enterokoków. Prócz niego zidentyfikowano też inne plazmidy warunkujące wy-



Ryc. 4. Mapa Tn1546. Kolejne strzałki oznaczają sekwencje kodujące. Strzałki opisane IR_L i IR_R oznaczają odpowiednio lewą i prawą sekwencję odwróconą ("inverted repeat") transpozonu. Strzałki o grubszych konturach oznaczają geny niezbędne i wystarczające do nabycia wankomycyno-oporności typu VanA.

stąpienie wankomycyno-oporności, ale różniące się pod względem wielkości, profilu restrykcyjnego, możliwości przekazywania do innych komórek bakteryjnych oraz kodowanymi determinantami antybiotyko-oporności [30, 57, 59, 60]. Stwierdzono też, że w niektórych szczepach *E. faecium* i *E. faecalis* przekazywanie oporności na wankomycynę nie jest w ogóle związane z plazmidowym DNA [60].

Analizując sekwencje przylegające (ang. *flanking regions*) do zespołu genów *van* na plazmidzie pIP816 wykazano jego podobieństwo do transpozonów z rodziny Tn3. Charakterystyka molekularna plazmidu pozwoliła na indentyfikację odcinka o długości 10851 par zasad, nazwanego Tn1546 [40, 61]. Transpozycja Tn1546 do plazmidów koniugacyjnych, a następnie ich transfer przez koniugację do innych komórek bakteryjnych, jak również jego transpozycja do innych replikonów, wydają się być czynnikami decydującymi o rozprzestrzenianiu się tego typu wankomycyno-oporności [40, 49]. Zidentyfikowano najmniejszy odcinek DNA plazmidu pIP816 niezbędny do indukowania wankomycyno-oporności typu VanA. Jest to fragment 5,5-kb, w którym znajduje się skupisko pięciu genów (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA* i *vanX*) koniecznych i wystarczających do nabycia wysokiego poziomu oporności na wankomycynę. Trzy z nich są genami strukturalnymi (*vanH*, *vanA* i *vanX*), a dwa — regulatorowymi (*vanR* i *vanS*) [62].

Poza tą grupą genów Tn1546 koduje jeszcze cztery polipeptydy, z których dwa, jak już wspomniano, pełnią rolę w transpozycji (ORF1 i ORF2), jeden — uczestniczy w hydrolizie prekursorów PG (białko VanY), a funkcja jednego z nich (białko VanZ) jest dotąd nieznana [50] (Ryc. 4).

Jako pierwszy został zidentyfikowany gen *vanA*. Fragment restrykcyjny plazmidu pIP816, wielkości 1,761 par zasad, sklonowano w *E. coli* i, w wyniku sekwencjonowania, znaleziono w nim jedną otwartą ramkę odczytu (ORF) wielkości 1,029 par zasad, którą nazwano *vanA* [45]. Sekwencja aminokwasowa białka VanA wykazuje podobieństwo do sekwencji ligaz D-Ala:D-Ala enterobakterii, to jest enzymów, które syntetyzują w cytoplazmie dipeptyd D-alanylo-D-alaninę, przyłączany następnie do UDP-MurNAc-tripeptydu przez enzymy dodające [ang. *adding enzymes*]. Ligazy D-Ala:D-Ala są wysoce specyficzne substratowo jeśli chodzi o D-Ala w N-terminalnej części dipep-

tydu, a mniej — pod względem jego części C-terminalnej [63].

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że VanA syntetyzuje dipeptydy, ale w przeciwieństwie do ligaz DdlA i DdlB bakterii gramujemnych, nie tylko z D-alaniny, ale także z D-izomerów innych aminokwasów hydrofobowych: D-norwaliny, D-norleucyny, D-metioniny i D-feniloalaniny. Warunkiem koniecznym aktywności enzymatycznej VanA była obecność D-Ala w mieszaninie i za pomocą HPLC stwierdzono, że znajduje się ona nawsze w N-terminalnej pozycji dipeptydów [56]. Udowodniono też, że VanA nie ma aktywności D,D-karboksypeptydazy, ani transferazy aminokwasowej. Białko inkubowane z UDP-MurNAc-pentapeptydem o wyznakowanych [¹⁴C] resztach alaninowych ani nie odcina Ala od pentapeptydu, ani nie zamienia ostatniej reszty Ala na jakiś inny składnik [56].

Tak więc VanA jest ligazą D,D-dipeptydową, strukturalnie i funkcjonalnie podobną do ligaz D-Ala:D-Ala występujących u *Enterobacteriaceae*, ale o znacznie rozszerzonym spektrum substratowym [56, 64]. W przeciwieństwie do ligaz Ddl, ma także zdolność do katalizowania tworzenia wiązania estrowego pomiędzy D-Ala i kwasami D-hydroksykarboksylowymi [52]. Inne jest też miejsce występowania tych enzymów w komórce bakteryjnej — ligazy gramujemnych bakterii jelitowych są enzymami cytoplazmatycznymi, natomiast VanA leży w błonie cytoplazmatycznej [52]. Jednakże zostało udowodnione, że zamiana tylko jednej reszty aminokwasowej w pozycji 215 Ddlb z *E. coli* (z tyrozyny na feniloalaninę) zdecydowanie zmienia specyficzność substratową zmutowanego enzymu tak, że nabywa on aktywności ligazy D-Ala:D-Lac [65].

Analizując dalej plazmid pIP816 powyżej kodonu inicjującego ATG sekwencji *vanA* znaleziono sekwencję 983 par zasad [67]. Sekwencja ta, zachodząca na sekwencję *vanA* na odcinku 5 par zasad [62] koduje białko składające się z 322 aminokwasów, nazwane VanH. Sekwencja białka VanH wykazuje 19 do 30% podobieństwa do sekwencji aminokwasowej NAD⁺-zależnych dehydrogenaz kwasów hydroksykarboksylowych, enzymów, które utleniają D-2-hydroksykwasów do odpowiednich α -ketokwasów [66]. Jednakże charakterystyka oczyszczonego VanH i dalsze badania wykazały, że enzym ten katalizuje reakcję odwrotną tj.

redukcję α -ketokwasów i tworzenie kwasów D- α -hydroksykarboksylowych, które mogą być alternatywnymi substratami dla białka VanA.

Kofaktorem VanH może być zarówno NADPH, jak i NADH, natomiast najlepszymi substratami dla tego enzymu są kwas pirogronowy (redukowany do kwasu mlekowego) i kwas 2-keto-masłowy. Obie te cechy, podobnie jak charakterystyka kinetyczna, wskazują na podobieństwo VanH do dehydrogenaz kwasu D-mlekowego (D-LDH), występujących u wielu gatunków bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Leuconostoc*, co sugeruje ich pokrewieństwo ewolucyjne. Aktywność oczyszczonego VanH jest *in vitro* porównywalna z aktywnością enzymów D-LDH z *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus leichmanii*.

W celu identyfikacji kwasu D-hydroksykarboksylowego tworzonego przez VanH użyto szczepu *E. faecalis* JH2-2, zawierającego inaktywowany insercyjnie gen *vanH* sklonowany na plazmidzie wektorowym pAT80. Ta inaktywacja spektakularnie redukowała MIC wankomycyny dla *E. faecalis* JH2-2 (z 1024 $\mu\text{g/ml}$ do 1 $\mu\text{g/ml}$) [66]. Wprawdzie *in vitro* najlepszymi, spośród hydroksykwasów, substratami dla VanA są kwas D-2-hydroksymasłowy i D-2-aminomasłowy, ale *in vivo* wykorzystywany jest przede wszystkim kwas D-2-hydroksymlekowy. Dodawany do hodowli szczepu *E. faecalis* JH2-2, zawierającego inaktywowany insercyjnie gen *vanH*, przywracał temu szczepowi oporność na wankomycynę w stężeniu pięciokrotnie mniejszym niż kwas D-2-hydroksymasłowy. Dodatkowym potwierdzeniem tej hipotezy było wyizolowanie z cytoplazmy entrokoków Vm^R prekursorów UDP-MurNAc-tripeptydo-D-Ala-D-Lac w kilku laboratoriach badawczych [15, 67]. Wykazano też *in vitro* [52], że jeśli wszystkie łańcuchy boczne mureiny kończą się depsyepetydem D-alanylo-D-mleczanowym (D-Ala-D-Lac), to wankomycyna wiąże się z nią z powinowactwem ok. 1000 razy mniejszym w porównaniu do mureiny natywnej. Zamiana grupy NH- w wiązaniu amidowym dipeptydu alanylo-alaninowego na atom O w wiązaniu estrowym depsyepetydu eliminuje wiązanie wodorowe pomiędzy grupą NH-dipeptydu a wankomycyną, jedno z pięciu, którymi cząsteczka antybiotyku wiąże się z N-acyl-D-Ala-D-Ala (Ryc. 3).

Tak więc enzymy VanA i VanH współuczestniczą w syntezie depsyepetydu D-Ala-O-D-Lac [15, 52, 67, 68], który jest przyłączany do cytoplazmatycznych prekursorów PG w miejsce D-Ala-D-Ala przez, kodowane chromosomalnie, enzymy dodające [45]. Jak wykazano dla enzymów dodających *E. coli* (MurF), reakcja ta jest efektywniejsza kinetycznie niż reakcja przyłączania do UDP-MurNAc-tripeptydów alternatywnych substratów VanA (D-Ala-D-Met czy D-Ala-D-Phe). Tak więc wiązanie amidowe D-Ala-D-Ala nie jest cechą warunkującą rozpoznanie substratu przez te enzymy [52]. Reakcja ta zachodzi jeszcze zanim prekursorzy zostaną związane z ich lipidowym przenoś-

nikiem przez błonę cytoplazmatyczną — baktoprenolem [68, 69].

Reasumując, w komórkach enterokoków klasy VanA, dipeptyd D-Ala-D-Ala jest syntetyzowany zarówno przez ligazy Ddl, jak i białka VanA. Natomiast depsyepetyd D-alanylo-D-mleczanowy syntetyzuje tylko para VanA/VanH. Ponieważ VanA nie preferuje syntezy żadnego z produktów, nie jest możliwa represja syntezy D-Ala-D-Ala wyłącznie przez represję transkrypcji genu *ddl*. Jedynym efektywnym sposobem eliminacji D-alanylo-D-alaniny jest hydroliza tego dipeptydu i taki właśnie proces zachodzi za pośrednictwem białka VanX [68].

Białko VanX, o masie 38 kDa, okazało się być niezwykle, zależną od Zn^{2+} dipeptydazą [68, 70], która nie tnie wiązań estrowych, lecz hydrolizuje wiązanie amidowe wyłącznie dipeptydów z wolnymi końcami NH_2 i COOH , a więc D-Ala-D-Ala [71, 72]. VanX hydrolizuje dipeptydy D-Ala-D-Ala około 10^5 razy efektywniej niż depsyepetydy D-alanylo-D-mleczanowe, co powoduje obniżenie poziomu syntetyzowanych przez komórkę pentapeptydów i tym samym zwiększenie puli pentadepsyepetydów. Skorelowane działanie enzymów VanA, VanH i VanX prowadzi do tak efektywnej syntezy pentadepsyepetydów, że stanowią one 98% puli „późnych” prekursorów cytoplazmatycznych (podczas gdy pentapeptydy — tylko 2%) [70]. Dotychczas nie jest jednak poznane miejsce aktywne VanX, odpowiedzialne za selektywność substratową tego enzymu.

Funkcja genu *vanX* pozostawała dłużej nieznaną gdyż sekwencja DNA tego genu nie wykazywała znaczącego podobieństwa do sekwencji żadnego ze znanych białek [61]. VanX nie jest podobne do żadnych znanych peptydaz, oprócz D-stereospecyficznej aminopeptydazy bakterii *Ochrobactrum anthropi*, hydrolizującej nie tylko dipeptyd D-Ala-D-Ala, ale także tri- i tetrapeptydy, amidy i estry. Jednakże aktywność tej ostatniej, w przeciwieństwie do VanX, jest hamowana przez antybiotyki β -laktamowe. Białko VanX leży w błonie cytoplazmatycznej, ale nie zawiera żadnego skupiska aminokwasów hydrofobowych, co wyklucza jego położenie transbłonowe [70]. Ostatnio przeprowadzone badania krystalograficzne czystej formy VanX wykazały podobieństwo stereochemiczne tego białka do zależnej od Zn^{2+} karboksypeptydazy D-alanylo-D-alaninowej ze *Streptomyces albus* G [73].

Czwarty gen strukturalny, *vanY*, koduje białko (VanY) o masie ok. 35 kDa, leżące transbłonowo [74] w błonie cytoplazmatycznej. Jego synteza jest indukowana przez wankomycynę [74-76], a insercyjna inaktywacja genu *vanR* powoduje zanik aktywności D,D-karboksypeptydazy w komórkach bakteryjnych [77, 78], co sugeruje, że transkrypcja *vanY* może być regulowana tak, jak transkrypcja operonu *van* (*vanH*, *vanA* i *vanX*). VanY odcina *in vitro* C-terminalną resztę D-Ala od UDP-muramylo-pentapeptydu [48, 75, 76] i C-terminalną resztę D-Lac od UDP-muramylo-pen-

tadepsyptydu [76]. Jest więc jednocześnie D,D-karboksypeptydazą i D,D-karboksyesterazą [57]. Enzym ten nie ma aktywności transpeptydazy ani β -laktamazy [56]. Mimo podobieństwa funkcjonalnego nie wykazuje jednak podobieństwa strukturalnego do białek wiążących penicylinę (PBP), a jego aktywność nie jest hamowana przez antybiotyki β -laktamowe [75, 76]. VanY nie jest też białkiem koniecznym do indukowania wankomycyno-oporności typu VanA. Jego aktywność tylko nieznacznie (zaledwie czterokrotnie) podwyższa poziom oporności na ten antybiotyk u enterokoków klasy VanA [37] i jest istotna dla komórki bakteryjnej właściwie tylko wtedy, gdy dipeptydy D-Ala-D-Ala unikają hydrolizy przez VanX. Być może jego rola ogranicza się do odcinania dowolnej C-terminalnej reszty aminokwasowej tylko po to, by ograniczyć pulę prekursorów PG do UDP-muramylotetrapeptydów, do których wankomycyna nie ma powinowactwa [42, 72].

Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej postulowano, że białka VanS i VanR (27 kDa) tworzą dwuskładnikowy system regulujący ekspresję genów *vanH*, *vanA* i *vanX* na poziomie transkrypcji, indukowany obecnością wankomycyny w podłożu hodowlanym [62]. Podobne systemy są bardzo często spotykane u bakterii jako sposób reagowania na zmiany warunków środowiska [79, 80]. Na przykład w komórce *E.coli* może znajdować się nawet 50 różnych tego typu systemów. Stanowią je zwykle białko sensorowe — kinaza histydynowa, która, w najprostszych przypadkach, leży w błonie cytoplazmatycznej i regulator odpowiedzi, który jest białkiem cytoplazmatycznym.

Sekwencje aminokwasowe zarówno VanS, jak i VanR zawierają domeny charakterystyczne dla białek tworzących dwuskładnikowe systemy regulatorowe: VanS — N-terminalną domenę zawierającą dwa segmenty aminokwasów hydrofobowych (co wskazuje na jej charakter transbłonowy), pełniącą rolę sensora i C-terminalną domenę „transmisyjną”, charakterystyczną dla kinaz histydynowych, natomiast VanR — charakterystyczną dla N-terminalnej domeny cytoplazmatycznych białek regulatorowych. Oczyszczone białko VanS ulega *in vitro* autofosforylacji (His164), a następnie przenosi resztę fosforanową na resztę Asp53 białka VanR, wykazuje więc aktywność HPK. Ufosforylowana forma VanR (P-VanR) jest stabilna i selektywnie wiąże się z sekwencją DNA zawierającą promotor operonu *vanHAX* [51]. VanR wiąże się ok. pięciokrotnie silniej do promotora transkrypcji *vanR* (P_R) niż operonu *vanHAX* (P_H), ale jego forma P-VanR wykazuje czterdziestokrotnie większe powinowactwo do promotora genów wankomycyno-oporności niż do promotora *vanR*. Fosforylacja białka VanR zdecydowanie podwyższa jego powinowactwo do DNA: około pięćsetkrotnie — do promotora transkrypcji operonu *vanHAX* i około sześćdziesięciokrotnie — do promotora *vanR*. Inercyjna inaktywacja *vanR* znosi trans-

krypcję genów oporności na wankomycynę, co wskazuje na rolę VanR (w formie ufosforylowanej) jako aktywatora transkrypcji [62]. Natomiast inercyjna inaktywacja *vanS* nie wpływa na poziom wankomycyno-oporności chociaż w rezultacie obniża się poziom transkrypcji genów oporności na ten antybiotyk. Wobec braku VanS w komórce bakteryjnej następuje całkowita aktywacja obu promotorów, P_R i P_H , tak więc indukcja operonu *vanHAX* zachodzi przez wiązanie ufosforylowanej formy VanR do promotora P_P i wzmożenie transkrypcji genów *vanR* i *vanS* [81]. Wskazuje to także na zdolność VanR do autofosforylacji, być może przez acetylofosforan, lub możliwość fosforylacji tego białka przez jakąś inną kinazę histydynową.

Wobec braku wankomycyny w podłożu hodowlanym VanS negatywnie reguluje aktywność VanR, prawdopodobnie za pomocą jego defosforylacji. Nie zostało jednak jak dotąd ostatecznie stwierdzone, czy sygnałem indukcji systemu VanS/VanR są jedynie strukturalne właściwości wankomycyny i jej obecność w środowisku [50], czy interakcja wankomycyny z terminalnymi resztami D-alanilo-D-alaniny i zablokowanie reakcji transglikozylacji, czy też jakies produkty degradacji mureiny, gdyż podobnie do wankomycyny działają też inne związki (np. teikoplanina i moenomycyna).

Funkcja białka VanZ pozostaje nieznana, gdyż nie wykazuje ono znaczącego podobieństwa strukturalnego do żadnego ze znanych białek [37, 61] wydaje się jednak, że jest ono odpowiedzialne za oporność na teikoplaninę. Wyrażanie się genu *vanZ* sklonowanego na plazmidzie wektorowym w szczepie *E.faecalis* JH2-2, podwyższało czterokrotnie MIC teikoplaniny tego szczepu, ale nie wpływało na MIC wankomycyny wobec niego [82]. Sugeruje to istnienie jakiegoś innego mechanizmu niskiego poziomu oporności na antybiotyki glikopeptydowe, kodowanego przez transpozon Tn1546, w którym uczestniczy białko VanZ. Aktywność VanZ nie powoduje bowiem żadnych wykrywalnych zmian w puli rozpuszczalnych, cytoplazmatycznych prekursorów PG, a jednocześnie inercyjna inaktywacja *vanZ* znosi oporność *E. faecalis* JH2-2 na teikoplaninę [42, 82].

Ponieważ w ostatnim etapie polimeryzacji PG następuje odcięcie C-terminalnej reszty zmodyfikowanego prekursora, ostateczna struktura „dojrzałego” PG powinna pozostawać nie zmieniona. Tak jest w istocie. Badania struktury mureiny wankomycyno-opornych szczepów *E. faecium* (oporność typu B), *E. faecalis* oraz *L. monocytogenes* hodowanych bez wankomycyny wskazują, że reszta kwasu mlekowego nie zostaje wbudowana do sakulusa [20, 63, 83, Markiewicz, dane nie publikowane]. Mureina szczepów opornych charakteryzuje się, w przeciwieństwie do mureiny szczepów wrażliwych, całkowitym brakiem pentapeptydowych łańcuchów bocznych.

