

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Advances in Biochemistry

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 43, NR 1, 1997

Profesor David Shugar doktorem Honoris Causa UW	2
Replikacja DNA bakteriofaga	5
Liniowy chromosom prokariotyczny	12
Genom wirusów <i>Papilloma</i>	18
Gen X wirusa zapalenia wątroby typu B	25
mtDNA a choroby i starzenie	30
Białko Rieskego w kompleksach cy- tochromowych	41
Inhibitor białka C a hemostaza	51
Zaproszenie do dyskusji	58

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

<http://rcin.org.pl>

WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15

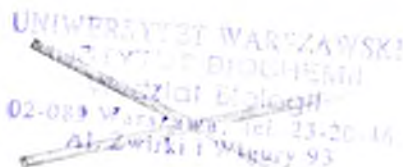
RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
KSENIA BYKOWSKA
(Warszawa)
WITOLD JACHYMCZYK
(Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
MACIEJ NAŁĘCZ
(Warszawa)
ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK
(Łódź)
BARBARA TUDEK
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI CONTENTS



Profesor David Shugar doktorem Honoris Causa Uniwersytetu Warszawskiego

Professor David Shugar awarded a Honorary Doctorate from the University of Warsaw

DAVID SHUGAR 2

Współdziałanie białek fagowych i bakteryjnych w replikacji DNA bakteriofaga

Phage and bacterial proteins as coplayers in bacteriophage DNA replication

JAROSŁAW MARSZAŁEK 5

Liniowy chromosom prokariotyczny; struktura i synteza telomerów

Linear prokaryotic chromosome; structure and synthesis of telomers

MAŁGORZATA ŻARKO-POSTAWKA, JOLANTA ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA 12

Organizacja i struktura genomu wirusów *Papilloma*

Papilloma Viruses; genome organisation and structure

ELŻBIETA DZIABASZEWSKA 18

„X” — ostatnia niewiadoma wirusa zapalenia wątroby typu B? Gen X i produkty jego ekspresji

„X” — the last unknown of hepatitis B virus? X gene and its expression products

MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ 25

Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA związane z rozwojem stanów patologicznych i starzeniem

Oxidative damage of mitochondrial DNA in degenerative diseases and aging

MAREK JURGOWIAK, RYSZARD OLIŃSKI 30

Białko Rieskego — składnik transmembranowych kompleksów cytochromowych

Rieske protein — a component of transmembrane cytochrome complexes

BEATA GUBERNATOR, JAROSŁAW KRÓLICZEWSKI, JACEK RYBKA, ANDRZEJ SZCZEPANIAK 41

Inhibitor białka C: jego właściwości, funkcje i znaczenie w układzie równowagi hemostatycznej

Protein C Inhibitor: its properties, functions and meaning in haemostatis

IWONA FIJAŁKOWSKA 51

Zaproszenie do dyskusji — List do Redakcji

Invitation for discussion

KAZIMIERZ ZAKRZEWSKI 58

Sprawozdanie z XXXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

PIOTR LAIDLER 59

Profesor David Shugar doktorem Honoris Causa Uniwersytetu Warszawskiego*

Professor David Shugar awarded a Honorary Doctorate from the University of Warsaw



Uroczysta promocja odbyła się 22 listopada 1996 r. w auli im. Adama Mickiewicza, budynku Auditorium Maximum U.W.

Po laudacji wygłoszonej przez profesora Bogdana Lesynga, nastąpiła wzruszająca chwila wręczenia dyplomu przez rektora U.W. profesora Włodzimierza Siwińskiego. Po odśpiewaniu Gaude Mater Polonia zabrał głos profesor David Shugar.

Magnificencjo, Wysoki Senacie, Członkowie Rady Wydziału Fizyki, Szanowni Państwo:

Jestem naprawdę wzruszony i głęboko świadomy wielkiego zaszczytu, jakim obdarzył mnie Uniwersytet Warszawski, wybitny, światowy ośrodek akademicki. Jestem także dumny z tego, że dokładnie 30 lat temu, kiedy Uniwersytet Warszawski podjął decyzję o utworzeniu na Wydziale Fizyki Katedry Biofizyki, właśnie mnie zaproponowano jej organizację. W mojej pamięci jest ciągle żywe spotkanie na ten temat z Ministrem Szkolnictwa Wyższego, w którym uczestniczyli m.in.: Rektor Uniwersytetu oraz Dyrekcja Instytutu Fizyki Doświadczalnej z profesorami Jerzym Pniewskim i Leonardem Sosnowskim. Dziś Katedra Biofizyki cieszy się światowym uznaniem w niektórych dziedzinach biofizyki i biologii molekularnej, zarówno w zakresie prac doświadczalnych jak i teoretycznych.

Powstanie Katedry Biofizyki było możliwe tylko dzięki poparciu Wydziału Fizyki i Instytutu Biochemii

i Biofizyki PAN oraz wielu kolegów i współpracowników z innych ośrodków. W tym miejscu chciałbym złożyć hołd pamięci i przypomnieć udział, przedwcześnie zmarłego, profesora Włodzimierza Kołosa, światowej sławy uczonego zajmującego się mechaniką kwantową układów cząsteczkowych. Jego poparcie polegało nie tylko na prowadzeniu zajęć dydaktycznych, ale również na kierowaniu pierwszymi pracami teoretycznymi, dotyczącymi m.in. mechanizmów mutagenety. Uważam, że zaszczyt, którym mnie dziś obdarzono, obejmuje także tych wszystkich, którzy przyczynili się do powstania Katedry.

Osiągnięcia biologów i genetyków w drugiej połowie tego wieku są oszałamiające. Chcę ograniczyć się tutaj do wkładu fizyków i fizykochemików w poznawaniu i wyjaśnianiu fizycznych podstaw zjawisk biologicznych.

Geneza mojego zainteresowania biologią była w pewnym sensie przypadkowa. Jeszcze w trakcie wykonywania pracy doktorskiej w dziedzinie fizyki atomowej na uniwersytecie McGill w Montrealu, szpital uniwersytecki zwrócił się do mnie z prośbą o sprawowanie nadzoru nad budową ultrawirówki do celów biologicznych i klinicznych. Umożliwiła ona badanie wielkości i kształtu makrocząsteczek (enzymów i innych białek) przy pomocy metod hydrodynamicznych. Praca ta uświadomiła mi, że fizyka może odgrywać istotną rolę w biologii i medycynie. Warto tu dodać, że tak, jak obrazy dyfrakcyjne promieniowania rentgenowskiego przyczyniły się do odkrycia budowy przestrzennej DNA, tak metody hydrodynamiczne pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmu replikacji DNA w organizmach żywych i do dziś dnia są nadal wykorzystywane, nie tylko w biologii molekularnej.

Chociaż ściślejsze kontakty fizyki z biologią datują się już od dawna, to ich istotny rozwój nastąpił z chwilą wejścia tak biologii, jak i fizyki, w świat struktur cząsteczkowych. Już w latach trzydziestych, niektórzy wybitni fizycy teoretycy, tacy jak Niels Bohr, Erwin Schroedinger, Max Delbruck przy udziale genetyka, Timofiejewa-Ressovskiego, spotykali się na cotygodniowych dyskusjach na temat fizycznych podstaw zjawiska życia. W 1937 roku Delbruck, nie godząc się na życie w warunkach systemu hitlerowskiego, opuścił Niemcy i wyjechał do Stanów Zjednoczonych, gdzie odegrał kluczową rolę w stworzeniu molekularnych podstaw genetyki, za co otrzymał później nagrodę Nobla. Dwa lata później, z tych samych powodów opuścił Austrię Erwin Schroedinger przenosząc się do Irlandii, gdzie został Dyrektorem Instytutu for Advanced Studies, utworzonym przez ówczesnego premiera Irlandii, matematyka Eamon de Valera. Prócz prowadzenia badań naukowych, do podstawowego obowiązku tego Instytutu należało zorganizowanie serii popularnych, rocznych, wykładów dla mieszkańców Dublinu.

W 1943 roku Schroedinger, w ramach takiej serii, prowadził cykl wykładów, opublikowanych rok później w niewielkiej książeczce pod tytułem „Co to jest życie — fizyczne podstawy życia komórki”. Powołując się na wcześniejszy wniosek Delbrucka o tym, że wielkość jednostki genetycznej, zwanej genem, jest rzędu tylko tysięcy atomów, zwrócił uwagę na trudną do wytłumaczenia sprzeczność pomiędzy niezwykle uporządkowaniem procesów życiowych a zasadami fizyki statystycznej. Po odkryciu natury genu, struktury podwójnej helisy DNA i wniknięciu w molekularny przebieg procesu przekazywania informacji genetycznej, znamy dziś wyjaśnienie tej pozornej sprzeczności. Polega ona na tym, że w komórce istnieją zespoły enzymów, które w wysokim stopniu zapobiegają niedokładnościom procesu replikacji oraz inne zespoły enzymatyczne, które naprawiają większość błędów, pojawiających się z różnych powodów w czasie rozwoju komórki. Warto podkreślić, że enzymy napraw-

cze zostały odkryte przez fizyków w toku badań nad wpływem światła nadfioletowego na powstawanie mutacji w DNA. Miło wspomnieć, że kiedy prof. Delbruck zdecydował się podjąć tę tematykę badań, przyjechał najpierw na konsultacje naukowe właśnie do naszego warszawskiego środowiska, które już wtedy było znane ze swych osiągnięć w tej dziedzinie.

Książka Schroedingera, przedstawiająca podejście jednego z twórców mechaniki kwantowej do podstawowych problemów genetyki i ogólniej, do zjawiska życia, wywołała ogromne zainteresowanie nie tylko wśród fizyków, ale również wśród naukowców innych dyscyplin. Można wymienić tu dla przykładu współodkrywców struktury DNA, chemika — Jamesa Watsona i fizyka Francis Cricka. Watson wspominał, że w roku 1946 natrafił na książeczkę Schroedingera i od tego właśnie momentu postanowił, że swą dalszą karierę naukową poświęci badaniom struktury genu. Wyjaśnienie tej struktury, a nieco później, poznanie kodu genetycznego oraz mechanizmu biosyntezy białek, doprowadziło do prawdziwej rewolucji w biologii i genetyce molekularnej.

By głębiej wyjaśnić sposób funkcjonowania żywej komórki, nie wystarcza już określenie struktury poszczególnych jej składników. Konieczne jest wykorzystanie uniwersalnych praw oddziaływań pomiędzy nimi, które umożliwiłyby wyciąganie wniosków ilościowych. To zatem wymaga konieczności zastosowania praw fizyki, które są z powodzeniem stosowane do coraz to nowych odkryć biologów, w szczególności biochemików, np. do procesów różnicowania i morfogenezy, zachodzących w trakcie rozwoju organizmów wyższych. Wiadomo dziś, że mamy to do czynienia z procesami regulacji genów poprzez kombinację tak zwanych wewnętrznych i zewnętrznych sygnałów komórkowych. Nic więc dziwnego, że kilka miesięcy temu, Amerykańskie Towarzystwo Fizyczne poświęciło poznawaniu zjawisk życia kilkudniową sesję z udziałem biologów, genetyków i chemików. We wnioskach końcowych tej konferencji podkreślono, że dalszy postęp badań zależy od rozwoju współpracy interdyscyplinarnej.

Czy podobne osiągnięcia nastąpią w dziedzinie wyjaśniania podstawowych zasad funkcjonowania układu nerwowego? Stosunkowo dobrze rozwinięte badania neurofizjologiczne potrafią wyjaśnić wiele aspektów funkcjonowania neuronów. Natomiast największe dotychczasowe osiągnięcia fizyki, biologii molekularnej, elektrofizjologii i cybernetyki nie potrafią stworzyć obiecującego podejścia do mechanizmów pamięci, a tym bardziej świadomości. Niektórzy badacze sugerują nawet, że mózg człowieka nie jest zdolny do podania wyjaśnienia istoty swego działania. Z drugiej strony, wiele osób, zafascynowanych ogromnym postępem technik komputerowych, marzy o budowie takiego komputera, który potrafiłby symulować działanie mózgu. Takim ideom przeciwstawił się, w specjalnie napisanej książce, jeden z najwybitniejszych auto-

rytetów w dziedzinie fizyki matematycznej, znany ze swych prac z dziedziny „czarnych dziur” we wszechświecie, Robert Penrose. Analiza możliwości fizyki i matematyki, w wyjaśnianiu mechanizmów funkcjonowania układu nerwowego, doprowadziła go do wniosku, że struktura maszyn i obliczeń komputerowych nie jest zdolna do pojawienia się w niej formy świadomości. Świadomość bowiem, posiada pewne cechy, które nie dają się objąć metodami obliczeniowymi. W pewnym sensie możemy porównać „czarną dziurę świadomości” z „czarnymi dziurami” wszechświata. Czy potrafimy je poznać? Mogę odpowiedzieć starym powiedzeniem, że: „Trudne rzeczy robimy natychmiast, realizacja niemożliwych potrwa trochę dłużej”.

Wobec tak szybkiego i ogromnego postępu w biologii i genetyce molekularnej, należy zadać sobie pytanie, czy potrafimy odpowiednio wykorzystać tę wiedzę dla dobra ludzkości. Pytanie tego typu postawiono już wcześniej, 50 lat temu. Jeszcze przed, a zwłaszcza po Hiroszimie i Nagasaki. Chociaż wydaje się, że jesteśmy jeszcze bardzo daleko od molekularnych możliwości manipulowania świadomością, to można podzielać obawy Profesora Penrose'a, co do ewentualnych ujemnych konsekwencji takich działań i konieczności społecznej kontroli skutków takiego odkrycia.

Dwadzieścia lat temu, kiedy biologia molekularna opanowała technikę manipulacji genami w bakteriach (zwaną inżynierią genetyczną, a później biotechnologią), sami biologowie zdali sobie sprawę z potencjalnych zagrożeń jakie ona niesie i podnieśli tę sprawę publicznie. Doprowadziło to do zorganizowania międzynarodowej konferencji w Asilomar w Kalifornii, gdzie ustalono konkretne zasady bezpieczeństwa pracy w tej dziedzinie.