IV-I.II. Wankomycyno-oporność klasy B

Szczepy *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* należące do tej klasy fenotypowej wykazują indukowaną oporność na różne stężenia wankomycyny w dość szerokich granicach [84], (Tab. 1) ale, w przeciwieństwie do enterokoków klasy VanA, są wrażliwe na teikoplaninę [42, 85]. Mechanizm tolerancji na penicylinę (i inne antybiotyki β -laktamowe) przejawianej przez te szczepy jest dotąd niejasny. Nie jest on jednak, jak ostatnio stwierdzono, związany ani z niższym poziomem sekrecji enzymów autolitycznych, ani z ich obniżoną aktywnością enzymatyczną [41].

Dane dotyczące częstości występowania szczepów klasy B mogą być obarczone błędem metody identyfikacji i przez to zaniżane, gdyż niezbyt dogodna jest stosowana do ich wykrycia metoda dyfuzyjno-krążkowa. Antybiotyki glikopeptydowe słabo dyfundują w agarze i dlatego nasączone nimi krążki antybiotykowe dają z reguły małe strefy zahamowania wzrostu. Szczepy wykazujące wysoki (MIC \geq 256 μ g/ml) poziom oporności mogą być identyfikowane tą metodą, ale inne — mogą być błędnie zaklasyfikowane pod względem poziomu Vm^R, a przez to zaliczone do niewłaściwej grupy fenotypowej. Dodatkowe różnice mogą wynikać ze stosowania innego, niż zalecane przez NCCLS, podłoża, wielkości inokulum i czasu inkubacji [39].

Mimo różnic w wartościach MIC wankomycyny dla poszczególnych szczepów z tej grupy, zalicza się je do jednej klasy fenotypowej na podstawie zdolności hybrydyzacji sondy *vanB* do ich totalnego DNA [84] niezależnie od ich poziomu oporności na ten antybiotyk.

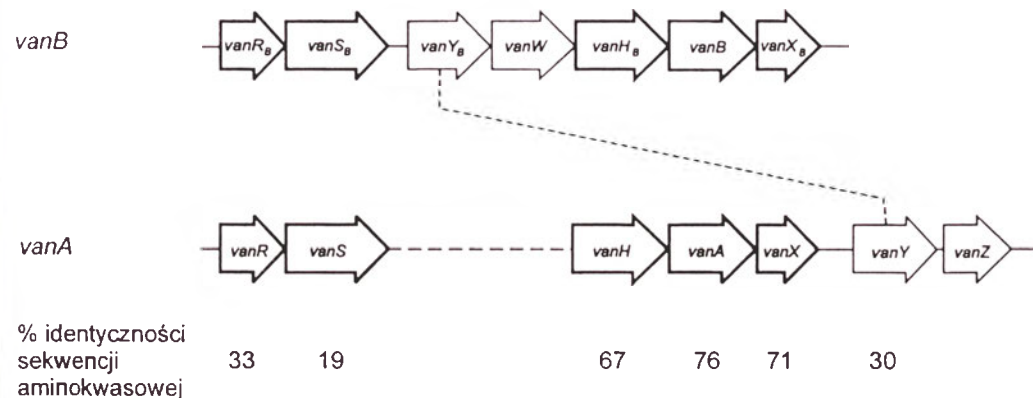
W przeciwieństwie do grupy genów *vanA*, kodowanych przez transpozon Tn1546 lub jemu podobne, geny grupy *vanB* przynależą do dużych (90-250 kb) elementów koniugacyjnych, które mogą się znajdować na chromosomie bakteryjnym lub na plazmidach [85, 86]. Ponieważ homologia pomiędzy genomami *E. faecium* i *E. faecalis* wynosi zaledwie 20-30%, najprawdopodobniej proces rozprzestrzeniania się genów grupy *vanB* zachodzi przez rekombinację nieuprawnioną [86]. Wydaje się obecnie, że może on być wynikiem dwóch mechanizmów [49]:

- translokacji dużych elementów chromosomalnych z genomu do genomu, co prowadzi do przekazywania wankomycyno-oporności pomiędzy różnymi szczepami bakteryjnymi
- transpozycji genów oporności na wankomycynę z replikonu do replikonu w obrębie tego samego szczepu, jako części transpozonów złożonych znajdujących się wewnątrz elementów koniugacyjnych.

Na odcinku DNA wielkości 7,160 bp, w chromosomie *E. faecalis* V583, zidentyfikowano siedem otwartych ramek odczytu, a kodowane przez nie geny, przez analogię do skupiska genów *vanA*, nazwano: *vanR_B*, *vanS_B*, *vanY_B*, *vanW*, *vanH_B*, *vanB* i *vanX_B* [84] (Ryc. 5). Podobnie jak w przypadku grupy genów *vanA*, efektem działania grupy genów *vanB* jest syntetyzowanie przez komórki Vm^R prekursorów peptydoglikanu w postaci UDP-MurNAc-pentadepsypeptydów, zakończonych resztami kwasu mlekowego [17, 88]. Sekwencje aminokwasowe genów *vanH_B*, *vanB* i *vanX_B* wykazują znaczny stopień podobieństwa do sekwencji genów operonu *vanHAX* — odpowiednio 67%, 76% i 71% [38, 39], podobna jest także ich aktywność katalityczna [85, 88].

Jak wynika z analizy sekwencji aminokwasowych, białko VanX_B jest przypuszczalnie D,D-dipeptydazą, a VanH_B — dehydrogenazą, ale charakterystyka biochemiczna funkcji tych białek nie została dotychczas przeprowadzona [42].

Gen *vanB* koduje ligazę o specyficzności substratowej podobnej do specyficzności VanA. Oczyszczone białko VanB syntetyzuje D-Ala-D-Ala z aktywnością katalityczną zbliżoną do efektywności VanA. Podobnie jak VanA syntetyzuje mieszane dipeptydy z D-Ala i innych aminokwasów hydrofobowych: D-feniloalaniny, D-metioniny, D-waliny, D-norleucyny i D-izoleucyny, ale wartości K_m VanB są dla nich 2-5 razy wyższe w porównaniu z VanA. Syntetyzuje też depeptydy preferując substraty z dłuższym łańcuchem bocznym — kwas D-2-hydroksymasłowy, D-2-hydroksywalerianowy i D-mlekowy, ale jego aktywność katalityczna wobec tych substratów jest 5-35 razy niższa w porównaniu do aktywności VanA. *In vivo* VanB, podobnie jak dla VanA, syntetyzuje D-alanylo-D-mleczan [85].



Ryc. 5. Porównanie zespołu genów *vanA* z Tn1546 i *vanB* z *E. faecalis* V583. Kolejne strzałki oznaczają sekwencje kodujące. Linia gęsto przerywana pokazuje różnicę w położeniu genu *vanY* wobec genów *vanH*, *A*, *X*.

Znacznie mniejsze podobieństwo sekwencji aminokwasowej wykazują białka VanS i VanS_B oraz VanR i VanR_B — odpowiednio 23 i 34% podobieństwa. Jednak oba te białka są pod względem struktury podobne do białek tworzących dwuskładnikowe systemy regulatorowe. VanS_B ma w C-terminalnej części swojej sekwencji pięć grup aminokwasów charakterystycznych dla modułów „transmisyjnych” kinaz histydynowych, a także charakterystyczną resztę His, odpowiadającą ich miejscom autofosforylacji [88]. Zawartość i układ aminokwasów hydrofobowych w sekwencji VanS_B, podobny do tego, jaki występuje w sekwencji VanS i białka EnvZ (sensorowego białka w błonie cytoplazmatycznej *Escherichia coli*, które wraz z białkiem OmpR uczestniczy w regulacji syntezy poryn OmpF i OmpC w błonie zewnętrznej) sugeruje podobne umiejscowienie tych białek w błonie cytoplazmatycznej. VanR_B natomiast wykazuje w N-terminalnej części swojej sekwencji aminokwasowej podobieństwo do domen „odbiorników” regulatorów odpowiedzi. Zawiera ono także, charakterystyczną dla tych białek, resztę Asp. Podobieństwo struktury tych białek sugeruje, że mogą one działać jak system regulacji transkrypcji podobny do systemu EnvZ-OmpR [75]. Aktywacja transkrypcji genów grupy *vanB* wydaje się być związana z funkcjonalną aktywacją kinazy histydynowej VanS_B przez wankomycynę, prowadzącą do fosforylacji i aktywacji regulatora odpowiedzi VanR_B. Induktorem tego procesu (sygnałem aktywującym) nie jest jednak, w przeciwieństwie do układu VanS-VanR, teikoplanina, a jedynie wankomycyna [88].

Sekwencje aminokwasowe białek VanY_B i YanY wykazują jedynie 30% podobieństwa, ale oba te białka są D,D-karboksypeptydazami indukowanymi obecnością wankomycyny w podłożu hodowlanym i leżącymi w błonie cytoplazmatycznej. Aktywność katalityczna obu tych białek nie jest hamowana przez antybiotyki β-laktamowe. Nie wykazano żadnego znaczącego podobieństwa pomiędzy VanY_B a innymi karboksypeptydazami [88].

Funkcja białka VanW pozostaje natomiast nieznaną, a jego sekwencja aminokwasowa nie wykazuje znaczącego podobieństwa do sekwencji żadnego ze znanych białek.

Mimo dużych podobieństw genów z grup *vanA* i *vanB* (wysoki stopień podobieństwa struktury i funkcji białek, podobny sposób regulacji transkrypcji) nie można jednak zapomnieć o różnicach:

- w każdej z tych grup genów istnieją takie, które nie mają wzajemnie swych odpowiedników (*vanZ* i *vanW*) co może nasuwać przypuszczenie, że wankomycyna nie indukuje syntezy białek „dodatkowych” (ang. *accessory proteins*), które odpowiadają, być może, za oporność na teikoplaninę [42]
- geny *vanY* i *vanY_B* znajdują się w różnych miejscach w stosunku do pozostałych genów wankomycyno-oporności (Ryc. 5)

- choć obie grupy genów występują w obrębie transpozonów [43, 48], to jednak są one strukturalnie i funkcjonalnie różne.

Niższy poziom oporności na wankomycynę szczepów klasy *vanB*, w stosunku do szczepów klasy *vanA*, może być związany z niższym poziomem syntezy białek kodowanych przez geny grupy *vanB* lub ich niższą aktywnością katalityczną w porównaniu z białkami kodowanymi przez geny grupy *vanA*.

Natomiast ich wrażliwość na teikoplaninę może być wynikiem specyfiki systemu regulującego ekspresję genów grupy *vanB*, gdyż w ich przypadku teikoplanina nie jest induktorem tego systemu. W przeciwieństwie do szczepów klasy *vanA*, u których aktywność VanX i jednoczesna obecność w komórce obu typów prekursorów PG (pentapeptydowych i pentadepsypeptydowych) jest wykrywalna nawet przy braku indukcji, w komórkach nieindukowanych szczepów klasy *vanB* nie wykryto znaczącego poziomu D,D-dipeptydazy. Wydaje się więc, że ekspresja wankomycyno-oporności typu *vanB* podlega ściślejszej kontroli niż ekspresja wankomycyno-oporności typu *vanA* [88].

IV-I.III. Wankomycyno-oporność klasy C

Determinanty wankomycyno-oporności typu *vanC* znajdują się na chromosomie szczepów z gatunków ruchliwych enterokoków: *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus flavescens* i *Enterococcus gallinarum* [89]. Wykazują one niski poziom naturalnej oporności na wankomycynę (Tab. 1), ale są wrażliwe na teikoplaninę [44, 50, 90]. Zdarzają się przypadki kolonizacji przewodu pokarmowego przez te szczepy, lecz kliniczne przypadki infekcji wywoływanych przez nie są nadzwyczaj rzadkie i stanowią zaledwie < 1% infekcji enterokokowych [38, 90].

Szczepy tej klasy wankomycyno-oporności syntetyzują w stosunku 3:1 dwa rodzaje prekursorów PG: prekursor zakończony D-alanylo-D-seryną [17, 71, 88] i prekursor naturalny, zakończony D-alanylo-D-alaniną [71].

W komórkach *E. gallinarum* wykryto dwa geny kodujące białka podobne pod względem struktury aminokwasowej do ligaz D-Ala-D-Ala [17, 89]. Jeden z nich, nazwany *vanC-1*, sklonowano i zsekwencjonowano [89]. Gen ten nie jest przekazywany i znajduje się w wysoce konserwowanych regionach chromosomów wszystkich zbadanych szczepów *E. gallinarum*. Jego przewidywana sekwencja aminokwasowa wykazuje nieznaczny stopień podobieństwa do ligaz VanA (29%) i nieco większy do sekwencji ligaz Ddl z *E. coli* (38%) [64]; nie znaleziono go dotychczas u innych gatunków enterokoków poza *E. gallinarum*. Oprócz *vanC-1*, w komórkach *E. gallinarum* wykryto też aktywności D,D-dipeptydazy [70] i D,D-karboksypeptydazy zlokalizowane w cytoplazmie i nie hamowane przez penicylinę. Współdziałanie wszystkich tych enzymów zapobiega syntezie normalnych prekursorów

sorów PG i syntezę prekursorów o obniżonym powinowactwie do wankomycyny, zakończonych D-Ala-D-Ser [39]. Inercyjna inaktywacja *vanC-1* w szczepie *E. gallinarum* BM4174 (szczep wyizolowany z materiału klinicznego, naturalnie odporny na niskie stężenie wankomycyny) powoduje zanik aktywności D,D-dipeptydazy i D,D-karboksypeptydazy w cytoplazmie, syntezę prekursorów PG zakończonych D-Ala-D-Ala i ośmiokrotne obniżenie MIC wankomycyny [39, 71]. Na tej podstawie można wnioskować, że transkrypcja genów kodujących D,D-dipeptydazę i D,D-karboksypeptydazę jest w jakiś sposób związana z transkrypcją genu *vanC-1* chociaż pozycje genów kodujących te dwa białka w stosunku do pozycji *vanC-1* nie zostały ustalone [39]. Sugeruje to również istnienie w komórkach tego szczepu drugiej, chromosomalnie kodowanej ligazy, syntetyzującej normalne, nie zmienione prekursory PG. We frakcji osłon komórkowych znaleziono też drugą, penicylino-wrażliwą D,D-karboksypeptydazę, która być może należy do białek PBP.

Wankomycyno-oporność w szczepach *E. gallinarum* może być wyrażana zarówno indukcyjnie, jak i konstytutywnie (zależnie od szczepu) [90, 91], co nasuwa przypuszczenie, że regulacja tego zjawiska może być różna w różnych szczepach. W przypadku konstytutywnego wyrażania się tej cechy ekspresja, z definicji, nie zależy od obecności antybiotyku w środowisku, elementy systemu regulatorowego mogą więc być inne niż system sensor-regulator (VanS-VanR) zidentyfikowany w szczepach klasy VanA. Szczepy, które są konstytutywnie odporne na wankomycynę mają taki sam czas trwania fazy logarytmicznego wzrostu niezależnie od tego, czy są hodowane w podłożu zawierającym ten antybiotyk, czy też nie. Natomiast faza logarytmicznego wzrostu hodowli szczepów, u których oporność na wankomycynę jest indukowana, jest o 3-4 godziny dłuższa gdy hodowla jest prowadzona w obecności tego antybiotyku, w porównaniu do hodowli prowadzonej bez wankomycyny [92]. Podobne wyniki otrzymano dla badanych szczepów *E. casseliflavus*, których krzywe wzrostu dowodzą, że również w przypadku tych szczepów oporność na wankomycynę może być indukowana [92].

W przeciwieństwie do wankomycyno-opornych szczepów klasy VanA i VanB, w prekursorach PG syntetyzowanych przez enterokoki klasy VanC nie zachodzi zamiana pentapeptydów na pentadepsyptetydy, co byłoby równoznaczne z zamianą wiązania peptydowego na estrowe i powodowałoby w efekcie drastyczne obniżenie powinowactwa wankomycyny do prekursorów PG. Zamiana reszty D-alaninowej na D-serynową w komórkach tych bakterii nie zmienia więc także liczby wiązań wodorowych tworzonych między cząsteczką wankomycyny a zmienionym prekursorem PG, jednak siła tego oddziaływania jest inna. Powinowactwo cząsteczki wankomycyny do celu jej oddziaływania jest największe gdy grupą R terminalnej

reszty aminokwasowej prekursora PG jest grupa metylowa [73], natomiast obecność grupy hydroksymetylowej w reszcie terminalnej seryny powoduje sześciokrotne obniżenie tego powinowactwa w porównaniu do szczepów Vm^s, co w konsekwencji wyjaśnia wyższe MIC tego antybiotyku [69]. Nie powoduje to jednak znaczących zmian w powinowactwie do teikoplaniny.

Nie znamy jak dotąd biochemicznych podstaw wyrażania fenotypu VanC przez *E. casseliflavus* i *E. flavescens*. W szczepach tych zidentyfikowano jedynie dwa geny, nazwane odpowiednio *vanC-2* i *vanC-3*, wykazujące ok. 98% identyczności nukleotydowej, jednak między nimi i między *vanC-1* z *E. gallinarum* nie zachodzi krzyżowa hybrydyzacja [18].

Również w komórkach *E. casseliflavus* znaleziono dwa geny kodujące ligazy, *ddl_{E.cass}* i *vanC-2*, których przewidywana sekwencja aminokwasowa jest podobna do sekwencji ligaz Ddl gramujemnych bakterii jelitowych [18].

IV-I-IV. Wankomycyno-oporność klasy D

Jedyny dotychczas opisany szczep enterokoka zaklasyfikowanego do klasy D charakteryzuje się konstytutywną opornością na stosunkowo wysokie stężenia wankomycyny (MIC 64 µg/ml) oraz na niskie stężenia teikoplaniny (MIC 4 µg/ml).

IV-II. Gronkowce i paciorkowce

Odkrycie wankomycyny było wynikiem prowadzonego w latach 50-tych programu poszukiwań nowych antybiotyków skutecznych wobec pojawiających się wtedy coraz częściej klinicznych szczepów *S. aureus* opornych na erytromycynę, tetracyklinę i penicylinę. Wobec pojawiających się w latach 80-tych licznych szczepów enterokoków opornych na wankomycynę, powszechna była i jest obawa przed pojawieniem się Vm^R szczepów gronkowców, wobec których antybiotyki glikopeptydowe są lekami najskuteczniejszymi [44]. Szczepy takie, jak wspomniano we wstępie, jednak się pojawiły.

Nie sposób ich zaliczyć do jakiegokolwiek wspólnej klasy fenotypowej, gdyż poszczególne izolacje wykazują albo oporność jedynie na wankomycynę, albo tylko na teikoplaninę, albo na oba te antybiotyki jednocześnie. Znane są również przypadki korelacji między opornością na wankomycynę a opornością na antybiotyki β-laktamowe [23]. Jakkolwiek wczesne szczepy *S. aureus* izolowane ze środowiska szpitalnego wykazywały jedynie oporność na teikoplaninę [39], to jednak *in vitro* (przez selekcję mutantów opornych na wankomycynę lub przez koniugacyjny transfer genów kodujących oporność na wankomycynę z enterokoków) otrzymano już Vm^R szczepy tego gatunku [5, 26].