Dzisiaj, umiemy już manipulować genami roślin i zwierząt. Od kilku miesięcy, na rynku Stanów Zjednoczonych sprzedaje się tak zmodyfikowane gene-

tycznie jarzyny, by były odporne na działanie herbicydów. Pomimo protestów w Europie Zachodniej, władze amerykańskie odmawiają handlowego oznakowania tego rodzaju jarzyn. Co więcej, jesteśmy w przeddzień rozpoczęcia tzw. terapii genowej, czyli metody leczenia chorób genetycznych poprzez modyfikację genów ludzkich.

Postęp jest imponujący, wręcz oszałamiający. Ale alarmująca jest dla mnie, towarzysząca temu, ogromna komercjalizacja biologii i genetyki molekularnej (nie wspominając już o innych dziedzinach nauki). Komercjalizacja, w której czynny udział biorą także niektórzy czołowi badacze. Wielu z nich staje się członkami zarządów potężnych firm farmaceutycznych, czy biotechnologicznych. Coraz częstsze są przypadki ukrywania przed społecznością naukową wyników własnych badań naukowych, które traktowane są jako „osobista własność intelektualna”, przeznaczona dla celów komercyjnych. Jak pisał parę miesięcy temu, na łamach *Nature*, angielski fizyk, John Ziman, nauka akademicka, pod naciskiem wymagań technologicznych, jest w trakcie przejścia do nowej fazy, zwanej nauką post-akademicką. Skutki tego nie muszą być dla nas radosne. Czy potrafimy odpowiednio na to reagować w interesie całej ludzkości? Musimy chyba zadać sobie pytanie: „Czy podstawowym celem badań naukowych będzie nadal poszukiwanie prawdy, czy zastąpi ją pogoń za finansowym zyskiem?” I jakie będą tego skutki?

W Polsce, proces ten następuje wolniej. Być może częściowo wskutek śmiesznie niskich nakładów na naukę w ogóle. Nie jest to jednak pocieszające. Pauperyzacja nauki w Polsce, uniemożliwia bowiem odgrywanie przez nią pozytywnej roli w różnorodnych dziedzinach życia społecznego. Dochodzę w tym miejscu do pytania końcowego. Czy my, jako środowisko naukowe, potrafimy uruchomić takie działania, które uświadomią innym grupom społecznym i ich przedstawicielom palącą konieczność zmiany tej sytuacji?

W imieniu Zarządu Głównego Towarzystwa, Redakcji „*Postępów Biochemii*” oraz wszystkich członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego składamy Panu Profesorowi serdeczne gratulacje i najlepsze życzenia.

Liliana Konarska
Zofia Zielińska

**Acta
Biochimica
Polonica**

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

Współdziałanie białek fagowych i bakteryjnych w replikacji DNA bakteriofaga λ

Phage and bacterial proteins as coplayers in bacteriophage λ DNA replication

JAROSŁAW MARSZAŁEK*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Powstanie aktywnego kompleksu inicjacyjnego *ori λ - λ O*
- III. Wiązanie bakteryjnej helikazy DnaB
- IV. Aktywacja preprimosomu prowadzi do jednokierunkowej replikacji λ DNA
- V. Uruchomienie drugiego kierunku replikacji λ DNA
- VI. Przelączenie replikacji dwukierunkowej θ na jednokierunkową zachodzącą zgodnie z mechanizmem σ
- VII. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Formation of active initiation complex *ori λ - λ O*
- III. Loading of bacterial DnaB helicase
- IV. Activation of preprimosome leads to unidirectional replication of λ DNA
- V. Activation of second direction of λ DNA replication
- VI. Switch from bidirectional θ into unidirectional δ -mode of λ DNA replication
- VII. Conclusion

Wykaz stosowanych skrótów: λ DNA—DNA zawierające sekwencję *ori λ* ; RNAP — Polimeraza RNA; DNA Pol III — holoenzym polimerazy DNA III.

I. Wstęp

Badania nad replikacją genomu bakteriofaga λ nie tylko pozwoliły na szczegółowe poznanie biochemicznego mechanizmu tego procesu, lecz poszerzyły również naszą wiedzę o fizjologii komórki bakteryjnej będącej gospodarzem faga λ . Badania te doprowadziły po raz pierwszy do wyizolowania i scharakteryzowania biochemicznego bakteryjnych białek szoku termicznego (*heat shock proteins*) (DnaK, DnaJ, GrpE oraz ClpX) [1-5], których funkcje biologiczne wykraczają daleko poza udział w replikacji DNA faga λ .

Podczas infekcji komórki bakteryjnej (*Escherichia coli*) fag λ wstrzykuje do cytoplazmy dwuniciową liniową cząsteczkę DNA o długości 48,5 kb, która jest szybko przekształcana przez dwa bakteryjne enzymy ligazę i gyrazę w kolistą, ujemnie superhelikalną cząsteczkę DNA [6, 7]. Replikacja λ DNA rozpoczyna się od specyficznej sekwencji inicjatorowej *ori λ* , zlokalizowanej w obrębie genu kodującego replikacyjne

białko fagowe λ O. Początkowo replikacja λ DNA jest dwukierunkowa i zachodzi zgodnie z modelem θ (teta). Pomiędzy 10 a 15 minutą po infekcji następuje przedstawienie replikacji λ DNA z dwukierunkowej θ na jednokierunkową, zachodzącą zgodnie z mechanizmem toczącego się koła (replikacja typu σ (sigma)). W wyniku replikacji typu σ dochodzi do syntezy długich liniowych cząsteczek DNA wielokrotnie dłuższych od pojedynczego genomu faga. W późnym stadium infekcji te liniowe cząsteczki DNA są odpowiednio cięte i pakowane do główek fagowych.

Badania biochemiczne, w których zastosowano jako matrycę DNA plazmid zawierający sekwencję *ori λ* , dostarczyły wielu szczegółowych informacji na temat molekularnego mechanizmu replikacji zachodzącej zgodnie z mechanizmem θ [1]. Dotychczas nie udało się jednak opracować systemu *in vitro* umożliwiającego badanie jednokierunkowej replikacji λ DNA zachodzącej zgodnie z mechanizmem σ [6]. Nasza wiedza na temat mechanizmu przejścia od replikacji dwukierunkowej θ do jednokierunkowej σ jest również bardzo uboga.

Genom faga λ koduje jedynie dwa białka biorące bezpośredni udział w replikacji λ DNA (λ O, λ P), wszystkie pozostałe czynniki katalizujące syntezę fagowego DNA kodowane są przez genom gospodarza. Rola replikacyjnych białek wirusowych polega na koordynowaniu powstawania kolejnych kompleksów

*Dr. Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii AMG/UG Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

nukleoproteinowych biorących udział w replikacji λ DNA [8-12]. W niniejszym artykule chciałbym zwrócić szczególną uwagę na biochemiczne mechanizmy umożliwiające wirusowi wykorzystanie replikacyjnego aparatu gospodarza.

II. Powstanie aktywnego kompleksu inicjacyjnego *ori λ - λ O*

Oddziaływanie pomiędzy inicjatorowym białkiem fagowych λ O a specyficzną sekwencją DNA-*ori λ* zapoczątkowuje proces inicjacji replikacji λ DNA. Cztery dimery λ O wiążą się z czterema powtórzonymi sekwencjami (iterony), zlokalizowanymi w obrębi *ori λ* [13]. Badania za pomocą mikroskopu elektronowego sugerują, że w obrębie kompleksu *ori λ - λ O* łańcuch DNA nawinięty jest na cząsteczki białka tworząc strukturę przypominającą nukleosom [14]. Przez analogię, kompleks *ori λ - λ O* nazwano O-somem [15]. Doświadczenia biochemiczne wykazały, że warunki reakcji (rodzaj i stężenie soli oraz stopień ujemnej superhelikalności matrycy DNA) wpływają na specyficzność zależnej od białka λ O inicjacji replikacji dwuniciowego DNA [6, 16]. Białko λ O, podobnie jak białko inicjatorowe gospodarza (DnaA) wykazuje tendencję do agregacji i inaktywowania się, zwłaszcza w warunkach niskiej siły jonowej roztworu i podwyższonej temperatury środowiska reakcji [17]. *In vitro* wykazano, że bakteryjne białko opiekuńcze (chaperone protein) ClpX, będące podjednostką regulatorową proteazy ClpXP, może chronić λ O przed agregacją, a nawet katalizować dysocjację agregatów [17]. W obecności ClpX zaobserwowano również zwiększoną specyficzność wiązania białka λ O do DNA zawierającego sekwencję *ori λ* [17]. Inne bakteryjne białka opiekuńcze: ClpA, oraz DnaK/DnaJ/GrpE przynajmniej częściowo mogą zastępować białko ClpX w tych funkcjach (W a w r z y n ó w A, Ż y l i c z M — wyniki nieopublikowane). Rola bakteryjnych białek opiekuńczych w tworzeniu kompleksu inicjacyjnego *in vivo* nie jest dotychczas dokładnie poznania, można jednak przypuszczać, że fagowe białko λ O znajduje się pod stałą „opieką” białek gospodarza.

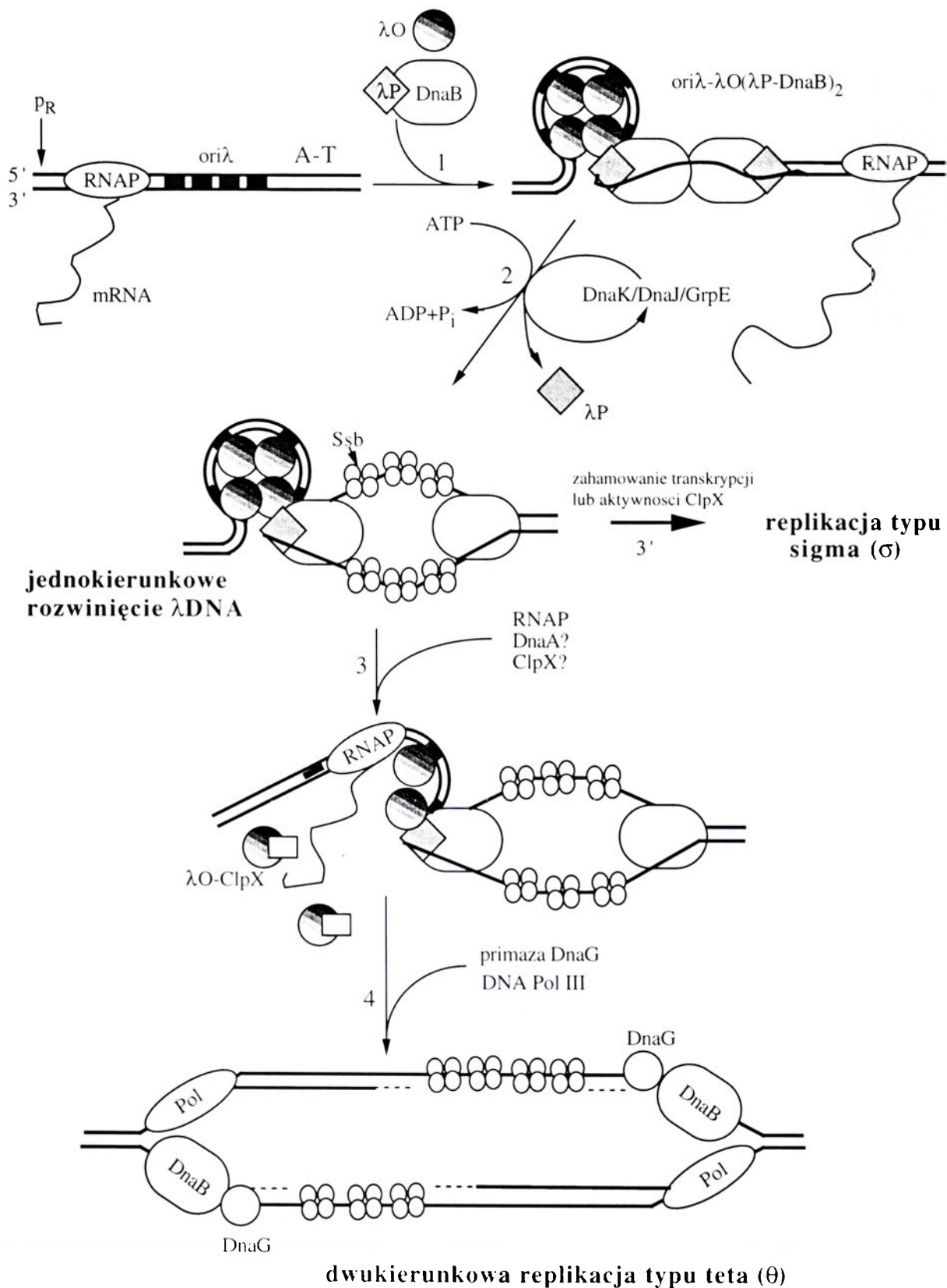
Powstanie kompleksu O-somu, na ujemnie superhelikalnej cząsteczce plazmidowego DNA, prowadzi do zmiany konformacji DNA w obrębie sekwencji wiążącej białko λ O oraz w przylegającym regionie bogatym w pary AT [18]. Dotychczas nie wiadomo czy w przypadku λ DNA dochodzi do trwałego rozdzielania komplementarnych nici DNA w obrębie regionu bogatego w pary AT [19]. Powstawanie takiej otwartej struktury DNA pod wpływem wiązania inicjatorowego białka DnaA zaobserwowano w obrębie sekwencji *oriC* chromosomu bakteryjnego [20]. Sekwencja bogata w pary AT jest bardzo ważna z punktu widzenia inicjacji replikacji λ DNA, gdyż przypuszczalnie w jej obrębie dochodzi do przyłączenia helikazy [6]. Od tej sekwencji rozpoczyna się katalizowane przez helikazę

rozwijanie dwuniciowego DNA, prowadzące do powstania widełek replikacyjnych i umożliwiające przyłączenie do matrycy DNA białek wchodzących w skład kompleksu replikacyjnego [6, 19]. Efektywne przyłączenie tych białek możliwe jest jedynie wtedy, gdy region bogaty w pary AT charakteryzuje się zmienioną konformacją umożliwiającą łatwe rozdzielanie komplementarnych nici DNA. *In vivo*, niezbędnym czynnikiem wspomagającym powstanie otwartej konformacji regionu bogatego w pary AT jest transkrypcja rozpoczynająca się od promotora p_R , zlokalizowanego z lewej strony sekwencji *ori λ* (Ryc. 1) (tzw. aktywacja transkrypcyjna *ori λ*) [21]. *In vitro* udało się wprawdzie pokazać inicjację replikacji λ DNA zachodzącą bez udziału polimerazy RNA. Do reakcji takiej dochodzi jednak pod warunkiem stosowania silnie ujemnie superhelikalnej matrycy DNA w nieobecności bakteryjnego białka HU (*histone like protein*) [22, 23]. Białko HU obniża stopień ujemnej superhelikalności matrycy DNA i w jego obecności replikacja λ DNA *in vitro* jest całkowicie uzależniona od aktywacji transkrypcyjnej [23].