Z obserwacji w mikroskopie elektronowym wynika, że komórki Vm^R szczepów gronkowców mają, w stosunku do komórek szczepów Vm^s, pogrubioną i niere-

gularną ścianę komórkową [22]. Nie wiadomo jednak czy jest to skutkiem, czy też przyczyną wykazywania przez nie wankomycyno-oporności. Są one również bardziej wrażliwe na lizę lizozymem, a w ich frakcji osłon komórkowych znajdują się dwa nowe rodzaje białek o masie 35 i 39 kDa, mają także podwyższony poziom białek wiążących penicylinę PBP-1 i PBP-2, a czasem również PBP-3 i PBP-4 [86]. Białko o masie 39 kDa, a więc takiej samej jak masa VanA, nie wykazuje jednak podobieństwa sekwencji aminokwasowej do sekwencji VanA. Skład aminokwasowy i stopień usieciowania mureiny komórek szczepów opornych na teikoplaninę nie różni się od cech PG komórek szczepów teikoplanino-wrażliwych [23], a w komórkach szczepu *Staphylococcus haemolyticus* opornego na antybiotyki glikopeptydowe stwierdzono, że tylko 1,7% prekursorów PG jest zakończonych resztą D-Lac [20]. Usieciowanie mureiny u jednych mutantów Vm^R *S. aureus* jest zwiększone, u innych — zmniejszone [23]. Stwierdzono również zwiększony wzrost liczby nie-amidowanych muropetydów w mureinie szczepów Vm^R *S. aureus* [24]. W mostkach peptydowych mureiny szczepów opornych część reszt glicyny zastąpiona jest przez serynę. Zmniejszonej amidacji zawsze towarzyszy zmniejszony stopień usieciowania mureiny [44]. Tak więc białka 35 kDa i 39 kDa nie wydają się być ligazami D-Ala: D-Ala o rozszerzonej specyficzności substratowej. Ostatnio jednak w genomie Vm^R szczepu *S. aureus* udało się zidentyfikować gen *ddh*, kodujący białko Ddh (37 kDa), którego przewidywana sekwencja aminokwasowa wykazuje do 40% identyczności i do 61% podobieństwa z sekwencjami białek należących do rodziny dehydrogenaz D-2-hydroksykwosów, a więc tej samej, do której należą także VanH i enzymy D-LDH z *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Jest to białko cytoplazmatyczne, ale jego charakterystyka biochemiczna nie została dotychczas przeprowadzona.

Pierwsze doniesienie o wyizolowaniu z materiału klinicznego wankomycyno-opornego szczepu z rodzaju *Streptococcus* pochodzi z 1997 r. Jest to szczep *S. bovis* wykazujący niski (MIC 64 µg/ml) poziom oporności na wankomycynę i wrażliwy na teikoplaninę (MIC 1 µg/ml), a oporność na oba te antybiotyki jest indukowana przez wankomycynę. Za pomocą PCR (amplikacja fragmentu *vanB*) wykryto gen wykazujący 96% identyczności z częścią sekwencji aminokwasowej *vanB* z *E. faecalis* V583 [87].

IV-III. Inne bakterie gram-dodatnie

Wśród bakterii kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* naturalna oporność na wysoki poziom zarówno wankomycyny, jak i teikoplaniny, występuje dość często. Znane są przypadki bakteriemii wywołanej przez wankomycyno-oporne szczepy z rodzajów *Leuconostoc* i *Lactobacillus* [9, 11], ale trudno jak dotąd określić nasilenie tego

zjawiska. Ekspresja cechy oporności na wankomycynę jest konstytutywna [17, 93], a dotychczasowe dane wskazują na obecność w komórkach tych szczepów tylko jednego rodzaju ligazy D-alanylo:D-alaninowej [17, 91, 93].

Porównanie sekwencji aminokwasowej ligaz D-Ala: D-Ala tych szczepów nie wykazuje znaczącego podobieństwa do sekwencji VanA lub VanB (zaledwie 26% i 32% homologii), a sondy *vanA* i *vanB* nie hybrydują z DNA tych bakterii [86]. Zostało jednak ostatnio dowiedzione, że zamiana tylko jednej reszty aminokwasowej (tyrozyny na fenyloalaninę) w sekwencji ligazy D-Ala: D-Ala (Ddl) z *Leuconostoc mesenteroides* powoduje, że zmutowany enzym nabywa zdolności do wykorzystywania jako substratu zarówno D-Ala, jak i D-Lac, podobnie jak to się dzieje w przypadku zmutowanego białka Ddl z *E. coli* [65].

Wankomycyno-oporne szczepy z gatunków *Lactobacillus casei* i *Pediococcus pentosaceus* syntetyzują prekursorzy PG zakończone resztami D-Lac. Natomiast w komórkach badanego szczepu *Leuconostoc mesenteroides* nie wykryto tego typu prekursorów. Nie wykryto też prekursorów zakończonych D-alanylo-D-alaniną. Stwierdzono, że prekursorzy mureiny tego szczepu stanowią urydylo-disacharydo-heksadepsyptydy (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys-(L-Ala)-D-Ala-D-Lac [93].

W chromosomie naturalnie odpornej na wankomycynę bakterii *B. popilliae* występuje sekwencja DNA o blisko 70% identyczności ze znanymi sekwencjami genów *vanA* i *vanB* [27]. Z kolei w DNA klonów szczepów Vm^R *B. circulans* izolowanych z materiału klinicznego stwierdzono występowanie zespołu genów warunkujących oporność typu VanA [28].

V. Perspektywy

Wankomycyna jest dziś jedynym skutecznym lekiem w przypadku wielu schorzeń powodowanych przez gronkowce, paciorkowce i inne bakterie gram-dodatnie. Niestety, szeroko rozprzestrzeniona oporność na ten antybiotyk wśród enterokoków, łatwość z jaką oporność typu VanA przekazywana jest przez enterokoki do takich bakterii jak *S. aureus* czy *L. monocytogenes*, obecność determinant oporności wśród bakterii mlekowych oraz bakterii z rodzajów *Leuconostoc* i *Pediococcus* powoduje, że wiele specjalistów mówi o początku końca ery antybiotyków. Pojawiły się też pierwsze doniesienia o wankomycyno-zależności wśród enterokoków [94]. Opisano przypadki, w których długotrwałe podawanie wankomycyny doprowadziło do gwałtownego rozwoju bakteriemii spowodowanej wankomycyno-zależnym enterokokiem [95]. Mechanizm wankomycyno-zależności wydaje się polegać na zmianie w genie kodującym ligazę D-alanylo:D-alaninową [96]. W każdym razie zjawisko wankomycyno-zależności wskazuje na możliwość daleko idących zmian adaptacyjnych u bakterii w obec-

ności presji antybiotykowej. Wankomycyna jest dziś stosowana bardzo powszechnie. Wydatki na wankomycynę stanowią do 15% budżetu na wszystkie leki w wielu szpitalach w Stanach Zjednoczonych. Tak powszechne stosowanie tego antybiotyku stwarza z jego strony presję, w wyniku której należy się spodziewać dalszego, gwałtownego narastania oporności [97]. Niedawno opisano przypadek, pacjenta który otrzymując wankomycynę w celu zwalczania zakażenia metycylino-opornym gronkowcem złocistym zmarł w wyniku rozwoju listeriozy mającej postać bakteriemii. Izolowany szczep *L. monocytogenes* wykazywał *in vitro* jedynie nieznacznie zmniejszoną podatność na wankomycynę [98].

Sytuacja jest o tyle groźna, że w ostatnich dziesięciu latach pojawił się tylko jeden całkowicie nowy typ antybiotyku, Synercid, będący mieszaniną dwóch streptogramin [4]. Jest on wciąż w fazie prób klinicznych. Jest też kilka zmodyfikowanych antybiotyków β -laktamowych, często stosowanych w połączeniu z inhibitorami β -laktamaz (np. piperacylina + tazobaktam) oraz nowych antybiotyków fluorochinolowych. Wiąże się też nadzieje z ewerninomycynami, znanymi od 1964 r., które jednak w obecnej strukturze charakteryzują się wysoką nefrotoksycznością [99]. Nowych klas antybiotyków na horyzoncie nie widać, tym bardziej, że według danych ASM, połowa firm farmaceutycznych w USA zaprzestała, bądź planuje zaprzestanie finansowania badań nad nowymi lekami przeciwbakteryjnymi. Wprowadzenie nowego antybiotyku na rynek wymaga średnio około 12 lat badań oraz nakładów w wysokości ponad 300 milionów dolarów. Ten nakład czasu i pieniędzy może w krótkim czasie być zniweczony przez zmianę pojedynczego nukleotydu w genie bakteryjnym lub wymianę materiału genetycznego pomiędzy różnymi bakteriami.

Do rozwoju oporności na antybiotyki glikopeptydowe, tak jak w przypadku innych antybiotyków, przyczynia się przede wszystkim ich niekontrolowane przepisywanie i stosowanie, jak również dodawanie do paszy dla zwierząt. Już obecnie amerykański komitet HICPAC przy CDC w Atlancie zaleca ich przepisywanie jedynie w szczególnie uzasadnionych przypadkach. W przypadku oporności na wankomycynę, połączonej z opornością na inne antybiotyki, np. β -laktamowe, zaleca się sięganie po kombinacje innych antybiotyków (np. aminoglikozydowe + fluorochinolowe) lub wręcz po antybiotyki będące jeszcze w trakcie testowania (np. wspomniane wyżej streptograminy) [4]. Największe nadzieje wiąże się jednak z półsyntetycznymi antybiotykami glikopeptydowymi nowej generacji.

Zaobserwowano, że podstawienie aminocukru wankomycyny łańcuchami lipofilowymi znacznie zwiększa aktywność antybiotyku wobec opornych enterokoków. Z kolei *p*-chlorobenzylowa pochodna wankomycyny, ulegając dimeryzacji, wiąże na powierzchni błony cytoplazmatycznej równocześnie dwie reszty D-Ala-

-D-Lac. Ponadto, hydrofobowy łańcuch boczny tej pochodnej nadaje jej korzystną właściwość kotwiczenia się na powierzchni błony. Należy tylko mieć nadzieję, że bakterie nie „znajdą” sposobu i na te zmodyfikowane pochodne wankomycyny.

Pozostaje jeszcze jedna możliwość, o której myśli się coraz częściej — szczepionki przeciw wszystkim głównym gramdodatnim patogenom.

Artykuł otrzymano 26 października 1998 r.
Zaakceptowano do druku 7 stycznia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Lessard IA, Pratt SD, McCafferty DG, Bussiere DE, Hutchins C, Wanner BL, Katz L (1998) *Chem Biol* 5: 489-504
2. Tabaqchali S (1997) *Lancet* 350: 1644-1645
3. Markiewicz Z, Tomasz A (1989) *J Clin Microbiol* 27: 405-410
4. Cross TJ (1996) *Ped Infect Dis* 6: 5-8
5. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I (1997) *Lancet* 350: 1670-1673
6. Moellering RC (1991) *J Antimicrob Chemother* 28: 1-12
7. Harrison JW, Svec TA (1998) *Quintessence Int* 29: 151-162
8. Parenti F, Beretta M, Berti M, Arioli RV (1989) *J Antibiot* 31: 276-281
9. Swenson JM, Facklam RR, Thornsberry C (1990) *Antimicrob Agents Chemother* 34: 543-549
10. Walsh CT (1993) *Science* 261: 308-309
11. Green M, Wadowsky R, Barbadora K (1990) *J Clin Microbiol* 28: 484-488
12. Uliasz AT, Grenader A, Weiblum B (1996) *J Bacteriol* 178: 6305-6309
13. Edmond MB, Ober JF, Dawson JD, Weinbaum DK, Wenzel RP (1996) *Clin Infect Dis* 23: 1234-1239
14. Brennen C, Wegener M, Muder R (1998) *J Am Geriatr Soc* 46: 157-180
15. McNeeley C, Brow AE, Noel G, Chung M, De Lancaster H (1998) *Pediatr Infect Dis J* 17: 184-188
16. Marchese A, Debbia E, Bacca D, Balistreri G, Musolino B, Schito G (1997) *Drugs* 54, S6: 11-20
17. Billot-Klein D, Gutmann L, Sable S, Guittet E, van Heijenoort J (1994) *J Bacteriol* 176: 2398-2405
18. Navarro F, Courvalin P (1994) *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1788-1793
19. Rosato A, Pierre J, Billot-Klein D, Buu-Hoi A, Gutmann L (1995) *Antimicrob Agents Chemother* 39: 830-833
20. Billot-Klein D, Gutmann L, Bryant D, Bell D, van Heijenoort, Grewal J, Schlaes DM (1996) *J Bacteriol* 178: 4696-4703
21. Noble WC, Virani Z, Cree RG (1992) *FEMS Microbiol Lett* 72: 195-198
22. Sieradzki K, Tomasz A (1996) *FEMS Microbiol Lett* 142: 161-166
23. Moreira B, Boyle-Vavra S, de Jonge B, Daum R (1997) *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1788-1793
24. Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Hiramatsu K J (1998) *Jpn J Antibiot* 51: 272-280
25. M M W R (1997) *Morb Mortal Wkly Rep* 46: 624-626
26. Sieradzki K, Villari P, Tomasz A (1998) *Antimicrob Agents Chemother* 42: 100-107
27. Rippere K, Patel R, Uhl J (1998) *J Infect Dis* 178: 585-588
28. Ligozzi M, Cascio G, Fontana R (1998) *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2055-2059
29. Biavasco F, Giovanetti E, Miele A, Vignaroli C, Facinelli BI, Varaldo PE (1996) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 50-59
30. Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P (1989) *Antimicrob Agents Chemother* 33: 10-15

31. Mundy L (1998) *Am J Clin Pathol* **109**: 367-370
32. Pittet D, Tarar D, Wenzel R (1994) *JAMA* **20**: 1598-1601
33. Barna J C J, Williams D H (1984) *Annu Rev Microbiol* **38**: 339-357
34. Parenti F (1986) *J Hospital Inf* **7**, suppl. A: 79-83
35. Markiewicz Z (1993) *Struktura i Funkcje Osłon Bakteryjnych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
36. Kohlrausch U, Höltje J-V (1991) *FEMS Microbiol Lett* **78**: 253-258
37. Arthur M, Depardieu F, Snaith M, Reynolds P, Courvalin P (1994) *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 1899-1903
38. Schlaes D M, Rice L B (1994) *Trends Microbiol* **2**: 385-388
39. Woodford N, Johnson A P, Morrison D, Speller D C E (1995) *Clin Microbiol Rev* **8**: 585-615
40. Arthur M, Reynolds P E, Depardieu F, Evers S, Dutka-Malen S, Quintiliani R, Courvalin P (1996) *J Infection* **32**: 11-16
41. Gutmann L, Al-Obeid S, Billot-Klein D, Ebnet E, Fischer W (1996) *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 257-259
42. Arthur M, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P (1996) *Mol Microbiol* **21**: 33-44
43. Poyart C, Pierre C, Quesne G, Pron B, Berche P, Trieu-Cuot P (1997) *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 24-29
44. Hakenbeck R (1994) W: Ghuysen M, Hakenbeck R (red) *Bacterial Cell Wall*. Elsevier Science B. V., Amsterdam, Holandia, str. 535-546
45. Brisson-Noel A S, Dutka-Malen S, Molinas R, Leclercq R, Courvalin P (1990) *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 924-927
46. Schlaes D M, Bouvet A, Devine C, Shlaes J H, Al-Obeid S, Williamson R (1989) *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 198-203
47. Al-Obeid S, Billot-Klein D, van Heijenoort J, Collatz E, Gutmann L (1992) *FEMS Microbiol Lett* **91**: 79-84
48. Al-Obeid S, Collatz E, Gutmann L (1990) *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 252-256
49. Evers S, Quintilliani R, Courvalin P (1995) *Microb Drug Resist* **2**: 219-223
50. Arthur M, Courvalin P (1993) *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 1563-1571
51. Holman T R, Wu Z, Wanner B L, Walsh C (1994) *Biochemistry* **33**: 4625-4631
52. Bug T D H, Wright G, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh C (1991) *Biochemistry* **30**: 10408-10415
53. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P (1996) *Trends Microbiol* **4**: 402-407
54. Marshall C G, Broadhead G, Leskiw B K, Wright G D (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6480-6483
55. Webb V, Davies J (1993) *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 2379-2384
56. Bugg T D H, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh C (1991) *Biochemistry* **30**: 2017-2021
57. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P (1988) *N Engl J Med* **3**: 9: 157-161
58. Uttley A H, Collins C H, Naidoo J, George R C (1988) *Lancet* **349**: 57-58
59. Walsh C T, Fisher S L, Park I-S, Prahald M, Wu Z (1996) *Chem Biol* **3**: 21-28
60. Uttley A H, George R C, Naidoo J, Woodford N, Johnson A P, Collins C H, Morrison D, Gilfillan A, Heptonstall J (1989) *Epidem Inf* **103**: 173-181
61. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P (1993) *J Bacteriol* **175**: 117-127
62. Arthur M, Molinas C, Bugg T D H, Wright G D, Walsh C T, Courvalin P (1992) *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 867-869
63. Van Heijenoort J (1994) W: Ghuysen M, Hakenbeck R (red) *Bacterial Cell Wall*. Elsevier Science B. V., Amsterdam, Holandia, str. 39-54
64. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P (1990) *Mol Gen Genet* **224**: 364-372
65. Park I-S, Seon, Lin Chun-Hung, Walsh C T (1996) *Biochemistry* **35**: 10464-10471
66. Allen N E, Arthur M, Molinas C, Courvalin P (1992) *J Bacteriol* **174**: 2582-2591
67. Arthur M, Molinas C, Dutka-Malen S, Courvalin P (1991) *Gene* **103**: 133-134
68. Wu Z, Wright G D, Walsh C (1995) *Biochemistry* **34**: 2455-2463
69. Messer J, Reynolds P E (1992) *FEMS Microbiol Lett* **94**: 195-200
70. Reynolds P E, Depardieu F, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P (1994) *Mol Microbiol* **13**: 1065-1070
71. Reynolds P E, Snaith H A, Maguire A J, Dutka-Malen S, Courvalin P (1994) *J Biochem* **301**: 5-8
72. Reynolds P E (1998) *Cell Mol Life Sci* **54**: 325-331
73. Busiere D, Pratt S, Katz L, Severin J, Holzman T, Park C H (1998) *Mol Cell* **2**: 75-84
74. Arthur M, Molinas C, Courvalin P (1992) *Gene* **120**: 111-114
75. Gutmann L, Billot-Klein D, Al-Obeid S, Klare J, Francoual S, Collatz E, van Heijenoort J (1992) *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 77-80
76. Wright G D, Molinas C, Arthur M, Courvalin P, Walsh C (1992) *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1514-1518
77. Handwerker S (1994) *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 473-475
78. Mackinnon M G, Grebot M A, Tyrrell G J (1997) *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1805-1807
79. Bourret R B, Borkovich K A, Simon M I (1991) *Annu Rev Biochem* **60**: 401-441
80. Wanner B L (1992) *J Bacteriol* **174**: 2053-2058
81. Arthur M, Depardieu F, Gerbaud G, Galimand M, Leclercq R, Courvalin P (1997) *J Bacteriol* **179**: 97-106
82. Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P (1995) *Gene* **154**: 87-92
83. de Jonge B L M, Gage D, Handwerker S (1996) *Microb Drug Res* **2**: 225-229
84. Quintiliani R, Evers S, Courvalin P (1993) *J Infect Dis* **167**: 1220-1223
85. Evers S, Courvalin P (1996) *J Bacteriol* **178**: 1302-1309
86. Quintiliani R, Courvalin P (1994) *FEMS Microbiol Lett* **119**: 359-364
87. Quintiliani R, Courvalin P (1996) *Gene* **172**: 1-8
88. Evers S, Reynolds P E, Courvalin P (1994) *Gene* **140**: 97-102
89. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P (1992) *Gene* **112**: 52-58
90. Vincent S, Minkler P, Binczewski B, Etter L, Shlaes D M (1992) *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1392-1399
91. Sahn D F, Free L, Handwerker S (1995) *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1480-1484
92. Green M, Barbadora K, Michaels M (1991) *J Clin Microbiol* **29**: 2503-2506
93. Handwerker S, Pucci M J, Volk K J, Liu J (1994) *J Bacteriol* **176**: 260-264
94. Stewart B, Hall L, Duke B, Ball D (1997) *J Antimicrob Chemother* **41**: 734-735
95. Allen N E, Hobbs J N (1995) *FEMS Microbiol Lett* **132**: 107-114
96. Sifaoui R, Gutman L (1997) *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1409-1414
97. Levy S B (1998) *Science* **279**: 46-53
98. Arsene O, Linossier C, Quentin R, Legras A, Colombat P (1996) *Scand J Infect Dis* **28**: 415-416
99. Nicas T, Wu C Y E, Hobbs J N Jr, Preston D A, Allen N E (1989) *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 1121-1124