W procesie aktywacji transkrypcyjnej *ori λ* może również uczestniczyć bakteryjne inicjatorowe białko DnaA, które przyłącza się do specyficznej sekwencji DNA (DnaA-box). Białko DnaA nie tylko inicjuje replikację chromosomu bakteryjnego, ale może również pełnić rolę czynnika transkrypcyjnego, modulującego aktywność polimerazy RNA [24]. Pomiedzy promotorem p_R a regionem *ori λ* występuje kilka sekwencji DNA, które potencjalnie mogą wiązać białko DnaA. *In vitro* udało się wykazać wiązanie białka DnaA do liniowego fragmentu DNA zawierającego te sekwencje (S z a l e w s k a - P a ł a s z A, M a r s z a ł e k J, T a y l o r K — wyniki nieopublikowane), zaś *in vivo* wykazano, że mutacja w genie *dnaA* prowadzi do znacznego obniżenia transkrypcji z promotora p_R . [25]. Wyniki te są zgodne z wcześniejszą obserwacją, że mutacyjna eliminacja funkcji DnaA blokuje replikację plazmidu λ [26], i że w pewnych warunkach replikacja faga λ jest zależna od funkcji DnaA [27]. Białko DnaA regulujące przebieg cyklu komórkowego gospodarza może więc być jednym z czynników kontrolujących częstość inicjacji replikacji λ DNA [7].

III. Wiązanie bakteryjnej helikazy DnaB

Funkcja drugiego fagowego białka replikacyjnego — λ P, polega na przyłączeniu bakteryjnej helikazy DnaB do kompleksu inicjacyjnego *ori λ - λ O*. Białko DnaB jest helikazą DNA odpowiedzialną za przesuwanie widełek replikacyjnych w procesie replikacji chromosomu bakteryjnego [28]. W komórce występuje w postaci heksamery w kompleksie z 6 cząsteczkami bakteryjnego białka DnaC [29]. Rolą białka DnaC jest umożliwienie specyficznego oddziaływania helikazy DnaB z kompleksem inicjacyjnym *oriC*DNA-DnaA [30, 31].



Ryc. 1 Hipotetyczny udział bakteryjnych białek opiekuńczych oraz polimerazy RNA w procesie inicjacji replikacji λ DNA.

1. Aktywacja transkrypcyjna umożliwia powstanie aktywnego kompleksu preprimosomu $ori\lambda-\lambda O(\lambda P-DnaB)_2$.
2. Bakteryjne białka szoku termicznego DnaK, DnaJ/GrpE aktywują helikazę DnaB powodując dysocjację białka λP . Prowadzi to do jednokierunkowej replikacji λ DNA.
3. Transkrypcja przechodząca przez sekwencję $ori\lambda$ powoduje dysocjację kompleksu O-somu. Umożliwia to włączenie drugiego kierunku replikacji DNA.
- 3'. Czasowe zahamowanie transkrypcji, lub aktywności ClpX prowadzi do zablokowania ruchu widełek replikacyjnych powodując włączenie jednokierunkowej replikacji λ DNA zachodzącej zgodnie z mechanizmem σ .
4. Białka bakteryjnego aparatu replikacyjnego wiążą się do λ DNA.

Fagowe białko λ P konkuruje z bakteryjnym białkiem DnaC o wiązanie z helikazą DnaB. *In vitro*, wykazano wiązanie białka λ P do kompleksu DnaB-DnaC. Nie wiadomo jednak czy w wyniku wiązania λ P dochodzi do uwolnienia DnaC, czy też tworzy się trójskładnikowy kompleks DnaB-DnaC- λ P [32, 33]. Również stechiometria kompleksu λ P-DnaB nie jest dokładnie znana. Przypuszczalnie do heksamery DnaB przyłączone są 2 cząsteczki λ P [32]. Wiązanie λ P z DnaB hamuje ATPazową oraz helikazową aktywność białka DnaB, co z kolei powoduje zahamowanie replikacji chromosomu bakteryjnego [28, 32, 33]. Utworzenie kompleksu λ P-DnaB prowadzi do powstania nukleoproteinowego kompleksu *ori λ - λ O- λ P-DnaB* tzw. preprimosomu [8-10]. Przypuszczalnie dwa heksamery DnaB modyfikowane przez λ P wiążą się z sekwencją *ori λ* dzięki oddziaływaniu z C-końcową domeną białka λ O [19]. Oddziaływanie pomiędzy białkami λ O i λ P, chociaż wykryte *in vivo* i *in vitro* [34], jest prawdopodobnie zbyt słabe, aby mogło być jedyną siłą stabilizującą kompleks preprimosomu. Według hipotezy zaproponowanej przez zespół *McMackenna* [19] preprimosom tworzący się na ujemnie superhelikalnej matrycy DNA zamraża „otwartą” konformację DNA w rejonie *ori λ* bogatym w pary AT. W pierwszej fazie tworzenia preprimosomu jedynie białka λ O i λ P bezpośrednio oddziałują z DNA. Helikaza DnaB miałaby być następnie przenoszona pomiędzy częściowo rozdzielone komplementarne nici DNA. Sugeruje się, że ten ostatni proces może być uzależniony od aktywacji transkrypcyjnej *ori λ* [19]. Inni autorzy, w oparciu o badanie genetyczne, sugerują bezpośredni udział białka DnaK w reakcji wiązania helikazy DnaB z matrycą DNA [35].

IV. Aktywacja preprimosomu prowadzi do jednokierunkowej replikacji λ DNA

Dzięki zastosowaniu systemu replikacji złożonego z oczyszczonych białek wykazano, że kompleks preprimosomu *ori λ - λ O- λ P-DnaB* jest nieaktywny [8-10]. Silne oddziaływanie pomiędzy białkami λ P i DnaB i przypuszczalnie między λ O i DnaB stabilizują strukturę preprimosomu, jednocześnie jednak hamują aktywność DnaB. Aktywacja helikazy DnaB wymaga udziału bakteryjnych białek szoku termicznego DnaK/DnaJ/GrpE, zaliczanych także do rodziny białek opiekuńczych. Molekularny mechanizm działania tych białek został dość dokładnie poznany [1, 36]. Konformacja białka DnaK i jego powinowactwo do białkowych substratów zależy od tego czy białko DnaK związane jest z ATP czy też z ADP. Po hydrolizie ATP, DnaK przyjmuje konformację nazywaną DnaK*-ADP charakteryzującą się niskim powinowactwem do białkowych substratów, w tym do λ P [36-38]. Czynnikiem warunkującym specyficzne wiązanie DnaK z kompleksem preprimosomu jest białko DnaJ, które oddziałuje ze znajdującymi się

w preprimosomie białkami λ P i DnaB [39]. Białko DnaJ indukuje zmianę konformacji DnaK prowadząc do wytworzenia stabilnego kompleksu pomiędzy DnaK a białkami preprimosomu. Następnie, w obecności ATP, białko GrpE powoduje wymianę ADP związanego z DnaK na ATP. Hydroliza ATP powoduje powrót do konformacji DnaK*-ADP charakteryzującej się niskim powinowactwem do substratu. Rezultatem tego zależnego od ATP cyklu reakcji jest uwolnienie białek λ P i DnaK z kompleksu preprimosomu [1, 9, 40, 41]. Białko λ O nie zostaje uwolnione z kompleksu prawdopodobnie dlatego, że powinowactwo DnaJ do λ O jest znacznie niższe niż do λ P [37].

Odpowiednia topologia sekwencji DNA obejmującej *ori λ* jest niezbędna w procesie aktywacji preprimosomu. Kompleks preprimosomu może być utworzony na liniowej cząsteczce DNA, jednak taki kompleks nie może być aktywowany przez białka szoku termicznego (*Ž y l i c z M* — wyniki nieopublikowane). Uwolnienie białka λ P aktywuje helikazę DnaB, która zaczyna rozwijać podwójną nić DNA tworząc strukturę widełek replikacyjnych [9, 10]. Następnie kolejne replikacyjne białka bakteryjne (primaza-DnaG, białko wiążące pojedynczą nić DNA-Ssb, holoenzym polimerazy III DNA, gyraza Gyr A/B) przyłączają się do matrycy DNA tworząc kompleks replikacyjny. Synteza potomnych nici λ DNA zachodzi prawdopodobnie zgodnie z mechanizmem zaproponowanym dla replikacji chromosomu bakteryjnego [12].

Mechanizm wiązania helikazy DnaB i aktywacji preprimosomu z udziałem fagowego białka λ P oraz bakteryjnych białek opiekuńczych DnaK/DnaJ/GrpE może być specyficzną adaptacją faga λ służącą do replikacji swojego DNA w komórce *E. coli*. Wyniki prowadzonych ostatnio badania nad mutantem białka λ P pozwoliły na zaproponowanie hipotetycznego scenariusza powstania tej adaptacji [33]. Od dawna znane były punktowe mutanty w genie λ P, które pozwalały na efektywne namnażanie się bakteriofaga λ w szczepach *E. coli* zawierających mutacje w genach *dnaK/dnaJ/grpE*, w których niezmutowany fag λ nie może się namnażać [42]. Badania biochemiczne wykazały, że zmutowane białko λ P nazywane $\lambda\pi$, jest aktywne w replikacji λ DNA *in vitro*, ale jego powinowactwo do kompleksu DnaB-DnaC jest około 10-krotnie mniejsze niż białka λ P. Z powodu obniżonego powinowactwa do helikazy DnaB utworzony kompleks preprimosomu jest znacznie mniej stabilny niż kompleks utworzony z udziałem białka λ P. To z kolei powoduje zmniejszone zapotrzebowanie na białko DnaK niezbędne w reakcji aktywacji helikazy. Stwierdzono, że około 10-krotnie mniejsze stężenie białka DnaK jest wystarczające do aktywacji replikacji λ DNA zależnej od $\lambda\pi$. Również zmutowane białko *Dnak756* całkowicie nieaktywne w standardowej replikacji λ DNA *in vitro*, było aktywne w systemie replikacji zależnym od białka $\lambda\pi$ [33]. Wyniki te wskazują, że udział białek DnaK/DnaJ/GrpE w ak-

tywacji helikazy DnaB jest uzależniony od siły oddziaływania pomiędzy białkami λ P i DnaB. Zaproponowano więc następujący scenariusz ewolucyjny [33]: (1) Przodkowie faga λ nie dysponowali białkiem λ P o wysokim powinowactwie do DnaB i konkurencja pomiędzy białkami DnaC i λ P o wiązanie do helikazy DnaB była uzależniona od stosunku stężeń obu białek. Wiązało się to z dłuższym cyklem replikacyjnym faga, gdyż potrzebował on więcej czasu na syntezę wystarczającej ilości białka λ P. (2). Presja selekcyjna w kierunku szybszej replikacji λ DNA doprowadziła do powstania białka λ P charakteryzującego się wysokim powinowactwem do helikazy DnaB. Wynikiem tej adaptacji było powstanie bardziej stabilnego kompleksu preprimosomu wymagającego aktywacji przy współudziale bakteryjnych białek opiekuńczych DnaK/DnaJ/GrpE. (3) Ponieważ infekcja fagowa prowadzi do wzrostu stężenia białek szoku termicznego w komórce *E. coli*, w tym również białek DnaK/DnaJ/GrpE [43], wewnątrzkomórkowe środowisko sprzyjało powstaniu nowej adaptacji. Przyjęcie takiego założenia prowadzi do wniosku, że udział białek DnaK/DnaJ/GrpE w aktywacji preprimosomu jest ewolucyjnie nową, unikalną adaptacją bakteriofaga λ do pasożytniczego trybu namnażania w komórce *E. coli*.

V. Uruchomienie drugiego kierunku replikacji λ DNA

Wczesna replikacja λ DNA zachodzi dwukierunkowo zgodnie z modelem θ . *In vitro*, w reakcji replikacji λ DNA katalizowanej przez ekstrakt bakteryjny wzbogacony o fagowe białka replikacyjne obserwowano również dwukierunkową replikację. Jednak w systemie replikacji λ DNA odtworzonym z oczyszczonych białek fagowych i bakteryjnych zaobserwowano replikację jednokierunkową. Zablockowanie drugiego kierunku replikacji w systemie oczyszczonym może wynikać z dwóch przyczyn: (1) niesymetrycznej struktury preprimosomu oraz (2) ograniczonej wydajności reakcji aktywacji helikazy DnaB.