Bakulowirusy — specyficzne wirusy owadzie. Budowa, infekcyjność i wykorzystanie w ekspresji obcych genów

Baculoviruses — insect specific viruses. Structure, infectivity and heterologous genes expression system

JOANNA MICHALIK¹,
EWA SZOŁAJSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa bakulowirusa
 - II-1. Infekcja w organizmie owada
 - II-1.1. Fazy pierwotna i wtórna
 - II-1.2. Proces infekcji w owadach liniach komórkowych i wektory ekspresyjne
- III. Organizacja, regulacja i funkcjonowanie genomu bakulowirusa
 - III-1. Mapa genomu i obszary ORFs
 - III-2. Geny wpływające na replikację DNA
 - III-3. Geny związane z wytwarzaniem otoczki i geny kodujące białka strukturalne wirionu
 - III-4. Geny „niekoniecznie potrzebne”
- IV. Oddziaływanie wirus—gospodarz
 - IV-1. Wpływ wirusa na ekspresję genów gospodarza
 - IV-2. Czynniki determinujące krąg nosicieli bakulowirusa

Contents:

- I. Introduction
- II. Baculovirus structure
 - II-1. Progress of infection in the insects
 - II-1.1. Primary and secondary phases
 - II-1.2. Infection in insect cell lines and expression vectors
- III. Genome organization, regulation and function
 - III-1. Physical map and ORFs
 - III-2. Genes related to DNA replication
 - III-3. Occlusion related genes and those coding for virion structural proteins
 - III-4. Nonessential genes
- IV. Virus-host interactions
 - IV-1. Virus effects on host gene expression
 - IV-2. Baculovirus host range

Wykaz stosowanych skrótów: hr — *homologous region*, rejon homologiczny; ORFs — otwarte ramki odczytu; lef — późne czynniki ekspresyjne; pe — *protein envelope*, białko otoczki; AcMNPV — wirus poliedrozy jądrowej larw sówki.

I. Wstęp

Bakulowirusy z rodziny *Baculoviridae* są dużą rodziną wirusów patogennych występujących u stawonogów. Infekują sporadycznie skorupiaki, głównie jednak owady przede wszystkim z rzędów *Lepidoptera*, *Diptera* i *Hymenoptera*. Nieznani są nosiciele wirusa spoza grupy stawonogów. Przedrostek baculo- oznacza charakterystyczny, pałeczkowaty kształt kapsydu wirusa. Wewnątrz kapsydu DNA w połączeniu z niewielkim zasadowym białkiem bogatym w argininę, zwanym białkiem p6.9, tworzy rdzeń (*core*). Wirion bakulowirusa pokryty jest zwykle grubą warstwą krystalicznego białka, syntetyzowanego w jądrze komórkowym gospodarza [1, 2].

Wirusowe ciała wtrętowe tworzone są na terenie jądra komórkowego i powlekają wirion grubą warstwą krystalicznego białka, tworząc poliedry [3, 4]. Wirusy

z rodziny *Reoviridae* (wirusy poliedrozy cytoplazmatycznej) tworzą podobne ciała wtrętowe w cytoplazmie zakażonych komórek owadów. Poliedry otacza błona zewnętrzna, bogata w glikoproteiny i liczne grupy tiolowe, łączące tę błonę z białkiem otoczki. Błona zewnętrzna zwiększa znacznie stabilność poliedru.

Poza najpowszechniej występującymi wirusami poliedrozy jądrowej istnieją również powleczone otoczką białkową wirusy granulocyty. W przeciwieństwie do pierwszej grupy wirusów, charakteryzujących się tworzeniem dużych ciał wtrętowych, wirusy granulocyty wytwarzają niewielkie ciała wtrętowe zawierające pojedynczy wirion. Otoczka zbudowana jest z białka zwanego granulacją. Należy wspomnieć, że istnieje również nieliczna grupa wirusów nie wytwarzających zewnętrznej białkowej warstwy ochronnej.

Duże zainteresowanie bakulowirusami wynika z potencjalnych możliwości wykorzystania ich jako specyficznych i bezpiecznych insektycydów, a także jako wektorów do wprowadzania i ekspresji obcych genów [5]. Należy podkreślić, iż produkty białkowe, uzyskane w systemie bakulowirusa *in vitro* poddawane są modyfikacjom potranslacyjnym, charakterystycznym dla komórek eukariotycznych. Materiałem genetycznym bakulowirusów jest dwuniciowy, kolista DNA pokazanych rozmiarów od 80 do 200 tysięcy par zasad,

¹ Dr hab., ² dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Instytut Biologii, WSP, ul. Konopnickiej 15, 25-406 Kielce

charakterystyczny dla konkretnego wirusa. Pierwszym zbadanym i całkowicie zsekwencjonowanym genomem bakulowirusowym był genom bakulowirusa poliedrozy jądrowej sówki *Autographa californica* — *Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus* (MNPV) wielkości 134 tysięcy par zasad, zawierający około 150 genów [6]. Ostatnio ustalono pełną sekwencję genomu drugiego bakulowirusa poliedrozy jądrowej o zbliżonej wielkości z *Orgyia pseudotsugata* [7].

II. Budowa bakulowirusa

II-1. Infekcja w organizmie owada

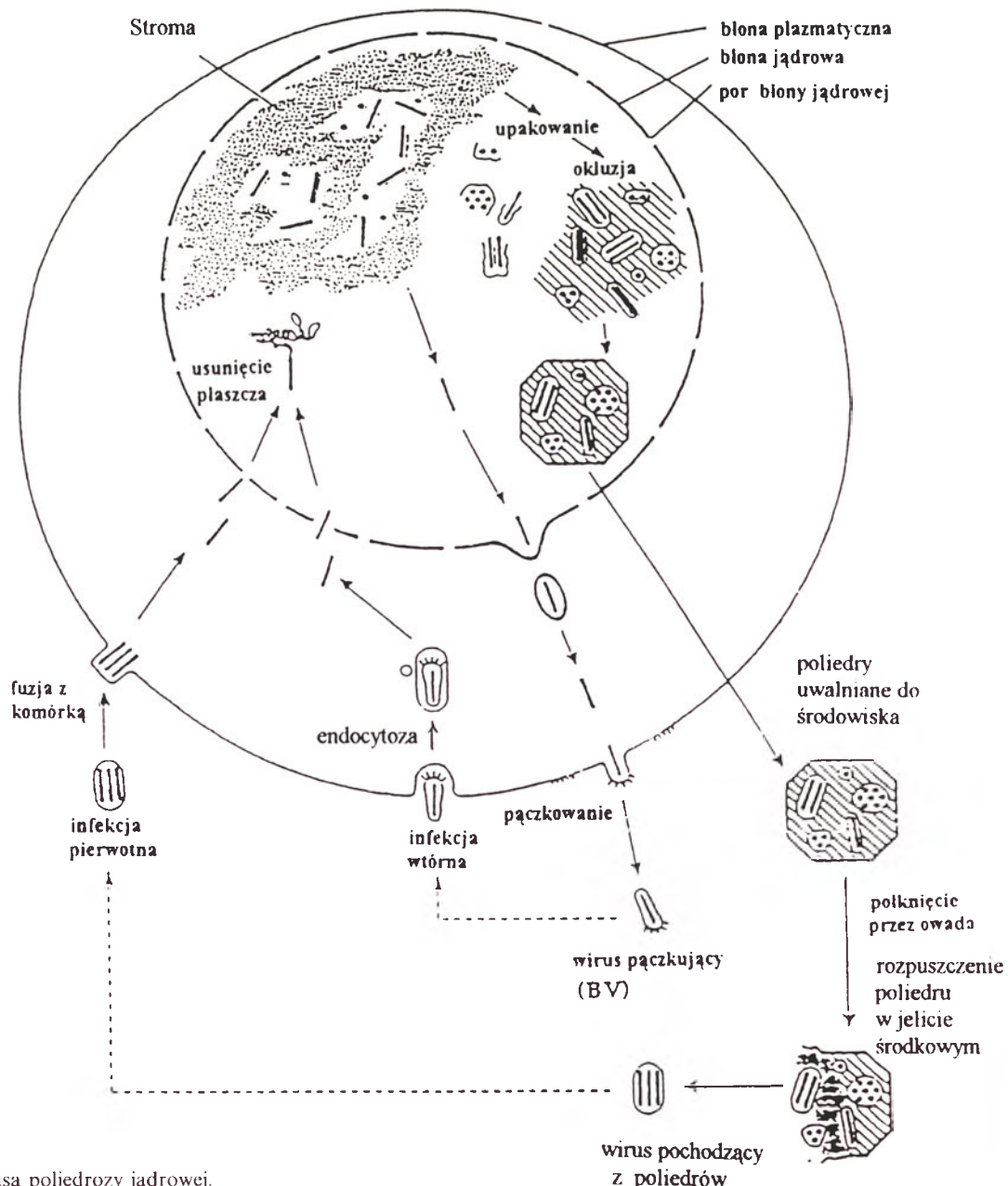
II-1.1. Fazy pierwotna i wtórna

Naturalny cykl infekcji gąsienic owada odbywa się wg schematu przedstawionego na rycinie 1. Poliedry zjedzone wraz z pożywieniem przez owada ulegają

rozpuszczeniu w alkalicznym środowisku jelita środkowego uwalniając wiriony, które z kolei przedostając się do jąder komórek epitelialnych wyścielających jelito zakażają je. Dochodzi tam wkrótce do wytworzenia formy pączkującej bakulowirusa (BV). Wirus ten posiada zdolność rozprzestrzenienia się w różnych tkankach owada takich jak hemocyty, komórki ciała tłuszczowego, mięśnie i nerwy [8, 9]. Nawet podczas zmasowanej infekcji wirusowej gąsienica owada długo żeruje a wewnątrz jej ciała może być podłożem dla dziesięciu kolejnych pokoleń wirusa. Około 25% suchej masy owada stanowią mogą poliedry.

II-1.2. Proces infekcji w owadach liniach komórkowych i niektóre wektory ekspresyjne

Bakulowirusy mogą być wykorzystywane jako wektory ekspresyjne. Gen poliedryny nie jest konieczny do replikacji DNA wirusa w owadach liniach komór-

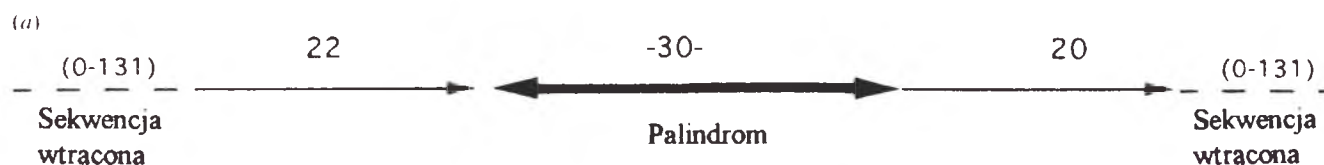


Ryc. 1. Cykl infekcyjny wirusa poliedrozy jądrowej.

kowych. Dlatego konstruując bakulowirusowy system ekspresyjny, gen poliedryny zastąpić można genem heterologicznym pod kontrolą wydajnego promotora poliedryny [10]. Dodatkową zaletą takiej konstrukcji jest otrzymanie rekombinanta łatwego do odróżnienia od formy dzikiej. Innym powszechnie stosowanym promotorem jest promotor dla genu p10 syntetyzowanego z dużą wydajnością w bardzo późnej fazie rozwoju bakulowirusa. Uzyskany rekombinant zachowuje zdolność syntezy ochronnej otoczki białkowej [11, 12]. W zakażeniu linii komórkowych wyróżniamy 3 fazy: wczesną, późną i bardzo późną. W fazie wczesnej zachodzi intensywna transkrypcja przy udziale polimerazy II komórek gospodarza, wirusowych transaktywatorów i sekwencji wzmacniających (enhancerów), umożliwiających rozpoczęcie replikacji wirusowego DNA. W fazie późnej następuje intensywna synteza DNA, ekspresja genów późnych i tworzenie cząstek wirusowych [13].

III. Organizacja, regulacja i funkcjonowanie genomu bakulowirusa

III-1. Mapa genomu i obszary ORF



(b)

	-22	-30-	+20
<i>hr3-1</i>	TTTG-TAATCAAATTCAACTC	P	ATGATCAAGGGATGATGTCA
<i>hr3-2</i>	TTTGTTTTGAAACTAACTC	P	ATAATCAAGAGATGATGTCA
<i>hr3-3</i>	TTTGTTTTCAAACATAACTC	P	ATAATCAAGAGATGATGTCA
<i>hr3-4</i>	TTTGTTTTTAAACTAAACTT	P	ATAATCAAGAAATGATGTCA
<i>hr3-5</i>	TTTGTTTTT-AACTGAACAT	P	ACAATCAAGAAATGATGTCA
<i>hr3-6</i>	TTTGTTTTTCAAACCGAACTC	P	ACGATTAGTGGATGATGTCA
<i>hr3-7</i>	TTTGTTTTTCAAACATAACTC	P	ACGATCAATTATTAGTCATA
<i>hr2-2</i>	TTTGTTTTTCAAACATAACTG	P	ATGATCAAGGGATGATGTCA
<i>hr2-3</i>	TTTGTTTTTCAAACCGAACTC	P	ATAATCGAAAGATGATGTCA
<i>hr2-4</i>	TTTGTTTTTAAATTTAACTG	P	ACAATCGAGAGATGATGTCA
<i>hr2-5</i>	TTTGTTTTTCAAACATAACTC	P	ACGCCAAGGGATGATGTCA
<i>hr2-6</i>	TTTGTTTTTCAAACATAACTC	P	ACAATCAAGCGATGATGTCA
<i>hr2-7</i>	TTTGTTTTTCAAACATAACTC	P	ACAATCAAGGGATGATGTCA
<i>hr1-4</i>	TTTG-TTTTTCAAACATAACTC	P	ACAATCAGGGATGATGTCA
<i>hr1-5</i>	TTTGTTTTTCAAACATAACTC	P	ACAATCGAGGGATAATGTCA
<i>hr4b-2</i>	TTGTTTTTTAAATTTCAACTC	P	ACAATCGAGGGATGATGTCA
<i>hr4b-3</i>	TTTGTTTTTCAAACCGAACTC	P	AAGATCGGTGGATGATGTCA
<i>hr5-1</i>	TTTGTTTTTAAATTTGAA-CTG	P	ACAATCAAGTAT--GAGTCA
<i>hr5-4</i>	TTTGTTTTTCAAACCGAACTT	P	ACAATCAAAAAGATGATGTCA
<i>hr5-5</i>	TTTGTTTTTCAAACATAACTC	P	ACAATCAAGAAATGATGTCA
consensus TTTGTTTTTCAAACATAACTC P ACAATCAAGGGATGATGTCA			

Ryc. 2. Regiony homologiczne w genomie bakulowirusa *Autographa californica* wg Koola i wsp. [17].

a) Schemat budowy obszaru homologicznego. 30 par zasad niedoskonałego palindromu otacza sekwencja 22 i 20 par zasad. Także sekwencje zbudowane z 72 par zasad tworzą tandemowe powtórzenia, oddzielone różnej długości fragmentami DNA od 0 do 131 par zasad.

b) Zgodność 20 najbardziej zakonserwowanych sekwencji otaczających palindrom w rejonach homologicznych.

Regiony homologiczne w AcMNPV (hrs) zidentyfikowane po raz pierwszy przez Chana i Faulknera (1983) opisano dokładniej w 1992 i latach następnych [14-16]. Zawierają one sekwencje palindromowe z miejscem restrykcyjnym EcoRI w centralnej części każdego palindromu [17]. W genomie AcMNPV występuje osiem takich regionów na terenie genomu a ich wielkość waha się od 0.2 do 1.0 tysięcy par zasad a każdy z nich zawiera wielokrotnie powtarzane (od dwóch do ośmiu razy), zbudowane z 30 par zasad niedoskonałe palindromy. Palindromy mają cechy wspólne jak np. sekwencję rdzenia długości 10-12 par zasad z 2 obszarami niezgodności w nukleotydzie 4 lub 5 i 10 lub 11 od miejsca restrykcyjnego EcoRI. Są one oddzielone 83-34 nukleotydami. Funkcjonują one jako enhancery wczesnych genów podczas transkrypcji i są punktami startu replikacji DNA [18-21].

Geny bakulowirusa ulegają ekspresji w kaskadowej transkrypcji, w której każdy następny etap uzależniony jest od ekspresji genów etapu poprzedniego. Geny należące do grupy genów wczesnych ulegają transkrypcji przy udziale polimerazy II komórek gospodarza [22] natomiast geny „późne” transkrybowane

są przez specyficzną dla wirusa polimerazę RNA z unikalnym składem podjednostek, odporną na α -amanitynę [23] inicjującą transkrypcję od 5' nukleotydowego elementu późnego promotora tj. sekwencji A/G/T TAAG [24]. Ekspresja późnych genów zależy od replikacji wirusowego DNA i nie zachodzi, gdy replikacja jest zahamowana [25, 26].

W genomie AcMNPV zidentyfikowano 18 genów późnych czynników ekspresji (lefs) niezbędnych do podtrzymania optymalnego poziomu ekspresji regulowanej późnym promotorem (*vp39*) [27, 28]. Część z tych genów jest zaangażowana w replikację DNA, która jest niezbędnym warunkiem dla ekspresji późnych genów [29]. Pozostałe geny prawdopodobnie biorą udział w rozpoznawaniu późnych promotorów lub stabilizacji późnych transkryptów. *Lef-8* i *Lef-10* biorą bezpośredni udział w transkrypcji jako podjednostki polimerazy RNA [30].

Po uruchomieniu replikacji DNA większość późnych genów jest transkrybowana lecz poziom ich ekspresji zmniejsza się z czasem. Jedynie ekspresja genu poliedryny kodującego główne białko powlekające wirion zachodzi z bardzo wysoką wydajnością w fazie bardzo późnej po infekcji. Również gen kodujący niewielkie białko p10 biorące udział w tworzeniu otoczki i lizie komórki ulega ekspresji z bardzo dużą wydajnością w późnej i bardzo późnej fazie po infekcji [3, 31]. Uzyskane dane dotyczące replikacji bakulowirusowego DNA pozwalają zidentyfikować sekwencje DNA umożliwiające replikację plazmidom w transfekowanych bakulowirusem owadziach liniach komórkowych. Od tych sekwencji najprawdopodobniej rozpoczyna się replikacja DNA. Opracowano również metodę pozwalającą identyfikować geny bakulowirusa biorące udział w replikacji DNA [17].

Miejsca startu replikacji bakulowirusa po raz pierw-

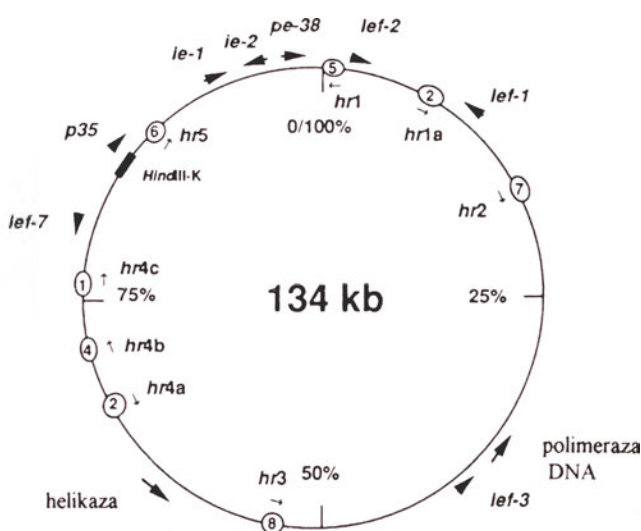
szy zidentyfikował Blinov w 1983 r. Następnie określono analogiczne regiony u wirusów *Autographa californica* (AcMNPV) i *Anagrapha falcijera* (CfMNPV) umożliwiające plazmidom replikację w układach eukariotycznych *in vitro* [32]. Obecnie stosuje się dwie strategie identyfikacji startu replikacji bakulowirusa: pierwsza — użycie wirusa z poważnymi delecjami w genomie ale posiadającego sekwencje aktywujące potrzebne do replikacji DNA i druga — oparta na badaniu zdolności sklonowanych sekwencji DNA do replikacji DNA bakulowirusa w zainfekowanych komórkach owadziach [33]. Genomy niepełne (*defective genomes*) powstają przy wielokrotnym pasażowaniu AcMNPV w komórkach *S. frugiperda*. Analiza DNA tych mutantów wykazała, że pierwsze delecje w genomie występują między pasażem dziesiątym i piętnastym. Dalsze pasażowanie rozszerzało delecje do prawie 50% genomu. Była to prawdopodobnie granica umożliwiająca zachowanie sekwencji niezbędnych w procesie replikacji, pakowania i zakażania [17].

III-2. Geny wpływające na replikację DNA

Stosując test przejściowej replikacji zidentyfikowano 6 genów niezbędnych i 3 geny stymulujące zaangażowane w replikację DNA. Geny niezbędne kodują następujące białka: DNA polimerazę i helikazę których funkcje przewiduje się na podstawie homologii sekwencji LEF-3, białko wiążące jednoniciowy DNA [34]; IE-1, aktywator transkrypcji wiążący się z miejscami startu replikacji; LEF-1 zawierające motyw prymaryzy i tworzące z nim oligomery LEF-2. Warunkiem replikacji jest udział obu połączonych ze sobą białek [35]. Produkty genów stymulujących replikację to: dwa transkryptory transkrypcji *ie-1*, *ie-2* oraz *pe-38* biorące udział w ekspresji genów wczesnych, pełniąc w replikacji DNA pośrednią rolę; *IE-2* i *PE38* oraz *P35*, odpowiedzialne za blokowanie apoptozy [36].

III-3. Geny związane z wytwarzaniem otoczki i geny kodujące białka strukturalne

Poliedry z zatopionymi w nich wirionami składają się z poliedryny i białka osłonki. Geny specyficcznie zaangażowane w wytwarzanie formy okluzyjnej to *polh*, *fp25*, *clx* i *p10*. W genomie znajduje się jedna kopia genu *polh* kodującego białko wielkości 29 kD, stanowiącego 95% poliedru i ponad 18% puli białek komórkowych. *Polh* jest najbardziej zakonserwowanym genem a jego sekwencja u bakulowirusów infekujących *Lepidoptera* jest w ponad 80% identyczna. Poliedry otacza osłonka zbudowana z węglowodanów, z którą związane jest białko PE [13] produkt genu *clx*. Białko to jest ufosforylowane i może łączyć się wiązaniami tiolowymi z glikoproteinami stanowiącymi dominujący składnik osłonki. Drugim genem ulegającym hyperekspresji w późnej fazie po infekcji jest *p10*.



Ryc. 3. Lokalizacja genów początku replikacji oraz obszarów homologicznych (hrs) w genomie bakulowirusa *Autographa californica*. Cyfry wskazują ilość powtórzeń w każdym obszarze homologicznym. Duże i małe strzałki pokazują kierunek ułożenia (orientację) genów a małe — obszary homologiczne (hrs). Na podstawie zmodyfikowanych danych Ayresa [6].

Produkt tego genu tworzy włókniste struktury widoczne w jądrach i cytoplazmie zainfekowanych komórek. Badania mutantów delecyjnych wykazały, że P10 jest zaangażowane w jądrową dezintegrację i morfogenezę poliedrów.

Porównanie sekwencji genu *p10* dziesięciu różnych bakulowirusów wykazuje niski stopień homologii przewidywanych sekwencji aminokwasowych. Natomiast istnieje duże podobieństwo struktur drugorzędowych i specyficznych domen [37].

Wszystkie późne i bardzo późne transkrypty rozpoczynają się od tetranukleotydu TA AG [25]. Motyw ten jest częścią 12 nukleotydowej sekwencji TAAATAAGTAAGTATT, która jest silnie zakonserwowana w genie poliedryny wszystkich bakulowirusów i bardzo zbliżona do startu transkrypcji RNA p10 (TAATAAGAATT). W genomie AcMNPV motyw TAAG znajduje się w odległości 50 i 70 nukleotydów przed miejscem startu translacji poliedryny i p10.

Transkrypcja poliedryny jest aktywowana przez przyłączenie czynników transkrypcyjnych do obszaru promotora wpływających na bardzo wysoki poziom ekspresji w późnej fazie po infekcji [38]. Zidentyfikowano pewne geny AcMNPV zaangażowane w ekspresję z udziałem promotora poliedryny [39, 40] a jedynym poznanym dotychczas czynnikiem bezpośrednio oddziałującym z promotorem jest białko — PPBP [41]. Powstanie kompleksu PPBP z nicią kodującą może utrzymywać obszar promotora w postaci jednociowej po przejściu polimerazy, ułatwiając rozpoczęcie kolejnej rundy transkrypcyjnej. Postulowany mechanizm tłumaczyłby wyjątkową aktywność promotora poliedryny.

Poznane geny kodujące białka wirionu to *vp39*, *cor* i *gp64*. Główne białko kapsydu p39 zawiera osiem cystein, tworzących mostki dwusiarczkowe decydujące o strukturze p39. Bakulowirusy mają duży genom, który ulega kondensacji i upakowaniu w nukleokapsydzie w wyniku połączenia z bogatym w argininę białkiem p6,9. Wysoką zawartością zasadowych aminokwasów białko przypomina protaminy obecne w jądrach plemników, zaangażowane w powstawanie silnie skondensowanego DNA. Główna glikoproteina formy pączkującej wirusa gp64 jest niezbędna do produkcji infekcyjnych wirionów i przenoszenia ich pomiędzy komórkami gospodarza [9, 43, 44].

III-4. Geny „niekoniecznie potrzebne”

Pewne geny AcMNPV są konieczne do replikacji wirusa, podczas gdy obecność innych może być pominięta bez utraty zdolności do jego namnażania. Do grupy znanych obecnie kilkunastu takich genów lub obszarów otwartych ramek odczytu należą np. gen poliedryny, gen białka p10, gen *egt*, kodujący enzym blokujący metamorfozę owadów, *clx* — kodujący białko związane z zewnętrzną osłoną poliedru, *pca* kodujący homolog czynnika podziałów komórko-

wych (*proliferating cell nuclear antigen*) oraz szereg innych [17].

IV. Oddziaływanie wirus — gospodarz

Bakulowirusy mogą wpływać na rozwój zainfekowanego gospodarza owadziego ponieważ genom ich zawiera gen UDP-glukozylotransferazę ekdysteroidów [45]. Enzym ten katalizuje sprzęganie cząsteczki ekdysteroidu z glukozą unieczynniając hormon i blokuje w ten sposób dalszą metamorfozę owada [46, 47].

W procesie infekcji wirusowej ważną rolę odgrywa główne białko otoczki wirusa, glikoproteina gp 64, pośredniczące w penetracji wirusa do wnętrza komórki gospodarza na drodze endocytozy [48]. N-glikozylacja tego białka odgrywa zasadniczą rolę w jego transporcie na powierzchnię komórki, infekcyjność bakulowirusa i jego aktywność fuzjogenna powoduje zahamowanie ekspresji genów gospodarza. Spadek poziomu mRNA rozpoczyna się 12 godzin po infekcji, a po 18 godz. obserwuje się znaczny spadek syntezy białek gospodarza. Po 24 godz. od infekcji następuje wyłącznie ekspresja genów wirusa.

IV-1. Wpływ wirusa na ekspresję genów gospodarza

Apoptoza — programowana śmierć komórki obserwowana powszechnie u kręgowców zostaje zapoczątkowana w owadach komórkowych liniach zainfekowanych bakulowirusem AcMNPV podczas replikacji wirusowego DNA [49]. Produkt wirusowego genu poliedrozy p35 AcMNPV [50], a także gen *iap* poliedrozy OpMNPV i granulozy *Cydia pomonella* CpGV [51] zapobiegają procesowi apoptozy. Mutant bakulowirusa z delecją genu p35 lub modyfikacją tego genu wykazywał większą zjadliwość w procesie uśmiercania różnych linii komórkowych [52]. Odpowiedź komórki gospodarza w postaci apoptozy stanowi zabezpieczenie przed infekcją wirusową na poziomie organizmu a gen *p35* determinuje grupę potencjalnych gospodarzy podczas infekcji bakulowirusem [53]. Apoptoza wyraźnie redukuje tworzenie formy bezotoczkowej wirusa AcMNPV i całkowicie hamuje powstawanie formy otoczkowej w linii komórkowej IPLB-Ld-65z z *Lymantria* [54]. Uważana jest zatem za efektywną obronę komórki gospodarza przed infekcją wirusową. Funkcję białka p35 hamującego kaspazy tłumaczy się jego udziałem w indukowanej przez te enzymy apoptozie. Innym typem genu supresorowego w procesie apoptozy jest inhibitor apoptozy zidentyfikowany w bakulowirusie granulozy (*iap*) [55].

IV-2. Czynniki determinujące krąg nosicieli bakulowirusa

Bakulowirusy mają stosunkowo wąski krąg gospodarzy. Z reguły mogą infekować tylko kilka takso-

nomicznie zbliżonych owadów. Zasady blokowania infekcji wirusem w komórkach ssaków i owadów są inne, chociaż nukleokapsydy BV mogą wnikać na drodze fagocytozy do komórek ssaków, jednak nigdy nie docierają do jądra [56, 57]. Czynnikiem determinującym krąg potencjalnych gospodarzy wirusa wydaje się być zarówno w AcMNPV jak i BmNPV gen helikazy [58-60]. Zidentyfikowano również gen *hrf-1* (*host range factor*) odpowiedzialny za replikację bakulowirusa AcMNPV w niepermissywnych liniach komórkowych [61-63] oraz gen zwiększający infekcyjność wirusa w różnych liniach komórkowych [64]. Nadal jednak mechanizm selektywnego wyboru gospodarza pozostaje intrygującą zagadką.

Podziękowania

Praca dofinansowana z grantu KBN 6 PO4B 011 13.

Artykuł otrzymano 1 grudnia 1998 r.
Zaakceptowano do druku 18 lutego 1999 r.

Piśmiennictwo

- Wood AH, Granados RR (1991) *Annu Rev Microbiol* **45**: 69-87
- Volkman LE (1995) *Science* **269**: 1834
- Gross CH, Russel LQ, Rohrman GF (1994) *J Gen Virol* **75**: 1115-1123
- Gross CH, Rohrman GF (1993) *Virology* **192**: 273-281
- Luckow VA (1995) red. Shuler ML, Wood HA, Granados RR, Hammer DA w *Baculovirus Expression Systems and Biopesticides* 51-90
- Ayres DM, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee DR (1994) *Virology* **202**: 586-605
- Ahrens CH, Russell RL, Funk CJ, Evans JT, Harwood SH, Rohrmann GF (1997) *Virology* **229**: 381-399
- Olszewski J, Miller LK (1997) *Virology* **233**: 292-301
- Monsma SA, Oomens AGP, Blissard GW (1996) *J Virol* **70**: 4607-4616
- Vikram NV, Raina AK, Kingan TG, Kempe TG (1995) *Insect Biochem Molec Biol* **25**: 583-589
- Naggie S, Bentley WF (1998) *Biotechnol Prog* **14**: 227-232
- Chaabihi H, Cetre C, Berne A (1997) *J Virol Methods* **63**: 1-7
- Rohrman GF (1992) *J Gen Virol* **73**: 749-761
- Pearson M, Bjornson R, Pearson G, Rohrmann G (1992) *Science* **257**: 1382-1384
- Pearson MN, Bjornson RM, Ahrens C, Rohrmann GF (1993) *Virology* **197**: 715-725
- Pearson MN, Rohrmann GF (1995) *J Virol* **69**: 213-221
- Kool M, Ahrens CH, Vlak JM, Rohrman GF (1995) *J Gen Virol* **76**: 2103-2118
- Kool M, Voeten JTM, Goldbach RW, Tramper J, Vlak JM (1993) *J Gen Virol* **74**: 2661-2668
- Kool M, Ahrens CH, Goldbach RW, Rohrmann GF, Vlak JM (1994) *Proc Natl Acad Sci* **91**: 11212-11216
- Leisy DJ, Rasmussen C, Kim H-T, Rohrmann GF (1995) *Virology* **208**: 742-752
- Ahrens CH, Carlson C, Rohrman GF (1995) *Virology* **210**: 372-382
- Hoopes Jr. RR, Rohrmann GF (1991) *Proc Natl Acad Sci* **88**: 4513-4517
- Huh NE, Weaver RF (1990) *J Gen Virol* **71**: 195-201
- Beniya H, Funk CJ, Rohrman GF, Weaver RF (1996) *Virology* **245**: 99-109
- Blissard GW, Rohrmann GF (1990) *Annual Review of Entomology* **35**: 127-155
- Passarelli AL, Miller LK (1993) *J Virol* **67**: 2149-2158
- Lu A, Miller LK (1995) *J Virol* **69**: 975-982
- Todd JW, Passarelli AL, Miller LK (1995) *J Virol* **69**: 968-974
- Yang S, Miller LK (1998) *Virology* **245**: 99-109
- Passarelli AL, Todd JW, Miller LK (1994) *J Virol* **68**: 4673-4678
- Van Oers MM, Flipsen JTM, Reusken CBEM, Sliwinsky EL, Goldbach RW, Vlak JM (1993) *J Gen Virol* **74**: 563-574
- Lee HY, Arif B, Dobos P, Krell P (1992) *Virus Research* **24**: 249-264
- Lee HY, Krell PJ (1994) *Virology* **202**: 418-429
- Hang X, Dong W, Guarino LA (1995) *J Virol* **69**: 3924-3928
- Evans JT, Leisy DJ, Rohrman GF (1997) *J Virol* **71**: 3114-3119
- Lu A, Cartens EB (1994) *Virology* **195**: 710-718
- Wilson JA, Hill JE, Kuzio J, Faulkner P (1995) *J Gen Virol* **76**: 2923-2932
- Rasmussen C, Rohrmann GF (1994) *Insect Biochem Molec Biol* **24**: 699-708
- Li Y, Passarelli AL, Miller LM (1993) *J Virol* **67**: 5260-5268
- Passarelli AL, Miller LK (1993) *J Virol* **67**: 3481-3488
- Passarelli AL, Miller LK (1993) *Virology* **197**: 704-714
- Mukherjee B, Burma S, Hasnain SE (1995) *J Biol Chem* **270**: 4405-4411
- Jarvis DL, Garcia A (1994) *Virology* **205**: 300-311
- Monsma SA, Blissard GW (1995) *J Virol* **69**: 2583-2595
- O'Reilly DR (1995) *Insect Biochem Molec Biol* **25**: 541-550
- Toister-Achtuv M, Faktor O (1997) *J Gen Virol* **78**: 487-491
- Shikata M, Shibata H, Sakurai M, Sano Y, Hashimoto Y, Matsumoto T (1998) *J Gen Virol* **79**: 1547-1591
- Horton HM, Burand JP (1993) *Virology* **67**: 1860-1868
- Chejanovsky N, Gernsburg E (1995) *Virology* **209**: 519-526
- Bump NJ, Hackett M, Huginin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferencz C, Franklin S, Ghayur T, Li P, Licari P, Mankovich J, Shi L, Greenberg AH, Miller LK, Wong WW (1995) *Science* **269**: 885-1887
- Clem RJ, Fechtmeier M, Miller LK (1991) *Science* **254**: 1388-1390
- Gershburg E, Rivkin H, Chejanovsky N (1997) *J Virol* **71**: 7593-7599
- Du X, Thiem SM (1997) *J Virol* **71**: 7866-7872
- La Count DJ, Freisen PD (1997) *J Virol* **71**: 1530-1537
- Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK (1994) *J Virol* **68**: 2521-2528
- Shoji I, Aizaki H, Tani H, Ishii K, Chiba T, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y (1997) *J Gen Virol* **78**: 2657-2664
- Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph G, Schlag P, Strauss M (1995) *Proc Natl Acad Sci* **92**: 10099-10103
- Kamita SG, Maeda S (1997) *Gene* **190**: 173-179
- Argaud O, Croizier L, Lopez-Ferber M, Croizier G (1994) *J Gen Virol* **79**: 931-935
- Biteshi DK, Hice RH, Ge B, Federici BA (1998) *J Gen Virol* **79**: 1309-1319
- Chen C-J, Quentin ME, Brennan LA, Kukel C, Thiem SM (1998) *J Virol* **72**: 2526-2531
- Du X, Thiem SM (1997) *Virology* **227**: 420-430
- Thiem SM, Du X, Quentin ME, Berner MM (1996) *J Virol* **70**: 2221-2229
- Bischoff DS, Slavicek JM (1997) *J Virol* **71**: 8133-8140

Redakcja informuje P. T. Autorów o możliwości zamieszczenia w artykułach barwnych rycin. Jednakże wobec wysokich cen ich reprodukcji koszty wykonania ponoszą autorzy.