M c M a c k e n i w s p. zaproponowali niesymetryczną strukturę kompleksu preprimosomu [6]. Według tych autorów dwa heksamery helikazy DnaB związane są z sekwencją DNA bogatą w pary AT, zlokalizowaną na prawo od kompleksu O-somu (Ryc. 1) W związku z tym uaktywniona przez działanie białek DnaK/DnaJ/GrpE helikaza DnaB znajdująca się z prawej strony kompleksu preprimosomu może bez przeszkód rozwijać dwuniciowe DNA w kierunku na prawo od sekwencji *ori* λ . Cząsteczka helikazy zlokalizowana w bezpośrednim sąsiedztwie O-somu (rozwijająca DNA w kierunku na lewo od sekwencji *ori* λ) może na swojej drodze napotykać kompleks *ori* λ - λ O będący pozostałością preprimosomu po działaniu białek DnaK/DnaJ/GrpE [6, 44]. W ten sposób może dochodzić do zablokowania jednego kierunku

replikacji. Uruchomienie tego kierunku replikacji wymagałoby zarówno uwolnienia białka λ O z kompleksu z DNA jak i jego degradacji zapobiegającej ponownemu powstaniu struktury O-somu. Zgodnie z wynikami przedstawionymi przez zespół M c M a c k e n a, transkrypcja rozpoczynająca się od zlokalizowanego w okolicy *ori* λ promotora p_R powoduje częściowe włączenie drugiego kierunku replikacji. Reakcja ta odtworzona *in vitro* nie jest jednak wydajna, gdyż tylko ok. 30% badanych cząsteczek λ DNA ulega dwukierunkowej replikacji [6]. Białko λ O jest niestabilne *in vivo*, jego degradację katalizuje proteaza ClpP przy współudziale ATPazy ClpX nadającej specyficzność substratową reakcji proteolizy. [45-47]. Badania *in vitro* wskazują na to, że białko λ O w kompleksie preprimosomu jest chronione przed działaniem proteazy ClpXP. Dopiero przejście kompleksu transkrypcyjnego pozwala na jego efektywną degradację co sugeruje, że zarówno transkrypcyjna aktywacja jak i ClpXP-zależna proteoliza uczestniczą w usuwaniu białka λ O z kompleksu z *ori* λ , a tym samym być może w uruchamianiu drugiego kierunku replikacji λ DNA (W a r z y n ó w A, Ż y l i c z M — wyniki nieopublikowane).

Drugą przyczyną jednokierunkowej replikacji λ DNA może być ograniczona wydajność reakcji aktywacji helikazy DnaB [1, 41] związanej z kompleksem preprimosomu. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że po działaniu białek szoku termicznego pewna ilość białka λ P pozostaje związana z helikazą DnaB. Prawdopodobnie jedynie te cząsteczki helikazy DnaB, które po działaniu białek DnaK/DnaJ/GrpE zostały uwolnione od białka λ P są aktywne w rozwijaniu dwuniciowego DNA. Tak więc, jeżeli po działaniu białek szoku termicznego helikaza DnaB zlokalizowana w pobliżu O-somu nie zostanie uwolniona od λ P to jeden kierunek replikacji λ DNA pozostanie nieaktywny. Takie częściowo zaktywowane kompleksy preprimosomu mogą również powstawać *in vivo*, zwłaszcza gdy do replikacji λ DNA dochodzi w warunkach stresu termicznego lub głodu aminokwasowego. W warunkach stresu białka szoku termicznego zaangażowane są w wielu procesach komórkowych związanych z ochroną przed jego skutkami. Tak więc efektywne stężenie tych białek w komórce może być znacznie obniżone, co może prowadzić do mniej wydajnej reakcji aktywacji preprimosomu. Nie wiemy jakie są dalsze losy takiego „okrojonego” kompleksu preprimosomu, być może jest on stabilny i pozostaje związany z λ DNA przez cały cykl replikacyjny (patrz dyskusja poniżej).

Ostatnio zaproponowano hipotezę dziedziczenia kompleksu replikacyjnego faga λ [7, 48]. Autorzy sugerują, że w wyniku działania białek DnaK/-DnaJ/GrpE nie dochodzi do dysocjacji białka λ P a jedynie do zniwelowania hamującego wpływu tego białka na aktywność helikazy DnaB. W skład kompleksu replikacyjnego po aktywacji wchodziłyby więc

obydwa białka fagowe. Taki wniosek autorzy opierają na danych wykazujących istnienie w komórce zawierającej replikujący się λ DNA niewielkiej frakcji białka λ O odpornej na proteolizę [34, 49, 50]. Autorzy ci wykazali również, że frakcja ta ulega proteolizie po indukcji termicznej białek GroEL i GroES [51]. Wyniki te sugerują, że nie tylko białka DnaK/-DnaJ/GrpE mają wpływ na stabilność kompleksu replikacyjnego faga λ . Kompleks replikacyjny zawierający białka λ O i λ P mógłby być trwale związany z jedną z nici DNA i dziedziczony po podziale komórki gospodarza. O dziedziczeniu kompleksu miałyby świadczyć fakt, że po indukcji głodu aminokwasowego synteza λ DNA jest kontynuowana w warunkach braku syntezy fagowych białek replikacyjnych [48, 52-54]. Dotychczas nie ma jednak bezpośrednich dowodów biochemicznych wskazujących na to, że białka λ O i λ P wchodzi w skład fagowego kompleksu replikacyjnego przesuwanego się wzdłuż DNA i katalizującego syntezę nici potomnych. Do czasu uzyskania takich dowodów można przyjąć alternatywną interpretację uzyskiwanych wyników. Dziedziczonym kompleksem replikacyjnym może być preprimosom zawierający jedną lub dwie cząsteczki helikazy DnaB, które pomimo działania białek szoku termicznego nie zostały uwolnione z kompleksu z białkiem λ P [1, 41]. Kompleks *ori λ - λ O- λ P-DnaB* jest najbardziej stabilnym intermediatem replikacji λ DNA. Ponadto, kompleks taki najskuteczniej chroni przed proteolizą związane z nim białko λ O (W a w r z y n ó w A, Ż y l i c z M — wyniki nieopublikowane). W związku z tym można przyjąć, że raz utworzony kompleks preprimosomu może przetrwać podział komórki gospodarza i zostać przekazany do komórek potomnych. Tam, pod warunkiem wystarczająco wysokiej aktywności białek szoku termicznego, może ulec aktywacji, co inicjuje kolejną rundę syntezy potomnych nici fagowego DNA bez konieczności syntezy fagowych białek replikacyjnych. Warto podkreślić jeszcze raz, że dziedziczeniu mogłyby ulegać dwa rodzaje kompleksów preprimosomu: zawierające dwie cząsteczki λ P-DnaB lub zawierające jedynie jedną cząsteczką λ P-DnaB. W tym ostatnim przypadku replikacja λ DNA inicjowana przez „o-krojony” kompleks preprimosomu, byłaby jednokierunkowa.

VI. Przełączenie replikacji dwukierunkowej θ na jednokierunkową zachodzącą zgodnie z mechanizmem σ

Wydażność dwukierunkowej replikacji λ DNA *in vitro* nie jest wysoka, jednak nawet *in vivo* zaobserwowano tendencję do jednokierunkowej replikacji genomu faga λ [6]. Być może jest to związane z mechanizmem odpowiedzialnym za przełączenie replikacji z typu θ na typ σ w późnej fazie infekcji fagowej. Replikacji typu σ nie badano dotychczas za pomocą metod biochemicznych, zaproponowano jednak hipo-

tetyczny mechanizm pozwalający na przełączenie typu replikacji [6]. Kolizja pomiędzy kompleksem replikacyjnym syntetyzującym wiodącą nic DNA a kompleksem nieaktywnego preprimosomu pozostałym po etapie inicjacji replikacji λ DNA miałyby prowadzić do odsunięcia końca 5' nici wiodącej i kontynuacji jej syntezy zgodnie z mechanizmem σ . Warunkiem takiej kolizji jest pozostanie po etapie inicjacji replikacji stabilnego kompleksu nieaktywnego preprimosomu związanego z sekwencją *ori λ* . Jak wspomniano wyżej, transkrypcja przechodząca przez region *ori λ* powoduje między innymi uwolnienie białka λ O związanego z DNA. W późnej fazie infekcji fagowej transkrypcja ta jest prawdopodobnie wyłączona bądź poprzez działanie fagowego represora Cro [6], lub też, jak postulowano ostatnio, na skutek wyłączenia aktywacji transkrypcyjnej wynikającej z obniżenia stężenia bakteryjnego białka DnaA [7]. Również białka opiekuńcze mogą potencjalnie uczestniczyć w zmianie typu replikacji. Zahamowanie aktywności ClpX może prowadzić do stabilizacji kompleksu *ori λ - λ O* i w efekcie do przełączenia replikacji na typ σ [17, 47]. Prowadzone ostatnio badania genetyczne wykazały, że w warunkach stresowych wywołanych przez głód aminokwasowy kompleks preprimosomu jest stabilny i może być dziedziczony oraz ponownie wykorzystany w replikacji jednej z potomnych cząsteczek λ DNA. [48, 52-54]. Interesująca możliwość, że stabilizacja preprimosomu w warunkach głodu aminokwasowego powoduje przełączenie replikacji z dwukierunkowej na jednokierunkową, a w konsekwencji przejście do replikacji typu σ nie była dotychczas sprawdzona doświadczalnie.

VII. Podsumowanie

Wieloletnie badania genetyczne i biochemiczne doprowadziły do poznania sposobów wykorzystywania przez faga λ enzymatycznego aparatu gospodarza do własnych potrzeb. Znacznie mniej wiadomo na temat mechanizmów, które pozwalają bakteriofagowi λ wykorzystać białka opiekuńcze gospodarza do regulacji replikacji swojego genomu. Proponuję wyróżnić trzy klasy oddziaływań pomiędzy aparatem replikacyjnym faga λ a białkami opiekuńczymi gospodarza: (1) Białka opiekuńcze stabilizują białko inicjatorowe λ O [17] wykazujące tendencję do agregacji i inaktywacji. (Jest to uniwersalny, niewyspecjalizowany typ działania białek opiekuńczych występujący w przypadku wielu replikacyjnych białek bakteryjnych (DnaA, ssb) [24] oraz białek replikacyjnych kodowanych przez różne genomy replikujące się w komórce *E. coli* (plazmid P1-białko RepA, plazmid F-białko RepE) [55]. Białka opiekuńcze działają w tym przypadku na zasadzie molekularnych detergentów zapobiegających agregacji wielu białek komórkowych [5]. (2) Proteoliza białka λ O katalizowana przez proteazę ClpXP wymaga bardziej precyzyjnej regulacji. (Ostatnio zaproponowano, że stabilność kompleksu substrat

białkowy-ClpX decyduje o tym czy związane białko jest chronione czy też degradowane przez proteazę ClpXP [56]. Adaptacja faga λ do wykorzystania funkcji ClpX w replikacji λ DNA mogłaby polegać na ewolucji takiej sekwencji aminokwasowej w białku λ O, która jest rozpoznawana przez system proteazy ClpXP.) (3) Najbardziej wyspecjalizowana funkcja białek opiekuńczych w replikacji DNA faga λ to aktywacja kompleksu preprimosomu polegająca na dysocjacji białka λ P. W tej reakcji białka DnaK/DnaJ/GrpE rozpoznają substrat λ P znajdujący się w kompleksie wielu białek związanych z DNA. Czynnikiem warunkującym specyficzność działania DnaK jest wiązanie białka DnaJ do substratu białkowego [37]. Nie wiemy jednak jaki jest molekularny sygnał (sekwencja aminokwasowa, konformacja łańcucha polipeptydowego) warunkujący specyficzność tego oddziaływania. Tak skomplikowanej sytuacji nie obserwuje się w procesie replikacji chromosomu bakteryjnego, ani w replikacji innych genomów zależnych od bakteryjnych białek opiekuńczych. Jedynie podczas replikacji bakteriofaga Mu dochodzi do podobnej sytuacji, gdy białko opiekuńcze ClpX w nieobecności ClpP katalizuje dysocjację tetrameru białka MuA związanego z DNA [57, 58].) Podsumowując należy podkreślić, że często spotykane stwierdzenie, iż bezpośredni udział białek opiekuńczych w replikacji DNA bakteriofaga λ wskazuje na uniwersalną rolę tych białek w replikacji prokariotycznego DNA, jest zbyt dużym uproszczeniem. Prawdopodobnie udział bakteryjnych białek opiekuńczych w replikacji λ DNA można uważać za unikalną adaptację bakteriofaga λ umożliwiającą bardziej efektywne wykorzystanie replikacyjnego aparatu gospodarza.

Artykuł otrzymano 30 lipca 1996 r.

Zaakceptowano do druku 27 sierpnia 1996 r.

Podziękowania

Dziękuję Prof. Maciejowi Żyliczowi za wnikliwą dyskusję, pomoc przy przygotowaniu tej pracy oraz udostępnienie nieopublikowanych wyników. Prof. Karolowi Taylorowi, Dr Krzysztofowi Liberekowi, Dr Grzegorzowi Węgrzynowi dziękuję za krytyczne przeczytanie manuskryptu.

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 6 P203 030 05.

Piśmiennictwo

- Zylicz M (1993) *Phil Trans R Soc London B* **339**: 271-278
- Skowyrza D, Żylicz M (1987) *Post Biochem* **33**: 259-276
- Lipińska B (1990) *Post Biochem* **36**: 32-42
- Liberek K (1995) *Post Biochem* **41**: 94-102
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) (1994) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Learn B, Karzai AW, McMacken R (1993) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **58**: 389-402
- Taylor K, Węgrzyn G (1995) *FEMS Microbiol Reviews* **17**: 109-119
- Alfano C, McMacken R (1989a) *J Biol Chem* **264**: 10699-10708
- Alfano C, McMacken R (1989b) *J Biol Chem* **264**: 10709-10718
- Zylicz M, Ang D, Liberek K, Georgopoulos C (1989) *EMBOJ* **8**: 1601-1608
- Liberek K, Osipiuk J, Żylicz M, Ang D, Skorko J, Georgopoulos C (1990) *J Biol Chem* **265**: 3022-3029
- Kornberg A, Baker T (1992) *DNA Replication* Freeman New York
- Tsurimoto T, Matsubara K (1981) *Nucleic Acids Res* **9**: 1789-1799
- Dodson M, Roberts J, McMacken R, Echols H (1985) *Proc Natl Acad USA* **82**: 4678-4682
- Echols H (1990) *J Biol Chem* **265**: 14697-14700
- LeBowitz JH, Żylicz M, Georgopoulos C, McMacken R (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3988-3992
- Wawrzynów A, Wojtkowiak D, Marszałek J, Banecki B, Jonsen M, Graves B, Georgopoulos C, Żylicz M (1995) *EMBOJ* **14**: 1867-1877
- Schnos M, Zahn K, Inman RB, Blattner (1988) *Cell* **52**: 385-395
- McMacken R, Learn B, Chung S-H, Kimball AS, Huang L, Um S-J, Sampath DS (1996) *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Molecular mechanisms in DNA replication and recombination*. Streszczenia: **15**
- Baker TA, Sekimizu K, Funnel BE, Kornberg A (1986) *Cell* **45**: 53-64
- Dove WF, Inokuchi H, Stevens WF (1971) *The bacteriophage lambda*. Hershey AD red. str. 747 Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Yamamoto T, McIntyre J, Sell SM, Georgopoulos C, Skowyrza D, Żylicz M (1987) *J Biol Chem* **262**: 7996-7999
- Mensa-Wilmot K, Carrol K, McMacken R (1989) *EMBOJ* **8**: 2393-2398
- Marszałek J (1994) *Post Biochem* **40**: 200-210
- Węgrzyn G, Szalewska-Palasz A, Węgrzyn A, Obuchowski M, Taylor K (1995) *Gene* **154**: 47-50
- Kur J, Górska I, Taylor K (1987) *J Mol Biol* **198**: 203-210
- Węgrzyn G, Węgrzyn A, Konieczny I, Bielawski K, Konopa G, Obuchowski M, Helinski DR, Taylor K (1995) *Genetics* **139**: 1469-1481
- LeBowitz JH, McMacken R (1986) *J Biol Chem* **261**: 4738-4748
- Wahle E, Lasken RS, Kornberg A (1989) *J Biol Chem* **264**: 2463-2468
- Marians KJ (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 673-719
- Marszałek J, Kaguni JM (1994) *J Biol Chem* **269**: 4883-4890
- Mallory JB, Alfano C, McMacken R (1990) *J Biol Chem* **265**: 13297-13307
- Konieczny I, Marszałek J (1995) *J Biol Chem* **270**: 9792-9799
- Zylicz M, Gorska I, Taylor K, Georgopoulos C (1984) *Mol & Gen Genet* **196**: 401-406
- Węgrzyn A, Węgrzyn G, Taylor K (1995) *Virology* **207**: 179-184
- Banecki B, Żylicz M (1996) *J Biol Chem* **271**:
- Wawrzynów A, Żylicz M (1995) *J Biol Chem* **260**: 19300-19306
- Wawrzynów A, Banecki B, Wall D, Liberek K, Georgopoulos C, Żylicz M (1995) *J Biol Chem* **270**: 19307-19311
- Osipiuk J, Georgopoulos C, Żylicz M (1993) *J Biol Chem* **268**: 4821-4827
- Liberek K, Georgopoulos C, Żylicz M (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6632-6636
- Dodson M, McMacken R, Echols H (1989) *J Biol Chem* **264**: 10719-10725
- Georgopoulos C, Herskowitz I (1971) *The bacteriophage Lambda*. Hershey ED red. str.: 191-221, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Drahoš DJ, Hendrix RW (1982) *J Bacteriol* **149**: 1050-1063
- Dodson MH, Echols H, Wickner S, Alfano C, Mensa-Wilmot K, Gomes B, LeBowitz J, Roberts JD, McMacken R (1986) *Proc Natl Acad Sci* **83**: 7638-7642

45. Gottesman S, Clark WP, de Crecy-Lagard V, Maurizi MR (1993) *J Biol Chem* **268**: 1-9
46. Bejarano I, Klemens Y, Schoulaker-Schwarz R, Engelberg-Kulka H (1993) *J Bacteriol* **175**: 7720-7723
47. Wojtkowiak D, Georgopoulos C, Zylicz M (1993) *J Biol Chem* **268**: 22609-22617
48. Węgrzyn G, Taylor K (1992) *J Mol Biol* **226**: 681-688
49. Węgrzyn G, Pawłowicz A, Taylor K (1992) *J Mol Biol* **226**: 675-680
50. Pawłowicz A, Węgrzyn G, Taylor K (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 29-31
51. Węgrzyn A, Węgrzyn G, Taylor K (1996) *Virology* **217**: 594-597
52. Węgrzyn G, Neubauer P, Krueger S, Hecker M, Taylor K (1992) *Mol Gen Genet* **225**: 94-98
53. Węgrzyn A, Węgrzyn G (1995) *Biochim Biophys Res Com* **214**: 978-984
54. Węgrzyn G (1995) *J Biotech* **43**: 139-143
55. Chattoraj DK (1995) *Genet Eng (NY)* **17**: 81-98
56. Wawrzynów A, Banecki B, Zylicz M (1996) *Molec Microbiol* **21**: 895-899
57. Levchenko I, Luo L, Baker TA (1995) *Genes Dev* **9**: 2399-2408
58. Krukłitis R, Welty DJ, Nakai H (1996) *EMBOJ* **15**: 935-944

Liniowy chromosom prokariotyczny; struktura i synteza telomerów

Linear prokaryotic chromosome; structure and synthesis of telomers

MAŁGORZATA ŻARKO-POSTAWKA¹
JOLANTA ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Liniowy chromosom prokariotyczny
- III. Struktura prokariotycznych telomerów
- IV. Replikacja liniowych chromosomów prokariotycznych — synteza telomerów
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Linear prokaryotic chromosome
- III. Structure of prokaryotic telomers
- IV. Replication of linear chromosomes — synthesis of telomers
- V. Conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: TIR — terminalne odwrócone sekwencje powtórzone (ang. *terminal inverted repeats*); mt — mitochondrialny; PFGE — elektroforeza w pulsującym polu elektrycznym (ang. *pulsed field gel electrophoresis*); *oriC* — miejsce inicjacji replikacji DNA (ang. *chromosomal origin*); *ter* — miejsce terminacji (ang. *termination*); TP — białko terminalne (ang. *terminal protein*).

I. Wstęp

Wielkość chromosomu prokariotycznego waha się od 0.6-0.8 Mbp u *Mycoplasma* [1-3] do 9.5 Mbp u *Myxococcus xanthus* [4]. Dotychczas uważano, że chromosom bakteryjny w odróżnieniu od liniowego

chromosomu eukariotycznego, jest kowalencyjnie zamkniętą kolistą cząsteczką dwuniciowego DNA. Wprowadzenie w połowie lat 80. techniki elektroforezy DNA w pulsującym polu elektrycznym (PFGE — *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) [5, 6] umożliwiło rozdział zarówno dużych fragmentów chromosomu, jak i całych chromosomów w żelach agarozowych. Dzięki tej technice wyznaczono wielkości chromosomów, sporządzono ich fizyczne mapy oraz zlokalizowano poszczególne geny na mapie fizycznej chromosomów wielu gatunków bakterii [7]. Analizując za pomocą PFGE mapy fizyczne u bakterii niektórych gatunków stwierdzono, że ich chromosomy występują w formie liniowej typowej dla organizmów eukariotycznych.

II. Liniowy chromosom prokariotyczny

Pierwszą poznaną liniową cząsteczką DNA u pro-

¹Mgr, Syngen Biotech, ul. Trzemeska 12, 53-679 Wrocław,
²dr hab., Zakład Mikrobiologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław

kariota był plazmid pSLA2 wyizolowany ze *Streptomyces rochei* w 1979 r. [8]. Od tego czasu wyizolowano wiele innych liniowych plazmidów z organizmów należących do rodzaju *Borrelia* [9], *Nocardia* [10], *Rhodococcus* [11], *Streptomyces* [8, 12] i *Thiobacillus* [13]. Ich wielkość mieści się w zakresie od 3.7 do 1700 kpz (Tab. 1). Pod koniec lat 80. pojawiły się pierwsze doniesienia dotyczące liniowego charakteru chromosomu bakteryjnego. A zatem, dotychczasowy dogmat o podziale chromosomów na liniowe, charakterystyczne dla organizmów eukariotycznych oraz kółście zamknięte, charakterystyczne dla *Prokaryota* został podważony.

Pierwszym poznany liniowym chromosomem bakteryjnym był chromosom spirobakterii *Borrelia burgdorferi*. Inne liniowe chromosomy dotychczas poznane, to pochodzące z *Agrobacterium tumefaciens* [14], *Rhodococcus fascians* [11] czy *Streptomyces*. Ich wielkość wynosi od 0.96 Mpz [9, 15] do 8 Mpz [16] (Tab. 1). W przypadku *Streptomyces* obecność liniowej formy cząsteczki stwierdzono u wszystkich dotychczas badanych gatunków w tym organizmów modelowych *S. coelicolor* i *S. lividans* [17, 18].

Obecność liniowego chromosomu stwierdzono na podstawie rozdziału cząsteczek DNA za pomocą elektroforezy w pulsującym polu elektrycznym. Wbrew temu, że duże, kółście zamknięte cząsteczki DNA nie migrują w żelu agarozowym podczas PFGE, zauważono wysokocząsteczkowe pasma pochodzące od genomowego DNA, zbliżone wielkością do określonej wcześniej innymi metodami wielkości chromosomu. Możliwość, że pasma te pochodzą od superskręconej, kolistej cząsteczki DNA wykluczono wprowadzając nacięcia w pojedynczych niciach, powodujące relaksację superskręconej cząsteczki. Nacięcia te nie miały wpływu na przebieg elektroforezy [14]. Wyniki tych doświadczeń dowodzą liniowego charakteru chromosomu.

U *Streptomyces*, których liniowa cząsteczka chromosomu posiada przyłączone kowalencyjnie do 5' końców białka, porównywano migrację DNA trawionego i nie trawionego proteinazą K [17]. W pierwszym przypadku obserwowano migrację liniowego DNA, natomiast próbki nie trawione enzymem nie migrowały w żelu agarozowym. Z dotychczasowych badań wynika, że istnieje związek pomiędzy obecnością liniowych plazmidów, a występowaniem liniowej formy chromosomu u bakterii. Elementy liniowego replikonu nie wykluczają jednak istnienia form kółście zamkniętych w tej samej komórce. *Agrobacterium tumefaciens* C58 to mikroorganizm posiadający 2 chromosomy, z których jeden jest liniowy a drugi kolisty [14].

III. Struktura prokariotycznych telomerów

Liniowe cząsteczki DNA chromosomów eukariotycznych zakończone są telomerami — charakterystycznymi sekwencjami nukleotydowymi zbudowanymi

Tabela 1.

Wielkość bakteryjnych liniowych replikonów

Organizm	Wielkość liniowego chromosomu [Mpz]*
<i>Borrelia</i> spp.	0.96-1.0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2.1
<i>Rhodococcus fascians</i>	4
<i>Streptomyces</i> spp.	8
	Wielkość liniowego plazmidu [kpz]
<i>Thiobacillus versutus</i>	3.7
<i>Borrelia</i> spp.	5-200
<i>Rhodococcus fascians</i>	200
<i>Nocardia opaca</i>	180-510
<i>Streptomyces</i> spp.	9-1700

* wartość wyznaczona za pomocą PFGE (elektroforeza w pulsującym polu elektrycznym).

z prostych, tandemowo powtórzonych sekwencji. Sekwencję powtarzających się odcinków DNA wyrazić można wzorem: $C_n(A/T)_m$, gdzie $n \geq 1$ i $1 \leq m \leq 4$ [19].

Funkcja telomerów eukariotycznych polega na stabilizacji chromosomu, zapobieganiu jego skracaniu oraz przeciwdziałaniu fuzjom i rearanżacjom DNA prowadzącym do zmian kariotypowych [19-22]. Zmiany tego typu występują często w komórkach nowotworowych [23].

Wśród liniowych replikonów prokariotycznych wyróżniono dwa typy telomerów: o strukturze „szpilki do włosów” i inwertrony (Tab. 2).

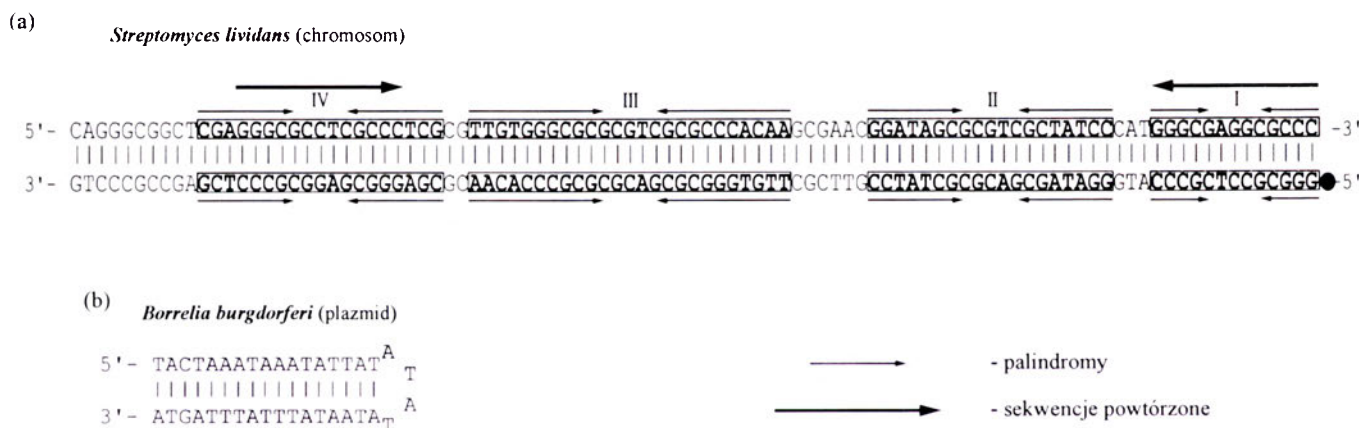
Struktura „szpilki do włosów” występuje między innymi na końcach liniowych plazmidów *Borrelia burgdorferi* (Ryc. 1b). W regionie tym występują odwrócone sekwencje powtórzone i palindromy. Telomery te zakończone są pętlami bogatymi w nukleotydy A-T [24-26].