Bioinsektocydy a mechanizmy obronne owadów

Bioinsecticides and insect defense mechanisms

JACEK BANIA¹,
ANTONI POLANOWSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Czynniki wirulencji
- III. Grzybowe pasożyty owadów
- IV. Rola hydrolaz w mechanizmie wirulencji grzybów
- V. Mechanizmy obronne owadów
 - V-1. Inhibitory proteinaz
 - V-2. Oksydaza fenolowa

Contents:

- I. Introduction
- II. Virulence factors
- III. Fungal parasites of insects
- IV. Function of hydrolases in virulence mechanism of fungi
- V. Insect defence mechanisms
 - V-1. Proteinase inhibitors
 - V-2. Phenol oxidase

Wykaz stosowanych skrótów: BAEeaza — enzym rozkładający ester etylowy N-benzoilo-L-argininy; β GRP — białko rozpoznające β -1,3 glukan; BLEE — ester etylowy N-benzoilo-L-lizyny; BOC-Gln-Ala-Arg-MCA — N-tetrabutoksykarbonylo-L-glutamyl-L-alanylo-L-arginylo-4-metylokumaryna; BPTI — zasadowy trzustkowy inhibitor trypsyny typu Kunitza, DOPA — L-3,4-dihydroksyfenyloalanina; FPI — inhibitory proteinaz grzybowych; HLE — elastaza z ludzkich leukocytów; HLTi — inhibitory trypsyny z hemolimfy *Manduca sexta*; K_a — ogólna równowaga stała asocjacji kompleksu enzym-inhibitor; LMCI — inhibitor chymotrypsyny z *Locusta migratoria*; NaGaza — N-acetylo-glukozaminidaza; NPGP — 4-nitrofenylo-4'-guanidynobenzoan sodu; PGRP — białko rozpoznające peptydoglikan; PPAE — enzym aktywujący prooksydazę fenolową; PPE — elastaza z trzustki wieprzowej; PSTI — trzustkowy wydzielniczy inhibitor trypsyny typu Kazala; SCI — inhibitory chymotrypsyny z hemolimfy *Bombyx mori*; SW-AChy — antychymotrypsyna z hemolimfy *Bombyx mori*; SW-AT — antytrypsyna z hemolimfy *Bombyx mori*; Tos-Arg-Metyl-Ester — ester metylowy.N-4'-tosylo-L-argininy.

I. Wstęp

Owady stanowią grupę organizmów mających znaczny wpływ na gospodarkę człowieka. Są wśród nich szkodniki, organizmy pożyteczne, jak również owady o znaczeniu ekonomicznym. Owady wytworzyły szereg mechanizmów obronnych przeciwko ich naturalnym wrogom: grzybom i bakteriom, często są to mechanizmy swoiste, charakterystyczne tylko dla tej grupy zwierząt. Z kolei organizmy atakujące owady posiadają szereg wyspecjalizowanych przystosowań, realizowanych poprzez syntezę tzw. czynników wirulentnych, które ułatwiają im opanowanie organizmu

owada. Poznanie tych przystosowań, wraz z relacjami zachodzącymi między owadami i ich wrogami ma duże potencjalne znaczenie w gospodarce, gdyż cechy te są często wykorzystywane przez człowieka do opracowywania łagodnych, proekologicznych metod walki ze szkodnikami upraw roślinnych, lasów, produktów paszowych, czy wobec przenosicieli chorób inwazyjnych. Zastępowanie pestycydów, chemicznych środków owadobójczych, środkami biologicznymi, zwanymi biopestycydami wymuszone jest zarówno względami ekonomicznymi jak i zdrowotnymi. Biopestycydy, to zróżnicowana grupa preparatów, w których czynnikami aktywnymi są bądź żywe organizmy, najczęściej mikroorganizmy, bądź syntetyzowane przez nie biodegradowalne, organiczne związki chemiczne, wykazujące działanie toksyczne wobec szkodników.

II. Czynniki wirulencji

Od dziesiątków lat najpowszechniej wykorzystywanymi mikroorganizmami do produkcji biopestycydów są różne szczepy *Bacillus thuringiensis*. Ta gram dodatnia bakteria wytwarza kilka substancji toksycznych zwanych α , β , γ i δ , różniących się zarówno budową chemiczną, jak i właściwościami biologicznymi [1]. Z uwagi na specyficzność i skuteczność działania największą uwagę poświęcono delta endotoksynom. Jest to duża grupa parakrystalicznych białek o charakterze protoksyn, które powstają w czasie sporulacji na zewnątrz egzosporium jako ciała parasporalne, wtętowe. Mechanizm działania toksycznego tych białek jest podobny. Krysztaly po dostaniu się *per os* do jelita owada rozpuszczają się, a następnie w wyniku ograniczonej proteolizy ulegają aktywacji. Zmieniona konformacyjnie cząsteczka toksyny reaguje ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek

¹ Dr, ² prof. dr hab., Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

szczoteczki gospodarza [2]. Wskutek działania toksyny powstają zaburzenia w selektywnej przepuszczalności kationów przez błonę lipidową, w rezultacie następuje pęcznienie komórki i jej liza. Obecnie użycie preparatów zawierających spory i kryształki deltatoxyny, mimo ich specyficzności i zaledwie kilkudniowej trwałości w środowisku, jest wciąż stosunkowo małe. Pewnym ograniczeniem w stosowaniu połowym delta endotoxyny jest jej podatność na fotodegradację wynikającą z łatwości oksydacji wolnymi rodnikami reszt aminokwasów aromatycznych, szczególnie tryptofanu [3].

W licznej grupie mikroorganizmów będących w przyrodzie naturalnymi regulatorami populacji owadów w różnych ekosystemach, istotną rolę odgrywają bakulowirusy. Wirusy te, jako patogeny *Lepidoptera*, dzięki swej specyficzności, stanowią wyjątkowe źródło bioinsektycydów. Bakulowirusy jako jedyna grupa bezpiecznych dla środowiska wirusów została dopuszczona przez Światową Organizację Zdrowia do wykorzystania w kontroli populacji owadzich szkodników. Praktyczne wykorzystanie bakulowirusów jako środków kontroli ogranicza stosunkowo wolne ich działanie, gdyż owadobójcze efekty pojawiają się dopiero po 5-10 dniach od chwili zastosowania. Bakulowirusy stosuje się jako preparaty wirusa szczepu dzikiego lub jako rekombinanty, zawierające w genomie dodatkową sekwencję kodującą toksyny, enzymy lub neuropeptydy zaburzające podstawowe procesy fizjologiczne owada. Rekombinanty charakteryzują się zwykle wyższą skutecznością i szybszym działaniem niż szczepy dzikie [4, 5].

III. Grzybowe pasożyty owadów

W walce ze szkodliwymi owadami zaawansowane są również badania nad wykorzystaniem pasożytniczych grzybów. Badania te zaowocowały produkcją insektycydów zawierających zarodniki lub ciała strzępkowe takich grzybów jak *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* i *Hirsutella thompsonii* [6]. Opracowano wiele preparatów do zwalczania owadów opartych na grzybie *Verticillium lecanii* (Mycotal, Vertalec). Preparat oparty na *Beauveria brongniartii* jest stosowany w Szwajcarii do zwalczania pędzaków *Melolontha melolontha*. W Japonii stosuje się preparat Asper G zawierający *Aspergillus sp.* do zwalczania kornika *Bursaphelenchus lignicolus*. Preparat BIO 1020, oparty na szczepie grzyba *Metarhizium anisopliae* jest stosowany przeciw ryjkowcowi *Otiorynchus sulcatus*.

Istnieje również nowa strategia opracowywania mykoinsektycydów polegająca na wprowadzaniu zmian w genach entomopatogena wywołujących nadekspresję toksycznej proteinazy. Celem podniesienia poziomu proteinazy jest zwiększenie szybkości likwidacji owada przez entomopatogena. Dokonano tego w przypadku *Metarhizium anisopliae*, wstawiając w je-

go genom dodatkowe kopie genu kodującego proteinazę PR-1. W wyniku manipulacji genetycznej proteinaza ta jest konstytutywnie nadprodukowana po wnikięciu strzępek grzyba do hemolimfy *Manduca sexta* (szkodnika tytoniu), owada atakowanego przez *Metarhizium*. Wniknięcie grzyba i nadprodukcja proteinazy wywołują aktywację systemu oksydazy fenolowej i śmierć owada. Stwierdzono, że zarażenie transgenicznym grzybem powoduje skrócenie czasu śmierci owada o 25% i redukcję konsumpcji pożywienia o ok. 40%, w porównaniu ze szczepem dzikim. Zaobserwowano również, że zarażone owady szybko pokrywały się pigmentem, co powodowało słabą sporulację grzyba, a w rezultacie redukcję puli transgenicznego grzyba w środowisku [7]. Mimo wysokiej skuteczności preparaty zawierające żywe kultury grzybowe cechuje niewielka wybiórczość. Ponadto, wykazano, że preparaty te wywołują przypadkowe grzybice u zwierząt gospodarskich i ludzi, więc technika polegająca na spryskiwaniu preparatami zawierającymi żywe komórki grzybów budzi poważne zastrzeżenia. Alternatywna strategia to izolacja toksyn z grzybów owadobójczych i opracowanie na ich podstawie insektycydów bezpiecznych dla otoczenia i działających selektywnie.

IV. Rola hydrolaz w mechanizmie wirulencji grzybów

Grzyby pasożytnicze wnikają do wnętrza owada przebijając zewnętrzne powłoki ciała gospodarza. Oskórek owadów zbudowany jest z fibrylii chitynowych zanurzonych w białkowym matrix. Rodzaj białek tworzących matrix oraz ich ilość jest zmienna i zależy od gatunku owada, tkanki oraz stadium rozwojowego. Ogólnie białka stanowią od 55 do 80% wszystkich składników oskórki. Wiele białek oskórki tworzy z fibryllami chitynowymi trwałe połączenia. Badania ultrastrukturalne wykazały, że w penetracji grzyba przez oskórek odgrywa rolę zarówno mechaniczne parcie strzępek jak i degradacja jego składników przez zewnątrzkomórkowe hydrolazy wydzielane przez entomopatogena. To ostatnie wydaje się posiadać decydujące znaczenie w tym procesie. W związku z koniecznością pokonywania barier o zróżnicowanym składzie i strukturze grzyby pasożytnicze wydzielają zespół hydrolaz: chitynazy, proteinazy i lipazy [8]. Rolę hydrolaz w mechanizmie wirulencji pasożytów grzybowych opisano szczegółowo w pracy M. K o ł a c z - k o w s k i e j i w s p. [9].

V. Mechanizmy obronne owadów

System obronny owadów różni się od systemu immunologicznego znanego u kręgowców. Nie posiadają one pamięci immunologicznej, nie mają immunoglobulin, reagują tylko na kilka antygenów powszechnie występujących na powierzchni ciała ich naturalnych wrogów (β -1,3 glukan, lipopolisacharyd) [10, 11].

Układ odpornościowy owadów opiera się o trzy, ściśle ze sobą powiązane, mechanizmy. Pierwszym z nich jest indukcja kaskady enzymów proteolitycznych będąca odpowiedzią na zakażenie mikroorganizmami, bądź wywołaną zranieniem owada. Są to kaskady krzepnięcia hemolimfy i aktywacji oksydazy fenolowej. Drugim z mechanizmów jest reakcja odpowiedzi komórkowej, polegająca na fagocytozie, np. przez hemocyty oraz opłaszczaniu niepożądanych, obcych ciał (nodulacja, inkapsulacja). Trzeci sposób obrony wytworzony przez owady to produkcja peptydów antybakteryjnych i antygrzybowych, wydzielanych do hemolimfy (cecropiny, attacyny). Cecha ta jest cha-

rakterystyczna dla owadów stojących wyżej w ewolucji [12].

V-1. Inhibitory proteinaz

Hemolimfa owadów, podobnie jak osocze krwi kręgowców zawiera inhibitory enzymów proteolitycznych. Uważa się, że wiele z ich fizjologicznych funkcji w organizmie owada pokrywa się z tymi, które opisano w przypadku kręgowców. [13, 14]. Jednakże owady charakteryzują się kilkoma swoistymi procesami, nie występującymi u kręgowców jak np. przeobrażenie czy obecność systemu oksydazy fenolowej. Procesy te są

Tabela 1.

Inhibitory proteinaz serynowych z hemolimfy owadów [15].

Hamowane enzymy	Źródło pochodzenia	Masa cząsteczkowa [kDa]	Centrum reaktywne	Charakterystyka	Nazwa inhibitora	Rodzina inhibitorów	Odnosińnik
Chymotrypsyna	<i>Manduca sexta</i>	48.0	—	skład a-a, sekw. N-końca	—	Serpiny	39
Chymotrypsyna	<i>Manduca sexta</i>	47.0	—	skład a-a, sekw. N-końca	—	Serpiny	39
Trypsyna	<i>Manduca sexta</i>	46.0	—	skład a-a, sekw. N-końca	—	Serpiny	39
Elastaza trzustkowa	<i>Manduca sexta</i>	47.0	Ala-Ser	sekw. cDNA	Ala-serpina	Serpiny	39, 40
Trypsyna	<i>Bombyx mori</i>	41.8	Lys-Val	sekw. cDNA	SW-AT	Serpiny	38, 41
Chymotrypsyna	<i>Bombyx mori</i>	43.0	Thr-Ser	sekw. cDNA	SW-Achy I	Serpiny	39, 42, 43
Chymotrypsyna	<i>Bombyx mori</i>	41.0	Phe-Met	sekwencja	SW-Achy II	Serpiny	44
Trypsyna	<i>Manduca sexta</i>	8.3	Arg-Ala	skład a-a, sekw. N-końca	HLTI A	BPTI	34
Chymotrypsyna, plazmina, PPAE	<i>Manduca sexta</i>	9.1	Arg-Ala	skład a-a, sekw. N-końca	HLTI B	BPTI	34
Chymotrypsyna	<i>Bombyx mori</i>	7.0	Phe-Ala	sekwencja	SCI-I	BPTI	45, 46
Chymotrypsyna	<i>Bombyx mori</i>	7.3	Phe-Ala	sekwencja	SCI-II	BPTL	45, 46
Chymotrypsyna	<i>Bombyx mori</i>	7.2	Phe-Gly	sekwencja	SCI-III	BPTI	45, 47
Chymotrypsyna, plazmina, trypsyna, trombina, PPAE	<i>Sarcophaga bullata</i>	6.4		sekwencja	—	BPTI	48, 49
Chymotrypsyna	<i>Locusta migratoria</i>	3.7	Arg-Lys	sekwencja	LMCI-I	—	35
Chymotrypsyna, PPAE	<i>Locusta migratoria</i>	3.7	Leu-Lys	sekwencja	LMCI-II	—	35
Trypsyna, HLE, chymotrypsyna	<i>Heliotis zea</i>	18.0	Arg-X Met-X	skład a-a, sekw. N-końca	Multistatyna	PSTI	50
Katepsyna G, chymotrypsyna	<i>Heliotis zea</i>	6.3	—	skład a-a, sekw. N-końca	—	BPTI	50
Katepsyna G, chymotrypsyna, proteinazy grzybowe	<i>Apis mellifera</i>	5.9	Met-Glin	sekwencja	AMCI	Ascaris	52
Subtylizyna BPN, proteinazy grzybowe	<i>Bombyx mori</i>	6.1	Thr-Val	sekwencja	FPI-F	Bombyx	19, 51

kontrolowane przez proteiny, które mogą je zapoczątkowywać, jak również brać udział w ich amplifikacji poprzez kaskadę aktywacji kolejnych zymogenów. Istnieje tu potencjalna możliwość udziału inhibitorów w zabezpieczeniu organizmu przed przypadkowym uruchomieniem tych mechanizmów. Spośród poznanych i scharakteryzowanych inhibitorów z hemolimfy znakomitą większość stanowią inhibitory proteinaz serynowych, zebrane i opisane przez A. Polanowskiego i T. Wilusza [Tab. 1] [15]. Inhibitory z hemolimfy owadów podzielono na dwie zasadnicze grupy: inhibitory wielkocząsteczkowe (około 45 kDa), należące do rodziny serpin oraz inhibitory niskocząsteczkowe (poniżej 10 kDa), z reguły należące do rodziny inhibitorów typu Kunitza.

Uważa się, że inhibitory proteinaz, stanowiące znaczną część białek hemolimfy są również czynnikami chroniącymi owady przed atakiem pasożytniczych mikroorganizmów. Stwierdzenie to sformułowano na podstawie wyników badań wskazujących, że inhibitory z hemolimfy owadów hamują aktywność proteinaz pasożytniczych grzybów, utrudniając ich wnikanie do wnętrza ciała owada, co stanowi kluczowy etap inwazji pasożyta. Inhibitory hamują również proteiny grzyba po jego wniknięciu do hemolimfy [16]. Niektóre inhibitory z hemolimfy mają wpływ na rozwój i rozmnażanie pasożytniczego grzyba. Np. inhibitor F z *Bombyx mori* dodany do hodowli *Beauveria bassiana* powoduje obserwowane mikroskopowo skutki w postaci zahamowania wzrostu strzępek grzyba oraz tworzenia konidiów [17]. Inhibitory oddziałujące z grzybowymi proteinazami FPI (*fungus proteinase inhibitors*) podzielono na grupę termostabilnych inhibitorów niskocząsteczkowych (M_r 6300-12000) i termowrażliwych inhibitorów wysokocząsteczkowych (M_r 43000) [18]. Spośród wielu inhibitorów hamujących grzybowe proteiny dokładnie scharakteryzowano inhibitor FPI-F z *Bombyx mori*. Hamuje on proteiny grzybowe (proteiny z *Beauveria bassiana* z $K_a = 1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) oraz subtylizynę, wykazując niską aktywność wobec chymotrypsyny i trypsyny. Składa się z 55 reszt amonokwasowych (M_r 6100), nie zawiera alaniny, metioniny i tryptofanu. Posiada cztery mostki dwusiarczkowe. Centrum reaktywne tworzą reszty Thr (29) i Val (30). Nie udało się ustalić jego homologii z żadnym ze znanych inhibitorów, dlatego zaproponowano utworzenie nowej rodziny inhibitorów — rodziny *Bombyx* [19]. Trzy, częściowo scharakteryzowane, izoinhibitory mające zdolność hamowania proteinaz Pr 1 oraz Pr 2 z *Metarhizium anisopliae* wykazano w hemolimfie *Galleria mellonella* [20]. Są to inhibitory niskocząsteczkowe, lecz pobieżna charakterystyka tych białek nie pozwala zaklasyfikować ich do żadnej z grup inhibitorów.

V-2. Oksydaza fenolowa

Zupełnie odmienną grupę białek biorących udział

w obronie organizmu owada przed ciałami obcymi stanowią oksydazy fenolowe, rodzina białek zawierających w swej strukturze miedź. Badania nad nimi są prowadzone od 50 lat. Enzymy te występują w oskórku i w hemolimfie i uczestniczą w sklerotyzacji, zabliznianiu ran, w wytwarzaniu pigmentu — melaniny oraz w reakcjach obrony przeciwko obcym ciałom. W zrozumieniu roli oksydaz fenolowych podstawowe znaczenie ma poznanie mechanizmu ich działania. Oksydaza fenolowa jest enzymem potencjalnie groźnym dla organizmu owada, ponieważ utlenia ona fenole do odpowiednich chinonów, które są bardzo reaktywne i niebezpieczne tak dla obcych ciał, które wniknęły do hemocelu, jak i dla owada. Uważa się, że główny mechanizm działania oksydazy polega właśnie na wytwarzaniu chinonów, reaktywnych intermedatów syntezy melanin. Niekontrolowana aktywacja oksydazy prowadzić może do śmierci organizmu. Dlatego też enzym wydzielany jest w formie nieaktywnej. Wszystkie znane oksydazy występują w formie prekursorów i są aktywowane poprzez selektywną proteolizę. Aktywacja zachodzi w sposób kaskadowy zapoczątkowany przez składniki ścian komórkowych bakterii: β -1-3-glukan, peptydoglikan i lipopolisacharyd. W organizmach owadów znane są dwa typy oksydaz fenolowych: typ lakazy (EC. 1. 10. 3. 2, oksydoreduktaza p-difenol: O_2) oraz typ tyrozynazy, nazwanej krótko oksydazą fenolową (EC. 1. 10. 3. 1, oksydoreduktaza o-difenol: O_2). Lakaza występuje w oskórku owada i bierze udział w procesie sklerotyzacji. W hemolimfie występuje jeden typ oksydazy fenolowej (tyrozynazy), zaangażowanej w procesy immunologiczne, natomiast dwa inne typy oksydazy występują w oskórku. Jest to oksydaza uczestnicząca w zabliznianiu się ran oraz oksydaza biorąca udział w pigmentacji oskórka [21].

Homogenne preparaty prooksydazy udało się wyizolować z hemolimfy stosunkowo niewielu gatunków owadów, ze względu na takie jej właściwości jak: niestabilność, utrata aktywności podczas oczyszczania, nierozpuszczalność, czy właściwość przylegania do powierzchni stałych. Prooksydaza fenolowa z larw *Bombyx mori* ma masę cząsteczkową 80 kDa (SDS-PAGE) i składa się z dwu podjednostek o masach 40 kDa. Zawiera 0.15-0.16% miedzi [22]. Prooksydaza fenolowa z *Manduca sexta* składa się z podjednostek o masach 71 i 77 kDa tworzących heterodimer o masie od 100-150 kDa, zawiera 0.18% miedzi [23]. Jak już wspomniano, oksydaza fenolowa posiada zdolność utleniania monofenoli i difenoli, np. katecholamin do chinonów, co prowadzi do powstawania melaniny. Najlepszymi substratami dla oksydazy fenolowej z *Manduca sexta* są: N- β -alanylodopamina i 4-metylokatechol, natomiast DOPA jest dużo gorszym substratem dla oksydazy, mimo tego jest najczęściej używanym substratem w badaniach laboratoryjnych [24].

Jak wspomniano, aktywacja prooksydazy fenolowej jest procesem kaskadowym, w którym udział biorą

również proteiny. Do tej pory w hemolimfie owadów znaleziono dwa zymogeny proteinaz serynowych: prekursor enzymu aktywującego prooksydazę fenolową (PPAE) oraz enzym mający zdolność hydrolizy BAEF (BzArgOEtaza, BAEEaza).

Uważano, że proBAEEaza, PPAE oraz prooksydaza fenolowa są kolejno aktywowane w kaskadzie zapoczątkowanej przez dodanie do plazmy owada składników ściany komórkowej bakterii. Zaobserwowano bowiem, że BAEFaza jest pierwszą serynową proteinazą pojawiającą się po dodaniu peptydoglikanu czy β -1-3-glukanu. Jednakże, jak dotąd nie udało się jednoznacznie dowieść, że BAEEaza uczestniczy w kaskadzie aktywacji prooksydazy fenolowej. BAEEaza dodana do plazmy nie ma zdolności aktywacji prooksydazy fenolowej. Masa cząsteczkowa proBAEEazy wyznaczona elektroforetycznie wynosi 39 kDa. Jej aktywacja za pomocą zymosanu lub peptydoglikanu w obecności jonów wapnia prowadzi do powstania białka o masie 38 kDa, co dowodzi, że aktywacja zachodzi na drodze ograniczonej proteolizy. Nie zidentyfikowano jednakże czynnika bezpośrednio aktywującego proBAEEazę. Aktywny enzym posiada specyficzność wyższą niż trypsyna. Najlepiej hydrolizuje substraty z arginina w pozycji P1. Substraty z lizyną są hydrolizowane znacznie wolniej. Właściwość aktywowania BAEEazy przez składniki ścian komórkowych bakterii skłania wielu badaczy do uznania, że enzym ten odgrywa jakąś rolę w systemie obrony u owada. Przypuszcza się, że BAEEaza może uczestniczyć w systemie krzepnięcia hemolimfy zapoczątkowanym przez składniki ścian komórkowych mikroorganizmów lub też, że podobnie jak trombina, posiada zdolność stymulacji komórek do hemokinezy, chemotaksji, replikacji fibroblastów czy opsonizacji [25].

Enzym aktywujący prooksydazę fenolową (PPAE) występuje w hemolimfie oraz w oskórku. PPAE z oskórka *Bombyx mori* jest proteinazą serynową składającą się z dwu podjednostek o masie 15 kDa oraz 32 kDa połączonych mostkiem dwusiarczkowym. Wykazuje specyficzność trypsynopodobną, bazującą na aktywności esterazowej. Hydrolizuje BAEF, Tos-Arg-Metyl Ester, Boc-Gln-Ala-Arg-MCA z $K_m = 0.62$ mM [33], ale nie hydrolizuje BLEE ani Tos-Lys-Metyl Ester, nie hydrolizuje również substratów dla chymotrypsyny, jak Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa. Właściwościami tymi różni się on od trypsyny (jest enzymem bardziej specyficznym), ale jest zbliżony do MFP-1 (*molting fluid proteinase*), proteiny wydzielanej przez owady w trakcie wylinki [8]. Jednakże funkcja PPAE z oskórka pozostaje niejasna mimo, iż udokumentowano, że PPAE z oskórka aktywuje prooksydazę z hemolimfy. Nie udowodniono bowiem, żeby enzym ten mógł być transportowany do hemolimfy, chociaż stwierdzono, że łatwo uwalnia się z oskórka przy jego uszkodzeniu [26].

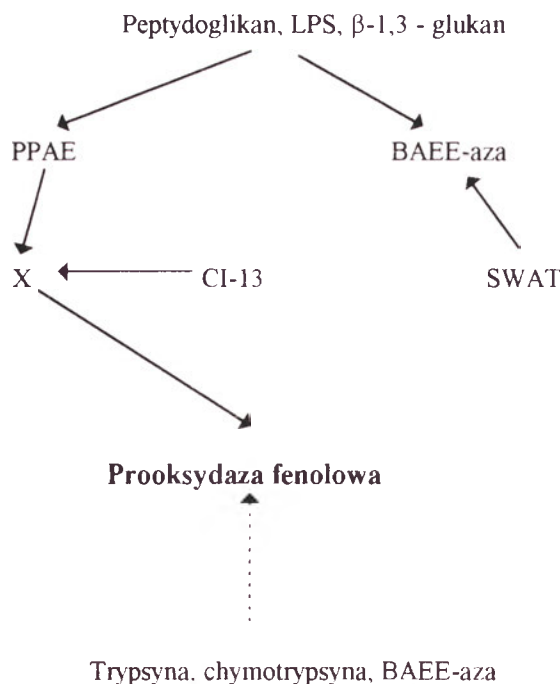
PPAE z hemolimfy, o podobnych właściwościach jak PPAE z oskórka, jest hamowana przez inhibitory

proteaz serynowych: p-nitrofenylo-guanidynobenzoosan i PMSF. Zymogen tej proteiny znaleziono w hemolimfie *Bombyx mori*. [27]

Aktywacja prooksydazy fenolowej była badana na oczyszczonych preparatach tego zymogenu i PPAE z oskórka *B. mori*. Stwierdzono, że w trakcie ograniczonej proteolizy proenzymu następuje uwolnienie peptydu o masie 5 kDa i zymogen przechodzi w formę aktywną. Aktywna oksydaza fenolowa ma masę 70 kDa. Stwierdzono, że PPAE z hemolimfy i PPAE z oskórka hydrolizuje to samo wiązanie w prooksydazie fenolowej, dlatego też w badaniach nad aktywacją prooksydazy z hemolimfy często stosuje się, łatwiejszą do uzyskania, PPAE z oskórka. Niektórzy autorzy podają, że aktywacja prooksydazy zachodzi nie tylko w obecności PPAE. Właściwość tę posiada również α -chymotrypsyna, a ponadto wiele innych substancji organicznych np., SDS, kwasy tłuszczowe, etanol i inne rozpuszczalniki organiczne. Jednakże, tylko dwu autorów podaje, że prooksydaza jest aktywowana nie przez PPAE: w przypadku aktywacji prooksydazy z *Tenebrio molitor* przez kwasy tłuszczowe C-18 oraz aktywacji prooksydazy *B. mori* i *M. sexta* przez α -chymotrypsynę [23, 28]. Aktywne cząsteczki oksydazy fenolowej mają tendencje do łączenia się ze sobą oraz z innymi cząsteczkami w heterogenne agregaty. Adsorbują się również na powierzchniach takich jak szkło czy poliwęglany. W hemolimfie *B. mori* zaobserwowano tworzenie kowalencyjnych agregatów oksydazy z białkami plazmy [29]. Opłaszczanie i tworzenie strąków białkowych wokół obcych ciał, które wniknęły do hemocelu wydaje się istotną właściwością oksydazy fenolowej. Strąty te zawierające bakterie czy strzępki grzybni są otaczane melaniną produkowaną przez oksydazę i w ten sposób przestają być szkodliwe dla organizmu owada.

Nieaktywna prooksydaza musi być w jakiś sposób aktywowana przez bakterie czy grzyby wnikające do wnętrza ciała owada. Prooksydaza fenolowa jest spontanicznie aktywowana przy pobieraniu hemolimfy przez nacięcie zewnętrznych powłok ciała. Można tego uniknąć wstrzykując owadowi przed pobraniem hemolimfy roztwór cukru trzcinowego. Tak potraktowaną hemolimfę używa się do badań nad aktywacją prooksydazy za pomocą zymosanu, polisacharydu z drożdży zawierającego β -1-3-glukan. Zymosan nie posiada zdolności do bezpośredniej aktywacji prooksydazy. Aktywuje on tylko pewien etap kaskady. Zymosan wymaga do działania obecności dwuwartościowego kationu np. wapnia. Aktywacja przez zymosan jest hamowana przez p-nitrofenylo-guanidynobenzoosan, co oznacza, że zymosan aktywuje proteinazę lub proteiny, które aktywują prooksydazę. Jedną z tych proteinaz wydaje się być PPAE z hemolimfy. Raz zaktywowana PPAE nie wymaga do dalszego działania obecności jonów wapnia. Oprócz PPAE z hemolimfy, zymosan aktywuje również inną serynową proteinazę: BAEEazę. Spośród glukanów system

oksydazy aktywują związki z wiązaniem β -1-3-glikozydowym. Substancją pochodzącą z bakterii gram-dodatnich aktywującą kaskadę oksydazy fenolowej jest peptydoglikan. Lipopolisacharyd nie we wszystkich przypadkach aktywuje kaskadę, a jeżeli to w dużo większych stężeniach niż peptydoglikan (peptydoglikan w stęż. ng/ml, natomiast lipopolisacharyd w stęż. μ g/ml). Wiązanie β -1-3-glukanu do białka rozpoznającego zapoczątkowuje kaskadę aktywacji prooksydazy fenolowej. Białko wiążące β -1-3-glukan (β GRP), jak się wydaje nie posiada aktywności proteolitycznej. Wiązanie β -1-3-glukanu może powodować zmianę koformacyjną białka rozpoznającego, która może wywoływać aktywację zymogenu proteiny, dalszego składnika kaskady. Wydaje się, że istnieją dwa typy białek rozpoznających zapoczątkowujących kaskadę aktywacji prooksydazy, białka rozpoznające peptydoglikan (PGRP) oraz białka rozpoznające β -1-3-glukan (β GRP). To ostatnie białko zostało wyizolowane z hemolimfy *B. mori*. Stwierdzono, że wykazuje ono bardzo silne powinowactwo do glukanów z wiązaniem β -1-3-glikozydowym i nie wykazuje aktywności amidazowej wobec licznych syntetycznych substratów różnych proteinaz. Nie jest niestety jasne w jaki sposób białko rozpoznające β -1-3-glukan wpływa na aktywację następnego składnika kaskady. Białko o masie 19 kDa wyizolowane z hemolimfy *B. mori* ma powinowactwo do peptydoglikanu, lecz nie stwierdzono zdolności wiązania β -1-3-glukanu przez to białko. Nazwano je białkiem rozpoznającym peptydoglikan (PRGP). W nieobecności PRGP peptydoglikan nie inicjuje



Ryc. 1. Schemat przedstawiający zależności w systemie aktywacji oksydazy fenolowej *Bombyx mori*. Strzałki ciągłe wskazują na interakcje między składnikami kaskady w postaci aktywacji lub inhibicji. Strzałka przerywana przedstawia częściowo udokumentowaną interakcję wymienionych enzymów z prooksydazą fenolową. SWAT (Silk Worm-Anty-Trypsin).

kaskady aktywacji prooksydazy fenolowej [30]. Nie stwierdzono do tej pory w hemolimfie obecności białka rozpoznającego inny czynnik rozpoczynający kaskadę aktywacji oksydazy — lipopolisacharydu. Na podstawie obecnego stanu badań możemy wnioskować o kolejności reakcji obronnych zachodzących w hemolimfie w następstwie wnikięcia do niej ciał obcych: peptydoglikan lub β -1-3-glukan wiąże się z rozpoznającą je cząsteczką białka prowadząc do następujących po sobie aktywacji dwu proteinaz serynowych, BAEazy oraz PPAE. Obydwie proteinazy wymagają do aktywacji obecności jonów wapnia. Następnie w wyniku selektywnej proteolizy zachodzi aktywacja prooksydazy fenolowej [Ryc. 1].

Stwierdzono, że kaskada aktywacji prooksydazy fenolowej może być hamowana przez inhibitory z hemolimfy. Do tej pory zbadano kilka przypadków takiego oddziaływania. Inhibitory CI-13 z *B. mori* nie hamują aktywności oksydazy fenolowej, ale mają wpływ na jej aktywację. Zbadano trzy izoformy inhibitora CI-13: CI-13 a, b i c. Wszystkie składają się z 63 amonokwasów, ich masy cząsteczkowe wynoszą ok. 7 kDa, zawierają 6 reszt cysteiny [31]. Stwierdzono, że największy wpływ na hamowanie aktywacji prooksydazy ma CI-13 c. Uważa się, że hamuje on PPAE. Jednakże w trakcie badań wykazano, że CI-13 hamuje aktywność PPAE wobec Boc-Gln-Ala-Arg-MCA tylko w połowie. Ponadto jak wiadomo PPAE jest wysokospecyficznym enzymem trypsynopodobnym, a inhibitory CI specyficznie hamują chymotrypsynę. Testy wykazujące aktywność oksydazy fenolowej, wykonuje się w warunkach *in vitro* dodając do mieszaniny, zawierającej prooksydazę oraz lizat hemocytów lub homogenat oskórka (zawierający składniki kaskady aktywacji) enzymu aktywującego: chymotrypsyny lub trypsyny. Prooksydaza z *B. mori* jest aktywowana *in vitro* chymotrypsyną a nie trypsyną. [26]. W plazmie *Locusta migratoria* aktywację prooksydazy wywołuje się *in vitro* trypsyną. Stwierdzono, że inhibitor z *Locusta migratoria* hamuje aktywację prooksydazy. Ma on masę cząsteczkową 14 kDa, hamuje chymotrypsynę z $K_a = 8.3 \times 10^9 M^{-1}$, HLE: elastazę z ludzkich leukocytów z $K_a = 5.5 \times 10^7 M^{-1}$, nie hamuje natomiast trypsyny, trombiny, subtilizyny, ani PPE: elastazy z trzustki wieprzowej. Jest więc wysoce specyficzny. Większość autorów uważa, że prooksydaza fenolowa nie jest bezpośrednio aktywowana ani przez trypsynę, ani przez chymotrypsynę [32]. Przypuszcza się, że w aktywacji prooksydazy między trypsyną a aktywnym enzymem musi być jeszcze jeden etap kaskady, musi tam działać proteinaza chymotrypsynopodobna. Jak do tej pory nie wykryto w hemolimfie owadów zymogenu takiej proteiny [33]. Stwierdzono również, że kaskada aktywacji uruchomiona lipopolisacharydem lub β -1,3-glukanem jest niewrażliwa na działanie inhibitorów. Może to znaczyć, że są dwie drogi aktywacji, w których uczestniczą różne enzymy [34]. W hemolimfie *M. sexta*

wykryto dwa niskocząsteczkowe inhibitory: HLTI A oraz HLTI B. HLTI A ma masę 14 kDa, natomiast HLTI B: 8 kDa. Obydwa hamują trypsynę (Ka HLTI A z trypsyną wynosi $6.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), chymotrypsynę i plazminę, nie hamują elastazy, papainy, pepsyny, subtilyzyny ani termolizyny. Stwierdzono, że inhibitory HLTI hamują aktywację prooksydazy fenolowej zainicjowanej przez PPAE z oskórka [35]. Z hemolimfy *Locusta migratoria* wydzielono niskocząsteczkowe inhibitory LMCI I o masie 3760 Da oraz LMCI II o masie 3800 Da. Zawierają one 6 reszt cysteiny. Hamują chymotrypsynę ze stałymi asocjacji odpowiednio $8.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ i $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. LMCI I hamuje HLE ze stałą asocjacji $5.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, natomiast LMCI II hamuje PPE ze stałą asocjacji $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Żaden z nich nie hamuje trypsyny. Wykazano, że LMCI hamują aktywację prooksydazy fenolowej w ekstraktach hemocytów z *Locusta*, nie hamując równocześnie samej oksydazy [36]. Dwa wielocząsteczkowe inhibitory aktywacji prooksydazy znaleziono w *Pacifastacus leniusculus*. Są to białka o masach 155 kDa oraz 340 kDa [37]. Wykazano także zdolność hamowania spontanicznie wywołanej aktywacji prooksydazy fenolowej przez alaserpinę, o masie 47 kDa, z *Manduca sexta* [38].

Również BAEeaza jest hamowana przez inhibitory z hemolimfy. Może to być powodem, że aktywność BAEeazy stosunkowo krótko utrzymuje się w hemolimfie *B. mori*, w przeciwieństwie do zymogenu tej proteiny, który jest białkiem stabilnym. Z hemolimfy *B. mori* wyizolowano serpiny SW-AT oraz SW-Achy (*Silk Worm — Anty Trypsin* oraz *Silk Worm — Anty chymotrypsin*). Okazało się, że SW-AT, o masie cząsteczkowej 41 805 Da, przewidzianej z cDNA [39], jest głównym inhibitorem regulującym poziom BAEeazy. Jest to, jak dotąd, jedyny przypadek ustalenia docelowego enzymu dla serpiny z hemolimfy. Stwierdzono ponadto, że ani SW-AT ani SW-Achy nie hamują PPAE [Ryc. 1].

Artykuł otrzymano 5 stycznia 1998 r.

Zaakceptowano do druku 18 stycznia 1999 r.