Inwertrony występują na końcach liniowych replikonów *Streptomyces* (Ryc. 1a). Cechy charakterystyczne tego typu telomerów to liczne odwrócone sekwencje powtórzone oraz białka kowalencyjnie związane do 5' końca. Wielkość odwróconych sekwencji powtórzonych wynosi od 44 pz do 80 kpz w przypadku plazmidów gigantycznych (Tab. 3). Zaobserwować tu można również obecność sekwencji podobnych do sekwencji insercyjnych [8, 26]. Analiza przeprowadzona za pomocą hybrydyzacji Southerna wykazała brak homologii sekwencji telomerów u różnych gatunków *Streptomyces* [27, 28]. Jak tłumaczyć tak dużą różnorodność sekwencji końcowych, przy tak znacznym, zdawałoby się konserwatyźmie struktury telomerów? Jaki wpływ mają te różnice na mechanizmy stabilizacji i replikacji cząsteczki DNA u *Prokaryota*? Pytania te mimo wielu przeprowadzonych badań, nadal wymagają odpowiedzi.

Tabela 2.

Bakteryjne telomery

Struktura telomeru	Charakterystyczne cechy	Prokaryota	Przykłady eukariotycznych replikonów	
			wirusy i plazmidy	organellowy DNA
Struktura szpilki do włosów	sekwencje TIR; palindromy	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Borrelia burgdorferi</i>: <ul style="list-style-type: none"> — liniowe plazmidy; — chromosom; • N15 profag (<i>E. coli</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • genomy wirusowe <ul style="list-style-type: none"> — poxwirusy; — wirusy <i>Chlorella</i>; — wirus gorączki afrykańskich świń 	<ul style="list-style-type: none"> • mt DNA (drożdże); • mt liniowe plazmidy (grzyby)
Inwertrony	sekwencje TIR; białka kowalencyjnie przyłączone do 5' końca	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptomyces</i>: <ul style="list-style-type: none"> — liniowe plazmidy; — chromosom; • bakteriofagi: <ul style="list-style-type: none"> — ϕ29 (<i>B. subtilis</i>); — PRD1 (<i>E. coli</i>); — HB-3 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • adenowirusy; • cytoplazmatyczne, liniowe plazmidy (grzyby) 	<ul style="list-style-type: none"> • mt liniowe plazmidy (grzyby, rośliny)



Ryc. 1. Struktury bakteryjnych telomerów.

Tabela 3.

Odwrócone sekwencje powtórzone *Streptomyces*

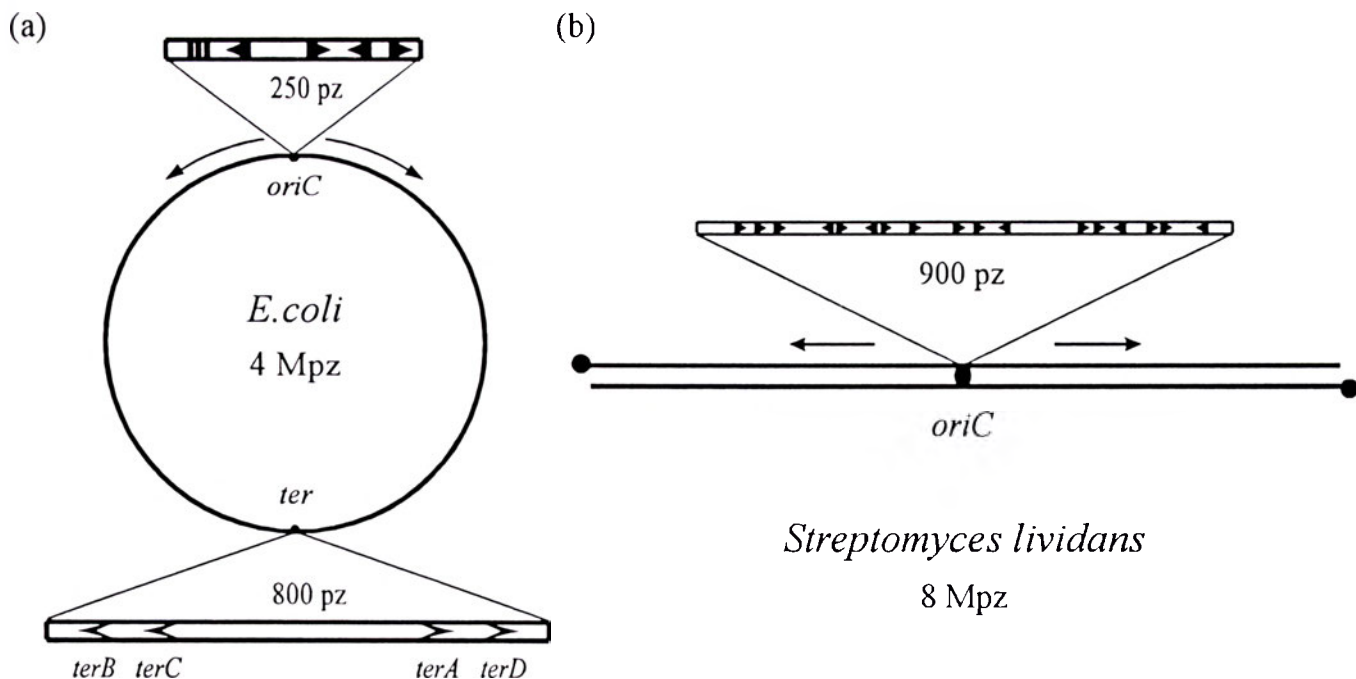
Organizm	Liniowa cząsteczka	Wielkość odwróconych sekwencji powtórzonych
<i>S. rochei</i>	plazmid pSLA2	614 pz
<i>S. clavuligerus</i>	plazmid pSCL	900 pz
<i>S. lividans</i> 66	plazmid pSLP2 chromosom	44 pz 25 kpz
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	plazmid pSCP1	80 kpz
<i>S. griseus</i>	chromosom	24 kpz

IV. Replikacja liniowych chromosomów prokariotycznych — synteza telomerów

Proces replikacji DNA został najlepiej poznany u *Escherichia coli* [29]. Replikacja u *E. coli* rozpoczyna się w ściśle określonym miejscu na chromosomie — *oriC* (ang. *chromosomal origin*) i przebiega dwukierunkowo (Ryc. 2a). Proces replikacji kończy się gdy widełki replikacyjne spotykają się w regionie terminatorowym (*ter*) [29].

W jaki sposób odbywa się replikacja DNA linio-

wych chromosomów? U *Borellia* [9, 30, 31] i *Streptomyces* [17, 32] region *oriC* jest zlokalizowany w połowie liniowej cząsteczki DNA (Ryc. 2b). Struktura tego regionu jest zbliżona do struktury regionu *oriC* bakterii posiadających chromosomy kolistę zamknięte. Doświadczenia *in vivo* i *in vitro* nad mechanizmem inicjacji replikacji DNA u *Streptomyces* wykazały, że nie ma istotnych różnic w mechanizmie inicjacji replikacji chromosomów liniowych i kolistych. Inicjatorowe białko DnaA łącząc się z 9-cio merowymi odcinkami dwuniciowego DNA (tzw. boksy DnaA, Ryc. 2) w regionie *oriC* powoduje odkształcenie, a następnie rozdzielenie obu nici DNA w obrębie 13-sto merowych sekwencji bogatych w pary AT. U *E. coli*, białko DnaA umożliwia także wprowadzenie kompleksu helikazy DnaB-DnaC w miejsce lokalnie rozpleczonego DNA [29]. Rozplatanie dwuniciowego DNA przebiega w dwóch kierunkach począwszy od *oriC*, podczas przesuwania się helikazy DnaB wzdłuż DNA. Powstaje w ten sposób matryca dla primingu i enzymów uczestniczących w syntezie obu nici DNA. U *E. coli* i *Bacillus subtilis*, organizmów posiadających koliste chromosomy, ruch widełek replikacyjnych ulega zatrzymaniu w obrębie regionu terminatorowego



- - sekwencje bogate w AT
- ▶ - DnaA boksy
- ◀ - sekwencje terminatorowe

Ryc. 2. Struktura regionu inicjacji (*oriC*) i terminacji (*ter*) replikacji DNA u bakterii posiadających (a) kolisty chromosom, (b) liniowy chromosom. Strzałkami zaznaczono kierunek ruchu widełek replikacyjnych.

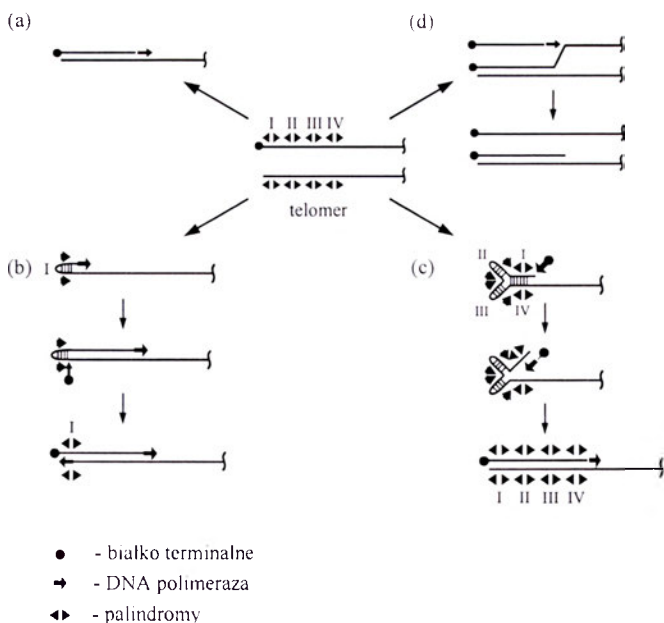
(*ter*), który jest zlokalizowany naprzeciwko regionu *oriC* (Ryc. 2a) [33, 34]. Dla obu tych mikroorganizmów region *ter* został stosunkowo dobrze scharakteryzowany. U *E. coli* region *ter* obejmuje około 800 pz, a na jego obu końcach występują po dwie powtórzone 22-nukleotydomowe sekwencje terminatorowe (*terA*, *terB*, *terC*, *terD*, Ryc. 2a). Do sekwencji tych specyficznie wiąże się białko Tus, które jest inhibitorem helikazy DnaB [35-37]. Białko Tus hamuje aktywność helikazy DnaB tylko wówczas, gdy zwiąże się ono do sekwencji *ter* o orientacji zgodnej z ruchem widełek replikacyjnych. A zatem widełki poruszające się zgodnie z ruchem wskazówek są zatrzymywane przez sekwencje *terC* i *terD*, natomiast widełki replikacyjne poruszające się w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek są „aresztowane” przez sekwencje *terA* i *terB* [38, 39].

Dotychczas niewiele wiadomo na temat mechanizmu terminacji replikacji DNA u bakterii posiadających liniowe chromosomy. Wszystkie pro- i eukariotyczne polimerazy DNA syntetyzują DNA tylko w kierunku 5' → 3' [29]. Synteza DNA na matrycy zorientowanej w kierunku 3' → 5' odbywa się w sposób ciągle, a nici przeciwnie zorientowanej w sposób nieciągle, poprzez fragmenty Okazaki. Następnie są usuwane startery RNA z nowosyntetyzowanych fragmentów DNA a powstałe po nich luki uzupełniane. Na koniec fragmenty te są łączone za pomocą ligazy. Ponieważ polimerazy DNA nie mają możliwości uzupełniania braków powstałych w sekwencjach łańcu-

chów po usunięciu starterów na obu 5' końcach liniowej cząsteczki DNA, w każdej rundzie replikacji następowałoby skracanie cząsteczki DNA. A zatem liniowe chromosomy, po kolejnym cyklu replikacji, zakończone byłyby na 3' końcu jednoniciowym odcinkiem DNA. U *Eukaryota* obecność telomerów na końcach chromosomów zapobiega skracaniu tych chromosomów przy każdej nowej rundzie replikacji DNA o odcinki równe długości końcowych starterów RNA, niemożliwych do uzupełnienia przez polimerazy DNA. Synteza telomerów odbywa się na innej zasadzie niż synteza DNA w trakcie replikacji [40]. Enzymem odpowiedzialnym za proces wydłużania telomerowych zakończeń chromosomów jest telomeraza (200-500 kDa) [41, 42], która w swoim centrum katalitycznym zawiera łańcuch RNA (159-200 pz). Środkowy fragment cząsteczki RNA służy jako matryca w syntezie telomerów [43].

M u s i a ł o w s k i i w s p. [44] wykazali *in vivo*, że u *Streptomyces* replikacja DNA przebiega w przeciwnych kierunkach rozpoczynając się w regionie *oriC* położonym w środku liniowego chromosomu (Ryc. 2b). Jaki jest mechanizm zapobiegający skracaniu się chromosomów w kolejnych rundach replikacji u *Streptomyces*?

Ostatnio C h e n [45] zaproponował cztery hipotetyczne mechanizmy syntezy telomerów liniowych chromosomów *Streptomyces* (Ryc. 3). Mechanizm pierwszy został zaproponowany na podstawie analogii do



Ryc. 3. Hipotetyczne mechanizmy syntezy telomerów chromosomu *Streptomyces lividans*: (a) Synteza telomerów jest inicjowana przez białko terminalne, które staje się starterem dla polimerazy DNA; (b) Wolny jednoniciowy 3' koniec tworzący strukturę „szpilki do włosów” pełni rolę startera syntezy jednej z nici DNA. Synteza drugiej nici inicjowana jest przez nacięcie jednej nici struktury „szpilki do włosów” z wykorzystaniem grupy 3'-OH służącej jako starter. Nacinające białko terminalne wiąże się do 5' końca (c). Białko terminalne i polimeraza DNA inicjują syntezę DNA w obrębie dwuniciowego odcinka DNA utworzonego przez sparowanie komplementarnych odcinków palindromów I i IV wolnego 3' końca. (d) 5' koniec nowosyntetyzowanej nici zostaje uzupełniony za pomocą homologicznej rekombinacji z 3' końcem nici rodzicielskiej. (wg C. W. Chena, Trends in Genetics, 1996 — zmodyfikowane).

replikacji adenowirusów [29] i bakteryjnego faga $\Phi 29$ [29]. W mechanizmie tym zakłada się, że terminalne białko (TP) służy jako starter dla polimerazy DNA do syntezy końców chromosomu (Ryc. 3a). Jednakże w przypadku adenowirusów terminalne białko nie tylko odgrywa rolę startera, ale również inicjuje replikację genomu. W przeciwieństwie do *Streptomyces* replikacja liniowej cząsteczki DNA adenowirusa rozpoczyna się nie w środku cząsteczki, lecz na obu jej końcach. Substratem dla białek inicjujących replikację omawianych wirusów jest stabilny, zakończony „tępo” dwuniciowy DNA. Wolny jednoniciowy odcinek DNA na 3' końcu liniowego chromosomu *Streptomyces* jest mało stabilny i dlatego powyższy model syntezy telomerów *Streptomyces* wydaje się być mało prawdopodobny.

Dwa inne mechanizmy syntezy telomerów zaproponowane zostały na podstawie II-rzędowej struktury jaką mogą przyjmować wolne, jednoniciowe 3' końce liniowych chromosomów *Streptomyces*. Końce te ze względu na obecność 4 palindromowych sekwencji utworzyć mogą swoiste II-go rzędowe struktury (Ryc. 3b, c). W jednym z tych mechanizmów zakłada się, że wolny 3' koniec ulega zawinięciu i tworzy pętlę — strukturę tzw. „szpilki do włosów”. Zawinięty koniec DNA z wolną grupą 3'-OH staje się starterem

syntezy jednej z nici DNA telomerowego. Następnie białko TP nacina drugą nić DNA w obrębie struktury „szpilki do włosów” i wiąże się kowalencyjnie do nowopowstałego 5' końca. Synteza drugiej nici telomerów rozpoczyna się od 3' końca powstałego w wyniku uprzedniego przecięcia nici DNA. Mechanizm ten jest podobny do mechanizmu inicjacji replikacji parwowirusów: replikacja typu obracającej się „szpilki do włosów” (ang. „rolling-hairpin”). Wyżej omówiony mechanizm syntezy telomerów może również zachodzić u *Borrelia* zakładając, że liniowe chromosomy *Borrelia* podobnie jak liniowe plazmidy (Ryc. 1b) posiadają na swych końcach strukturę „szpilki do włosów”.

Obecność 4 palindromów na wolnym 3' końcu telomerów umożliwia utworzenie innej struktury niż struktura „szpilki do włosów”. Możliwe jest utworzenie dwóch pętli na wolnym, jednoniciowym 3' końcu (Ryc. 3c). Dwuniciowe fragmenty tych pętli powstać mogą przez sparowanie komplementarnych odcinków DNA w obrębie palindromów II i III (Ryc. 1a, 3c). Dwuniciowy fragment DNA łączący obie pętle tworzą komplementarne sekwencje palindromów I i IV. Do tego miejsca przyłączają się białko TP i polimeraza DNA inicjując syntezę nici komplementarnej do wolnego 3' końca chromosomu.

W ostatnim mechanizmie zaproponowanym przez Chena zakłada się, że białko TP inicjuje syntezę telomerów, a brakujący 3' koniec nowosyntetyzowanej nici DNA zostaje uzupełniony za pomocą homologicznej rekombinacji z 3' końcem nici rodzicielskiej (Ryc. 3d). Ponieważ rekombinacja ta dotyczy końca chromosomu należy oczekiwać, że produktem przejściowym tego typu rekombinacji nie będzie pełna figura krzyżowa (Hollidaya) lecz jej połowa. Głównym białkiem uczestniczącym w procesie rekombinacji DNA jest białko RecA. Dowodem nie wprost przemawiającym za tym mechanizmem jest fakt, że dotychczas nie udało się otrzymać stabilnych mutantów *recA⁻* u *Streptomyces*.

V. Uwagi końcowe

Bakterie posiadające liniowe chromosomy należą do różnych, odległych od siebie grup taksonomicznych. Liniowe chromosomy występują zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Najbliższa przyszłość pokaże czy lista mikroorganizmów posiadających liniowe chromosomy zostanie poszerzona. Dotychczas głównym obiektem badań dotyczących podstawowych procesów zachodzących w komórce prokariotycznej był modelowy organizm *E. coli*. Jednym z celów tego artykułu jest pokazanie, że nie zawsze mechanizmy podstawowych procesów komórkowych u *Prokaryota* muszą być uniwersalne. Dowodem na to są odmienne mechanizmy terminacji replikacji u organizmów posiadających liniowe i kółko zamknięte replikony. Różnorodność struktur I-szo

i II-go rzędowych bakteryjnych telomerów może sugerować istnienie różnych mechanizmów syntezy telomerów również wśród replikonów o liniowym charakterze.

Artykuł otrzymano 28 listopada 1996 r.
Zaakceptowano do druku 9 grudnia 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Colman SD, Hu PC, Litaker W, Bott KE (1990) *Mol Microbiol* 4: 683-687
2. Pyle LE, Finch LR (1988) *Nucleic Acids Res* 16: 6027-6039
3. Pyle LE, Taylor T, Finch LR (1990) *J Bacteriol* 172: 7265-7268
4. Chen H, Kuspa A, Keseler IM, Shimkets LJ (1991) *J Bacteriol* 173: 2109-2115
5. Bautsch W (1992) W: Burmeister M, Ulanovsky L (red) *Methods in Molecular Biology* t. 12. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Humana Press, Totowa, New Jersey
6. Smith CL, Klcó SR, Cantor CR (1988) W: Davies KE (red) *Genome analysis a practical approach*, IRL Press, Oxford, Washington DC
7. Römling U, Tümmler B (1994) *J Biotechnol* 35: 155-164
8. Kinashi H (1994) *Actinomycetol* 8: 87-96
9. Saint Girons I, Old IG, Davidson BE (1994) *Microbiol* 140: 1803-1816
10. Kalkus J, Reh M, Schlegel HG (1990) *J Gen Microbiol* 136: 1145-1151
11. Crespi M, Messens E, Caplan AB, van Montagu M, Desomer J (1992) *EMBO J* 11: 795-804
12. Chen WC, Yu T-W, Lin Y-S, Kieser HM, Hopwood DA (1993) *Mol Microbiol* 7: 925-932
13. Włodarczyk M, Nowicka B (1988) *FEMS Microbiol Lett* 35: 125-128
14. Allardet-Servent A, Michaux-Charachon S, Jumas-Bilak E, Karayan L, Ramuz M (1993) *J Bacteriol* 175: 7869-7874
15. Davidson BE, MacDougall J, Saint Girons I (1992) *J Bacteriol* 174: 3766-3774
16. Lezhava A, Mizukami T, Kajitani T, Kameoka D, Redenbach M, Shinkawa H, Nimi O, Kinashi H (1995) *J Bacteriol* 177: 6492-6498
17. Lin Y-S, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW (1993) *Mol Microbiol* 10: 923-933
18. Chen CW, Lin Y-S, Kieser HM, Hopwood DA (1993) *J Cell Biochem Suppl* 17E: 291
19. Blackburn EH (1991) *Nature (Lond)* 350: 569-572
20. Cech TR (1994) *Science* 266: 387-388
21. Lundblad V, Szostak JW (1989) *Cell* 57: 633-643
22. Sandell LL, Zakian VA (1993) *Cell* 75: 729-739
23. Autexier Ch, Greider CW (1996) *TIBS* 21: 387-391
24. Hinnebusch J, Barbour AG (1991) *J Bacteriol* 173: 7233-7239
25. Hinnebusch J, Bergstrom S, Barbour AG (1990) *Mol Microbiol* 4: 811-820
26. Hinnebusch J, Tilly K (1993) *Mol Microbiol* 10: 917-922
27. Chen CW, Lin Y-S, Yang Y-L, Lin W-Y, Chang H-M, Kieser HM, Hopwood DA (1994) *Actinomycetol* 8: 103-112
28. Yang Y-L (1994) MS thesis, National Yang-Ming Medical College, Taipei, Taiwan
29. Kornberg A, Baker T (1992) W: The DNA replication, ed. Freeman WH & Co., New York, Second edition
30. Casjens S, Huang WM (1993) *Mol Microbiol* 8: 967-980
31. Old IG, MacDougall J, Girons IS, Davidson BE (1992) *FEMS Microbiol Lett* 99: 245-250
32. Zakrzewska-Czerwinska J, Schrempf H (1992) *J Bacteriol* 147: 2688-2693
33. Hill TM, Henson JM, Kuempel P (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1754-1758
34. De Massy B, Bejar S, Louarn J, Louarn JM, Bouche J-P (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1759-1763
35. Hill TM, Tecklenburg ML, Pelletier AJ, Kuempel PL (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1593-1597
36. Khatri GS, MacAllister T, Sista PR, Bastia D (1989) *Cell* 59: 667-674
37. Lee EH, Kornberg A, Hidaka M, Kobayashi T, Horiuchi T (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9104-9108
38. Hill TM, Marians KJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2481-2485
39. Kuempel PL, Pelletier AJ, Hill TM (1989) *Cell* 59: 581-583
40. Lingner J, Cooper JP, Cech TR (1995) *Science* 269: 1533-1534
41. Collins K, Kobayashi R, Greider CW (1995) *Cell* 81: 677-686
42. Greider CW, Blackburn EH (1989) *Nature (Lond)* 337: 331-337
43. Zakian VA (1995) *Science* 270: 1601-1606
44. Musialowski MS, Flett F, Scott GB, Hobbs G, Smith CP, Oliver SG (1994) *J Bacteriol* 176: 5123-5125
45. Chen WC (1996) *TIG* 12: 192-196

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

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

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

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

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

Organizacja i struktura genomu wirusów *Papilloma*

Papilloma Viruses; genome organisation and structure

ELŻBIETA DZIABASZEWSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Organizacja i struktura genomu wirusów *Papilloma*
 - II-1. Region wczesny
 - II-2. Otwarte ramki odczytu (ORFs E6 i E7)
 - II-3. Otwarta ramka odczytu (ORF E1)
 - II-4. Otwarte ramki odczytu E2 i E4 (ORFs E2 i E4)
 - II-5. Odcinek między regionem wczesnym a późnym E2
 - II-6. Region późny
 - II-7. Odcinek między regionami późnym i wczesnym
- III. Cykl życiowy wirusów *Papilloma*
- IV. Replikacja wirusów *Papilloma*
- V. Podsumowanie

I. Wstęp

Już przeszło 100 lat temu zauważono, że rak szyjki macicy u kobiet może być indukowany przez czynniki przenoszone drogą kontaktów płciowych. Uwagę skoncentrowano początkowo na takich czynnikach infekcyjnych jak *Trichomonas*, *Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex*, wirus cytomegalii [1, 2]. Występowanie choroby nowotworowej wiązano również z innymi infekcjami [3, 4].

Na możliwą rolę wirusów *Papilloma* (PV) w etiologii raka szyjki macicy, zwrócono uwagę w latach 70-tych [5]. Zapoczątkowana wtedy seria badań dała konkretne podstawy epidemiologiczne, kliniczne i doświadczalne potwierdzające onkogenny charakter wirusów *Papilloma*. Ludzki wirus *Papilloma* (HPV) zwany także brodawczakiem należy do rodziny *Papovaviridae*, rodzaju *Papillomavirus* [6]. Rodzaj ten obejmuje wirusy chorobotwórcze nie tylko dla ludzi ale również dla innych ssaków i ptaków [4, 7, 8]. Wirusy *Papilloma* (PV) są dwuniciowymi wirusami typu DNA, zawierającymi nieosłonięty wirion o symetrii ikozaedralnej i średnicy 55 nm. Wykazują one szczególny tropizm do komórek nabłonka, a ich replikacja jest ściśle uzależniona od stadium dojrzewania komórki. Infekcyjne cząstki potomne wirusa powstają tylko w zróżnicowanych w pełni keratynocytach [9-11].

Znanych jest przeszło 60 różnych typów wirusów

* Dr n. biol., Zakład Diagnostyki Patomorfologicznej Narządów Płciowych IGiP AM, ul. Polna 33, Poznań 60-535

Contents:

- I. Introduction
- II. Genome organisation and structure of *Papilloma* Viruses
 - II-1. Early region
 - II-2. Open reading frames (ORFs E6 and E7)
 - II-3. Open reading frame (ORF E1)
 - II-4. Open reading frames (ORFs E2 and E4)
 - II-5. Fragment between early and late regions E2
 - II-6. Late region
 - II-7. Fragment between late and early regions
- III. *Papilloma* Viruses lifecycle
- IV. *Papilloma* Viruses replication
- V. Summary

Papilloma, z których 23 infekują narządy płciowe u obu płci, a dwa typy HPV16 i HPV18 znajduje się w około 80% raka szyjki macicy [4].

II. Organizacja i struktura genomu wirusów *Papilloma*

Genom wirusów *Papilloma* występuje w postaci dwuniciowej kolistej cząsteczki DNA zbudowanej z około 7900 par zasad (pz) i jest podobnie zorganizowany u wirusów PV wszystkich znanych typów.