Piśmiennictwo

- Burges HD (1981) (red) W: Microbial control pests and plants diseases (1970-1980). Acad. Press London, New York
- Hoffman C, Vanderbruggen H, Hofte H, Van Rie J, Jansens S, Van Mallaert H (1988) *Proc Natl Acad Sci* **85**: 7844-7848
- Pozsagy M, Fast P, Kaplan H, Carey PR (1987) *J Invert Pathol* **50**: 246-253
- Martens JWM, Honeé G, Zuidema D, Van Lent JWM, Visser B, Vlak JM (1990) *Appl Env Microbiol* **56**: 2764-2770
- Volkman LE (1995) *Science* **269**: 1834
- Da Silva EJ (1981) *Acta Biotech* **3**: 233-235
- St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1991) *J Invert Pathol* **58**: 415-526
- Samuels RI, Paterson IC (1995) *Comp Biochem Physiol* **110**: 661-669
- Kołaczkowska M, Chrzanowska J, Bania J (1997) *Postępy Nauk Rolniczych* **6**: 31-45
- Ezekowitz RAB, Hoffman JA (1996) *Curr Opin Immunol* **8**: 1-2
- Muta T, Iwanga S (1996) *Curr Opin Immunol* **8**: 41-47
- Hoffman JA, Richhart JM, Hetru C (1996) *Curr Opin Immunol* **8**: 8-13
- Heimburger N (1975) W: Reich E, Rifkin DB, Schaw E (red) *Proteases and Biological Control*. Cold Spring Harbor Laboratories, N. Y. str 367-386
- Travis J, Salvesen GS (1983) *Annu Rev Biochem* **52**: 655-709
- Polanowski A, Wilusz T (1996) *Acta Biochim Polon* **43**: 445-454
- Shimizu S, Tsuchitani Y, Matsumoto T (1993) *Lett in Appl Microbiol* **16**: 291-294
- Yoshida S, Yamashita M, Yonehara S, Eguchi M (1990) *Comp Biochem Physiol* **95**: 559-564
- Yamashita M, Eguchi M (1987) *Comp Biochem Physiol* **86**: 201-208
- Pham TN, Hayashi K, Takano R, Itoh M, Eguchi M, Shibata H, Tanaka T, Hara S (1996) *J Biochem* **119**: 428-434
- Kucera M (1984) *J Invert Pathol* **43**: 190-196
- Ashida M, Yamazaki HI (1990) W: Ohnishi E, Iskizaki H (red) *Molting and Metamorphosis*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, str 239-265
- Ashida M (1971) *Arch Biochem Biophys* **144**: 749-762
- Aso Y, Kramer KJ, Hopkins TL, Lookhart GL (1985) *Insect Biochem* **15**: 9-17
- Hall M, Scott T, Sugumaran M, Soderhall K, Law JH (1995) *Proc Natl Acad Sci* **92**: 7764-7768
- Katsumi Y, Kihara H, Ochiai M, Ashida M (1995) *Eur J Biochem* **228**: 870-877
- Aso Y, Yamashita T, Meno K, Murakami M (1994) *Biochem Mol Biol International* **33**: 571-758
- Yoshida S, Ashida M (1986) *Insect Biochem* **16**: 539-545
- Ohnishi E, Dohke K, Ashida M (1970) *Arch Biochem Biophys* **139**: 143-148
- Ashida M, Yoshida H (1988) *Insect Biochem* **18**: 11-19
- Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M (1996) *J Biol Chem* **271**: 13854-13860
- Shinohara T, Aso Y, Shirai K, Fujii H, Funatsu G (1993) *Biosci Biotech Biochem* **57**: 1067-1071
- Saul SJ, Sugumaran M (1987) *Arch Insect Biochem Physiol* **5**: 1-11
- Brehélin M, Drif L, Baud L, Boemare N (1989) *Insect Biochem* **19**: 301-307
- Ramesh N, Sugumaran M, Mole JE (1988) *J Biol Chem* **263**: 11523-11527
- Boige grain RA, Mattras H, Brehélin M, Paroutaud P, Coletti-Previero MA (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 790-793
- Hargenhahn HG, Aspan A, Soderhall K (1987) *Biochem J* **248**: 223-228
- Kanost MR (1990) *Mol Insect Sci Plenum New York*: 139-146
- Takagi H, Narumi H, Nakamura K, Sasaki T (1990) *J Biochem* **108**: 372-378
- Kanost MR (1990) *Insect Biochem* **20**: 141-147
- Kanost MR, Prasad SV, Wells MA (1989) *J Biol Chem* **264**: 965-972
- Sasaki T, Kabayashi K (1984) *J Biochem* **95**: 1009-1017
- Eguchi M, Shomoto K (1985) *Comp Biochem Physiol* **81**: 301-307
- Narumi H, Hishida T, Sasaki T, Feng DF, Doolittle RF (1993) *Eur J Biochem* **214**: 181-187
- Sasaki T (1991) *Eur J Biochem* **202**: 255-261
- Sasaki T (1978) *J Biol Chem* **84**: 267-276
- Sasaki T (1988) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **369**: 1235-1241
- Sasaki T (1984) *FEBS Lett* **168**: 227-230
- Papayanopoulos IA, Biemann K (1990) *Protein Sci* **1**: 278-288
- Sugumaran M, Saul SJ, Ramesh N (1985) *Biochim Biophys Res Commun* **132**: 1124-1129
- Polanowski A, Wilusz T, Blum SM, Travis J (1994)

Komunikat

Komitet Organizacyjny i Programowy I Krajowego Kongresu Biotechnologii mają zaszczyt poinformować, że Kongres odbędzie się we Wrocławiu w dniach od 20 do 25 września br.

Celem Kongresu jest diagnoza polskiej biotechnologii w świetle światowych osiągnięć, oraz integracja środowiska zajmującego się tą dziedziną nauki jak również pokazanie możliwości rozwoju biotechnologii w Polsce.

Informacje o Kongresie można znaleźć w *Internecie*:
<http://www.iic.pwr.wroc.pl/~chemia-zjazdy>

Prof. Bronisława Morawiecka
Przewodnicząca
Komitetu Programowego

Prof. Paweł Kafarski
Przewodniczący
Komitetu Organizacyjnego

Sprawozdanie z Konferencji „Modyfikowane Kwasy Nukleinowe” poświęconej Profesorowi Bronisławowi Filipowiczowi

W dniach 12, 13 listopada 1998 r. w Łodzi w ramach Sekcji Kwasów Nukleinowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbyła się Konferencja „Modyfikowane Kwasy Nukleinowe”. Była ona poświęcona pamięci zmarłego przed 10 laty Profesora Bronisława Filipowicza, doktora honoris causa Akademii Medycznej w Łodzi i członka honorowego Towarzystwa. Spotkanie przygotowane staraniem Jego uczniów zorganizowane przez Akademię Medyczną pod protektorem JM Rektora prof. Henryka Stępnia oraz przez Oddział P.T. Bioch. w Łodzi. Celem konferencji było przedstawienie badań struktury i modyfikacji kwasów nukleinowych oraz biologicznych aspektów tych modyfikacji.

Część spotkania dedykowana Profesorowi Bronisławowi Filipowiczowi rozpoczęła się od Mszy Świętej i złożenia kwiatów na grobie Profesora i Jego małżonki. W części konferencji poświęconej Profesorowi wzięło udział około 150 osób. Podstawowe fakty z życiorysu i sylwetkę Profesora przypominała prof. Wanda Leyko.

Profesor Bronisław Filipowicz (1904-1988) ukończył



studia chemii na Uniwersytecie Warszawskim w 1930

roku. W trzy lata później uzyskał stopień doktora filozofii na podstawie rozprawy na temat hydrolizy skrobi pod wpływem amylazy — wykonanej pod kierunkiem Prof. Stanisława Przyłęckiego. Wyniki jej opublikował wraz z promotorem w czołowych wówczas czasopismach biochemicznych: *Biochemical Journal* i *Biochemische Zeitschrift*. W konspiracji i podczas powstania warszawskiego (pseudonim „Ochocki”) zajmował się wytwarzaniem materiałów wybuchowych i granatów, będąc w Armii Krajowej podkomendnym swego odtąd wieloletniego współpracownika i przyjaciela, Prof. Józefa Skarzyńskiego. W 1945 roku rozpoczął pracę w Łodzi w Katedrze Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Łódzkiego kierowanej kolejno przez Prof. Ernesta Syma i Prof. Antoniego Dmochowskiego. Po oddzieleniu Wydziału Lekarskiego i Farmaceutycznego od Uniwersytetu i utworzeniu Akademii Medycznej (1952) Prof. Filipowicz obejmuje Katedrę Chemii Ogólnej i Fizjologicznej, którą kieruje do przejścia na emeryturę w roku 1974. Biochemia kwasów nukleinowych i przemiana węglowodanowa były przedmiotem jego zainteresowań i wykonywanych pod Jego kierunkiem i z Jego inspiracji prac doświadczalnych, rozpraw doktorskich i habilitacyjnych. Obok pracy nauczycielskiej i badawczej bardzo ważną była dla Niego działalność popularyzatorska. Owocem jej było wiele artykułów i kilka książek z dziedziny biochemii, wśród nich „Chemia i życie”. Pisanie ich sprawiło Profesorowi wiele radości, bo pióro miał lekkie — i przyniosło zasłużone uznanie szerokiego grona czytelników.

W tej krótkiej, trwającej niespełną godzinę sesji, w dalszych wystąpieniach i rozmowach, także w nadesłanych do organizatorów listach, mieści się wiele serdecznych i ciepłych wspomnień dzieci i przyjaciół Profesora oraz Jego uczniów. Mówiono o tym, co jest własnością tych co Go znali, a czego nie sposób wcisnąć w ramy sprawozdania. Były to świadectwa trudu lat powojennych, budowy pracowni uniwersyteckich i nie zawsze bezpiecznej wierności starym przyjaźniom, nocnych godzin spędzonych przy biurku — to wtedy powstawały książki i artykuły, ale także recenzje rozpraw doktorskich i habilitacyjnych — było ich ponad dwieście... Były to świadectwa pogody ducha i poczucia humoru Profesora, który nie wyłączał zeń

własnej osoby. Dowodem tej autoironii jest opublikowany w Streszczeniach* szkic autobiograficzny Profesora. Były także świadectwa ostatnich lat życia, gdy do własnej pracy sił nie stawało — czerpał radość z dokonań swych uczniów i przeżywał ich niepowodzenia — piękny rys dobrego nauczyciela.

Część naukową Konferencji otworzył wykład prof. Davida Shugara (W-wa) na temat kinaz białkowych wirusów i komórek gospodarza jako potencjalnych miejsc zaczepienia (receptorów) leków przeciwwirusowych. Wykład W. J. Steca (Łódź) poświęcony był oligo(nukleozydotiofosforanom), których stereokontrolowaną syntezę na atomie fosforu opracowano w pracowni autora i wykazano istotność stereochemii konfiguracji wiązania fosfodiesterowego dla oddziaływań fizykochemicznych i biologicznych z komplementarnymi polinukleotydami. Naturalnym modyfikacjom RNA poświęcony był referat W. Filipowicza (Bazylea) na temat nowego enzymu prawdopodobnie biorącego udział w posttranskrypcyjnej obróbce RNA, cykazy 3'-końcowego fosforanu RNA katalizującej jego przemianę w cykliczny 2',3'-fosfodiester. J. Barciszewski (Poznań) zajął się oddziaływaniem RNA białkami na przykładzie oddziaływań białka Tat, biorącego m.in. udział w aktywacji transkrypcji genomu HIV z rozpoznawaną przez to białko sekwencją TAR-RNA. Dwa następne referaty poświęcone były właściwościom zmodyfikowanych syntetycznych fragmentów pętli antykodonów tRNA (A. Małkiewicz i wsp., Łódź, Raleigh) i analogów końca 5' mRNA (Darżynkiewicz i wsp., Warszawa). Prace kojarzące syntezę analogów z badaniami właściwości fizykochemicznych syntezowanych fragmentów i ich kompleksów z odpowiednimi białkami pozwalają na poznanie znaczenia poszczególnych elementów struktur dla ich właściwości biologicznych. Pierwszy dzień spotkania zamykał referat Aleksandry Wodnar-Filipowicz (Bazylea) na temat mechanizmu ekspresji czynników wzrostowych regulujących hematopoezę. Regulacja ta może następować na poziomie transkrypcji (erythropoetyna), translacji (interleukina 3) i po translacji, jak to ma miejsce w przypadku badanego przez autorkę czynnika FL.

Drugi dzień konferencji poświęcony różnym aspektom modyfikacji DNA otwierał referat R. Olińskiego (Bydgoszcz) na temat właściwości mutagennych utlenionych zasad azotowych w strukturze DNA. J. Kuśmierk (Warszawa) omówił powstawanie cyklicznych adduktów zasad DNA i ich reperację. Tak zmienione zasady mogą być nie tylko wynikiem reakcji z DNA czynników środowiskowych lecz także substancji endogennych np. produktów preoksydacji lipidów. Charakterystykę mechanizmów molekularnych działania cisplatyny przedstawiła Z. Walter (Łódź). Dwa refera-

ty z Poznania poświęcone były modyfikacjom DNA pod wpływem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. W pierwszym (W. Baer-Dubowska) omawiano badania doświadczalne adduktów dibenzo(a,j)antracenu z DNA. W drugim (K. Szyfter i wsp.) omawiano badania DNA w raku krtani zależnym od palenia tytoniu. Spektrum czynników modyfikujących w tym przypadku było oczywiście szersze i obejmowało inne genotoksyczne składniki dymu tytoniowego. A. Płucienniczak i wsp. (Warszawa) przedstawili metodę wykrywania w strukturze DNA metylowanych w pozycji 6 adeniny w oparciu o wysoką oporność metylowanej adeniny podczas sekwencjonowania metodą Maxama i Gilberta. Analogom nukleozydów i nukleotydów jako potencjalnym lekom przeciwnowotworowym lub przeciwwirusowym poświęcony był referat T. Kulikowskiego (Warszawa). J. Rzeszowska-Wolny (Gliwice) omówiła oddziaływanie białek z DNA uszkodzonym w wyniku działania leków przeciwnowotworowych i kancerogenów. Oddziaływania te mogą prowadzić do naprawy uszkodzenia ale także do jego maskowania. Wpływ leków nowotworowych na regulację transkrypcji może polegać na blokowaniu specyficznych oddziaływań czynników transkrypcyjnych z DNA ale może też polegać na tworzeniu „nienaturalnych” miejsc wiążących przez kowalencyjne addukty (M. Gniazdowski, Łódź).

Na konferencji przedstawiono 26 komunikatów w formie plakatu, z których około połowa uzupełniała tematykę referatów, pozostałe reprezentowały tematykę różną. W bardziej specjalistycznych sesjach brało udział 40-60 osób.

Powodzenie konferencji zawdzięczać należy wsparciu finansowemu Wydziału II Nauk Biologicznych i Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN, Doc. H. T. Panuszowi (Łódź), Powszechnemu Zakładowi Ubezpieczeń w Łodzi oraz instytucjom z Warszawy: A.G.A. Analytical, Instytutowi Biotechnologii i Antybiotyków i Prospecta sp. z o.o. a także gościnności Wydziału Farmaceutycznego AM w Łodzi

Marek Gniazdowski



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.

* Modyfikowane Kwasy Nukleinowe, Streszczenia, Łódź 1998, str. 5-8. Obszerniejszy szkic biograficzny o Profesorze Filipowiczu tamże str. 3 a także Post. Biochem. (1989) 35, 205.

OD REDAKCJI

Drodzy P. T. Autorzy

Cieszą nas, Redakcję Kwartalnika „Postępy Biochemii”, liczne nadsyłane nam artykuły. Dziękujemy za nie z uznaniem.

Coraz częściej jednak w wykazach piśmiennictwa znajdujemy błędy w zapisie skrótów czasopism. Przypominamy zatem zasady cytowania piśmiennictwa. Tytuły jednowyrazowe zapisujemy w pełnym brzmieniu, np. **Biochimija**, **Cell**, **Naturwissenschaften**. Tytuły wielowyrazowe należy skracać tak, by nie zatracić sensu poszczególnych wyrazów, np. **Biochemical and Biophysical Research Communications** (**Biochem Biophys Res Comm**), a także by zachować pisownię zależną od języka, w jakim sformułowany jest tytuł, np. **Biochimica et Biophysica Acta** (**Biochim Biophys Acta**), ale **Biochemical Communications** (**Biochem Commun**). Zdarzają się czasopisma o tym samym brzmieniu, ale publikowane w różnych miastach i wtedy po tytule w nawiasie podajemy nazwę miasta, jak np. **Nature (Lond)**, czy **Nature (Paris)** itp.

Poniżej wykaz skrótów przykładowo wybranych czasopism:

Acta Biochimica Polonica
Acta Neurobiologiae Experimentalis
Advances in Protein Chemistry
Angewandte Chemie International Edition in English
Annals of Applied Biology
Annals of Biochemistry and Experimental Medicine
Annales of Biochimie Clinique du Quebec
Annual Review Microbiology
Biochemical and Biophysical Research Communications
Biochemical Journal
Biochemistry
Biochimica et Biophysica Acta
Biochimie (Paris)
Biochimija
Cell
Cell Motility
Cell Structure and Function
Cellular and Molecular Biology
Journal of Bacteriology
Journal of Biochemistry (Tokyo)
Journal of Biological Chemistry
Journal of Clinical Biochemistry
Journal of Physical Chemistry
Natura (Amsterdam)
Natura (Bucharest)
Nature (London)
Nature Medicine
Nature (Paris) obecnie **Science Progres la Nature (Paris)**
Naturwissenschaften
Photosynthesis Research
Postępy Biochemii
Proceedings and Environmental Biophysics
Radiotherapy and Oncology
Trends in Biochemical Sciences
Trends in Neurosciences

Zofia Zielińska

BioCentrum *Kraków*

Badawcze Laboratoria Usługowe Uniwersytetu Jagiellońskiego

Szanowni Państwo,

Wychodząc naprzeciw potrzebom krajowego środowiska naukowego oraz biorąc pod uwagę konieczność pełniejszego wykorzystania posiadanej nowoczesnej aparatury badawczej Uniwersytet Jagielloński utworzył Biocentrum-Kraków. Jednostka ta skupia obecnie sześć laboratoriów badawczych Instytutu Biologii Molekularnej oraz Wydziału Chemii UJ, które podjęły się pełnić funkcje usługowe oraz szeroko pojęte doradztwo metodyczno-naukowe w zakresie nauk biomolekularnych obejmujących biochemię, biologię i chemię strukturalną, biologię komórki i genetykę molekularną. Analiza białek i kwasów nukleinowych stanowi serce nowoczesnych badań biomolekularnych i dlatego jest szeroko reprezentowana w naszej ofercie.

Oferujemy nasze usługi w zakresie:

- **chemii białek** (wysokoczułe sekwencjonowanie, analiza aminokwasowa oraz wysoko-rozdzielcza spektrometria masowa białek i peptydów, elektroforeza i elektroblot białek do sekwencjonowania, przygotowanie map peptydowych na HPLC)
- **biochemii kwasów nukleinowych** (synteza i sekwencjonowanie DNA)
- **technik inżynierii genetycznej** (konstrukcje i izolacja plazmidów, przygotowanie map restrykcyjnych, ekspresja genów, izolacja RNA i DNA, analiza Southern and Northern blot)
- **cytometrii przepływowej**
- **mikroskopii konfokalnej**

Ponadto posiadamy w sprzedaży preparaty wysokooczyszczonych proteinaz i ich białkowych inhibitorów.

Szczegółowe informacje znajdziecie Państwo w Internecie na stronach Instytutu Biologii Molekularnej UJ <http://www.mol.uj.edu.pl> lub udzieli ich:

Doc. dr hab. Adam Dubin, BioCentrum Kraków, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Al. Mickiewicza 3, 31 -120 Kraków

e-mail: dubin@mol.uj.edu.pl; **Fax:** (+12)633-6907; **Tel:** (+12)634-13-05 wew. 219

Nasze przedsięwzięcie nie jest nastawione na zysk, ale na zapewnienie ciągłej gotowości do pracy posiadanych nowoczesnych przyrządów badawczych — dlatego też nasze ceny są konkurencyjne.

Pokwitowanie dla wpłacającego

zł
słownie
wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł
słownie
wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł
słownie
wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Pokwitowanie dla wpłacającego

zł
słownie
wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł
słownie
wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł
słownie
wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Prenumerata POSTĘPÓW
BIOCHEMII rok 1999
dla nie zrzeszonych w PTBioch 40, — zł
dla członków PTBioch 20, — zł
dla zakładów i bibliotek 70, — zł

Składka P.T.Bioch.
za rok 1999 30, — zł
studenci 10, — zł

Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

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

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

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

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

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

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

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