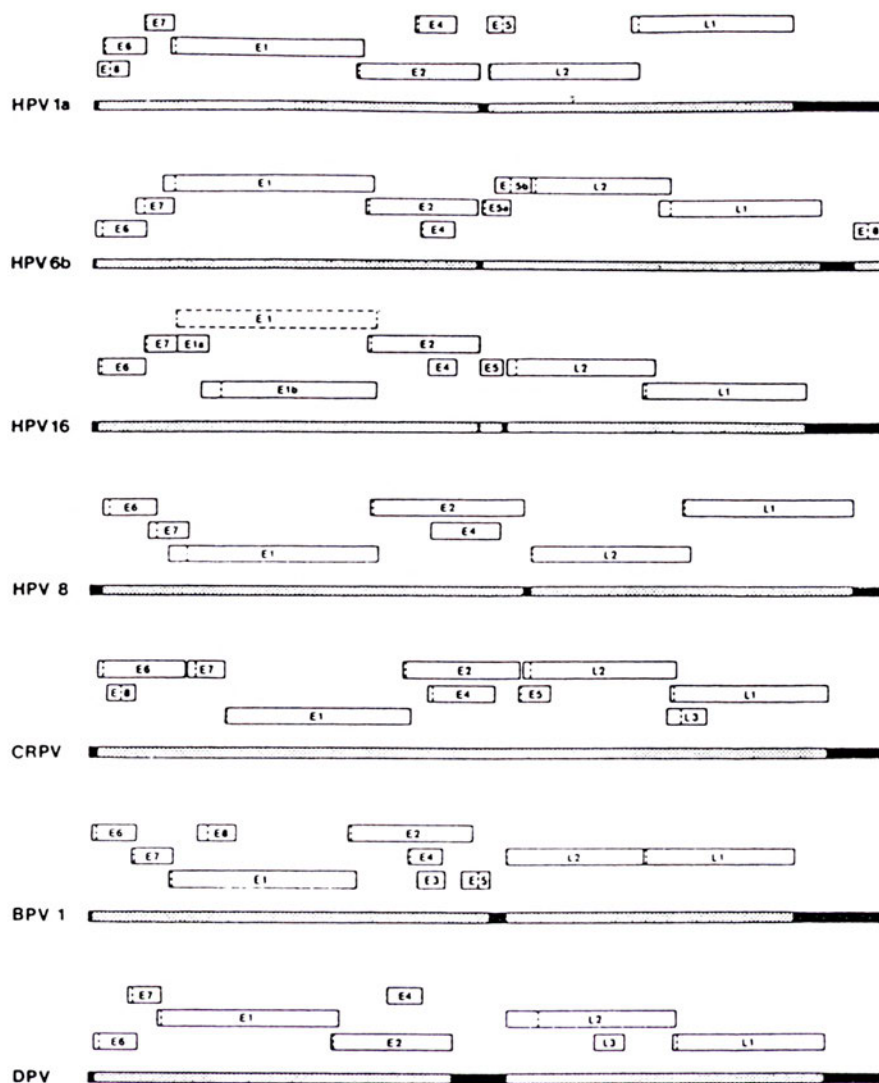
W strukturze genomu wyróżniamy:

— region wczesny (E), kodujący białka enzymatyczne i regulatorowe, niezbędne w replikacji wirusa i transformacji onkogennej,

— region późny (L), kodujący białka strukturalne konieczne do składania cząstek wirusa, oraz

— region regulatorowy (naz. ang. *upstream regulatory region URR*), zwany też dłuższym regionem regulatorowym, leżący między końcem regionu późnego a początkiem regionu wczesnego, zawierający miejsca inicjacji transkrypcji i replikacji. Schemat organizacji genomu wirusów *Papilloma* jest przedstawiony na rycinie 1. Funkcje poszczególnych ramek odczytu są omówione w tabeli I.

Wszystkie sekwencje przypuszczalnie kodujące białka, tj. zawierające tzw. otwarte ramki odczytu (ORFs), zlokalizowane są na jednej nici DNA. Na drugiej nici DNA znajdują się krótkie ramki odczytu o niejasnej jak dotychczas funkcji. Większość dużych ramek odczytu u różnych typów wirusów *Papilloma* posiada tę



Ryc. 1. Schemat organizacji różnych wirusów *Papilloma* [56]
 HPV — ludzki wirus *Papilloma*, BPV — bydlęcy wirus *Papilloma*, DPV — wirus *Papilloma* atakujący jeleniec, CRPV — króliczy wirus *Papilloma*; E — fragmenty DNA kodujące „wczesne” białka wirusowe, L — fragmenty DNA kodujące „późne” białka wirusowe, --- fragment DNA nie zawierający sekwencji kodującej białka, zwany rejonem regulatorowym (URR).

Tabela 1.
 Funkcje białek kodowanych przez określone otwarte ramki odczytu (ORF) w genomie wirusów *Papilloma*

ORF	FUNKCJE
E ₁	utrzymanie formy plazmidowej wirusowego DNA
E ₂	regulator transkrypcji wirusowych promotorów
E ₃	nie są poznane
E ₄	przypuszczalnie bierze udział w dojrzewaniu wirionów
E ₅	u BPV białko transformujące, u innych PV nie poznane
E ₆	transformujące
E ₇	transformujące
E ₈	nie są poznane
L ₁	duże białka kapsydu, białko strukturalne
L ₂	małe białka kapsydu, białko strukturalne

samą lokalizację i wielkość. Ze względu na trudności w otrzymaniu odpowiednich układów (tzw. permissyjnych) do hodowli wirusów *Papilloma in vitro*, trudno jednoznacznie stwierdzić, które z ramek odczytu ulegają ekspresji przed replikacją wirusa, a które kodują białka kapsydu wirusa. Szereg informacji o właściwo-

ściach transformujących białek *Papilloma* uzyskano prowadząc badania *in vitro* na ludzkich liniach komórkowych takich jak: SiHa, Caski, HeLa, C4-1 (otrzymanych z komórek raka szyjki macicy kobiet), jak również liniach komórek gryzoni [12, 13].

Przyjęto, że terminem wczesne ramki odczytu określa się geny ulegające ekspresji w bazalnej warstwie nabłonka, krótko po infekcji ale przed rozpoczęciem replikacji DNA. Produkty tych genów pełnią funkcje kontrolne w replikacji i ekspresji wirusowego DNA, są też odpowiedzialne za transformację komórek gospodarza. Późne geny kodujące białko strukturalne wirusa ulegają aktywacji podczas ostatniego stadium cyklu rozwojowego wirusa, który zachodzi w zróżnicowanych powierzchniowych komórkach nabłonka. Produkty transkrypcji poszczególnych otwartych ramek odczytu mogą składać się tak, że powstałe białka są hybrydami kilku ramek odczytu. Pojedyncza ramka odczytu może też kodować więcej niż jedno białko.

II-1. Region wczesny (Early region)

W regionie wczesnym genomu wirusów *Papilloma*, złożonym w przybliżeniu z 4500 par zasad, znajduje się do 8 otwartych ramek odczytu (ORF), z których E1,

E2, E4, E6 i E7 występują we wszystkich znanych dotychczas genomach wirusów *Papilloma*, E3 wykryto tylko u BPV1 (*Bovine papilloma virus* typ 1) [14]. Natomiast ramki odczytu E5 i E8 występujące u różnych typów wirusów *Papilloma* różnią się między sobą zarówno lokalizacją jak i wielkością [15].

II-2. Otwarte ramki odczytu E6 i E7 (ORFs E6 i E7)

Ramki E6 i E7, odkąd zostały rozpoznane jako kodujące geny białek transformujących komórki gospodarza, należą do najlepiej poznanych fragmentów w genomie wirusów HPV. ORF E6 i E7 znajdują się przy końcu 5' regionu wczesnego i mają podobną lokalizację u wszystkich wirusów *Papilloma* bez względu na ich właściwości onkogenne. Wielkość białek kodowanych przez ORF E6 i E7 jest różna u różnych typów wirusów i waha się dla ramki E6 od 137 do 158 aminokwasów oraz dla E7 od 93 do 127 aminokwasów, a przypuszczalnym kodonem startu translacji jest sekwencja ATG. Analiza sekwencji aminokwasów wykazała, że E6 i E7 mają sekwencje, które mogą być rezultatem sukcesywnego powielania się odcinka kodującego 33 aminokwasy z pojedynczym dubletem cysteinowym C-X-X-C. W białku E6 występują cztery powtórzenia sekwencji cysteinowej w odległości 29, 35 lub 36 i 29 aminokwasów, a w białku E7 dwa powtórzenia oddzielone 29 aminokwasami od końca C cząsteczki. Fragmenty bogate w cysteinę mogą formować pętle stabilizowane jonami cynku tworząc moduł o strukturze tzw. „palców cynkowych”, który ma zdolność wiązania się z DNA (Ryc. 2) [16, 17]. Sugeruje się, że połączenia tych białek z kwasami nukleinowymi decydują o różnym potencjale onkogenym wirusów PV. Sugestię tę uzasadnia fakt występowania podobnych sekwencji zawierających cysteinę w białkach innych wirusów onkogennych oddziałujących z DNA np. SV40, czy wczesnych białkach adenowirusów [18].

Produkt ramki E6 jest białkiem rozpuszczalnym, które w zainfekowanej komórce występuje w jądrze

i cytoplazmie. Koniec karboksylowy białka E6 jest bogaty w aminokwasy zasadowe, które przypuszczalnie umożliwiają także wiązanie białka z DNA. Białko E6 wiąże antyonkogenne białko komórkowe p53, które jest rozpoznawane przez ubikwatinę i ulega proteolizie [19]. Produkt ramki E7 występuje w cytoplazmie i może ulegać fosforylacji oraz tworzyć kompleksy z produktem genu kodującego białko retinoblastomy (Rb). E7 wiąże się preferencyjnie z nieufosforylowanym białkiem Rb [17, 20, 21].

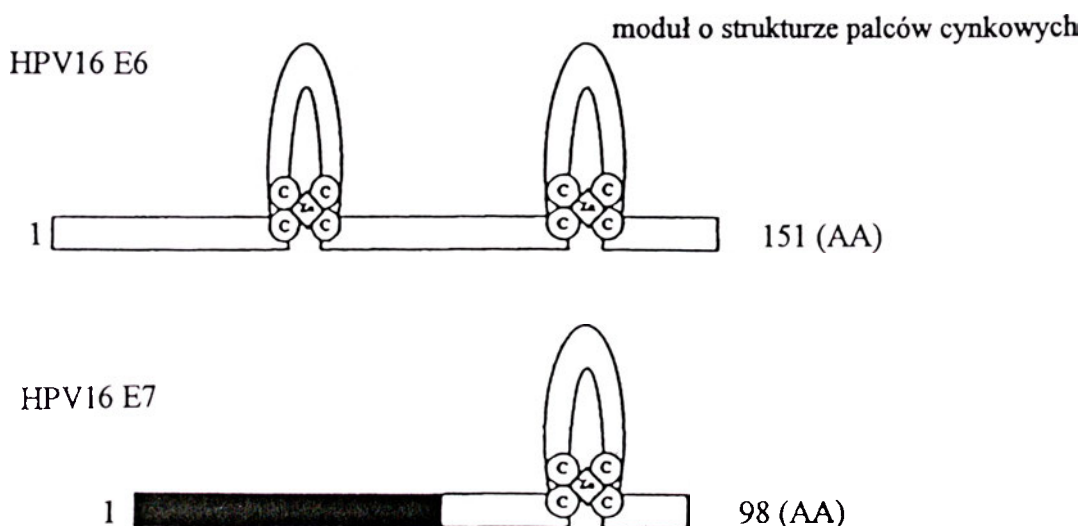
Obydwa białka E6 i E7 mają właściwości transformujące, a różny stopień onkogenności tych białek zdaje się być uzależniony od stabilności ich połączeń z kwasami nukleinowymi.

Moduł o strukturze palców cynkowych odgrywa również ważną rolę w stabilizacji struktury obu białek. Białka E6 i E7 nie wykazują homologicznych sekwencji do znanych białek komórkowych, chociaż znadowano w strukturze białka E7 pewne podobieństwo do antygeny LT SV40 i konserwatywnych domen białka E1A (CR2 i CR1) adenowirusów.

Natomiast białko E6 wykazuje podobieństwo funkcjonalne do E1A i E1B adenowirusów oraz dużego antygeny LT SV40 polegające na wiązaniu się z p53 [22, 23].

II-3. Otwarta ramka odczytu E1 (ORF E1)

ORF1 znajduje się w środkowej części regionu wczesnego. Jest to największa i bardzo konserwatywna ramka odczytu w genomie wirusów HPV. Białka kodowane w tym regionie są bogate w aminokwasy zasadowe, co wskazuje na możliwość ich oddziaływań z kwasami nukleinowymi. Stwierdzono także, że sekwencje aminokwasowe na końcu karboksylowym wykazują około 60% homologii u różnych typów PV i są podobne do antygeny T wirusa SV40 (24). Region ten u wirusa SV40 inicjuje replikację DNA, zawiera też m.in. sekwencję aminokwasów warunkującą przechodzenie białka z cytoplazmy do jądra komórkowego, miejsce fosforylacji i wiązania ATP. Strukturalne podobieństwa między antygenem T wirusa SV 40 a biał-



Ryc. 2. Struktura onkogennych białek wirusa HPV16 [17] rejon białka o sekwencjach homologicznych do dużego antygeny wirusa SV40 oraz białek regulatorowych adenowirusów; c — reszty cysteiny.

kiem E1 PV pozwalają przypuszczać, że białko E1 bierze udział w inicjacji replikacji DNA. Ponadto jest niezbędne do utrzymywania się w komórce formy episomalnej wirusa. Mutacja w E1 prowadzi także do integracji DNA wirusa z genomem gospodarza.

Wykazano, że w rejonie otwartej ramki odczytu ORFE1 kodowane są dwa białka: R i M. R jest niezbędne do wczesnej replikacji, natomiast M nie jest wymagane do wczesnej replikacji ale konieczne dla utrzymania wirusowego DNA w formie episomalnej [15].

II-4. Otwarte ramki odczytu E2 i E4 (ORFs E2 i E4)

Ramki odczytu E2 i E4 znajdują się na końcu 3' regionu wczesnego. Ramka E2 koduje trzy białka o masie cząsteczkowej 28kD, 31kD i 48kD, które są regulatorami transkrypcji (Ryc. 3) [15, 25-29]. Pełen transkrypt E2 to białko E2TA o masie cząsteczkowej 48kD, pełniące funkcje transaktywatora transkrypcji i posiadające zdolność łączenia się z białkiem E1 oraz wiązania się z DNA.

W cząsteczce białka E2 o pełnej długości można wyróżnić trzy domeny:

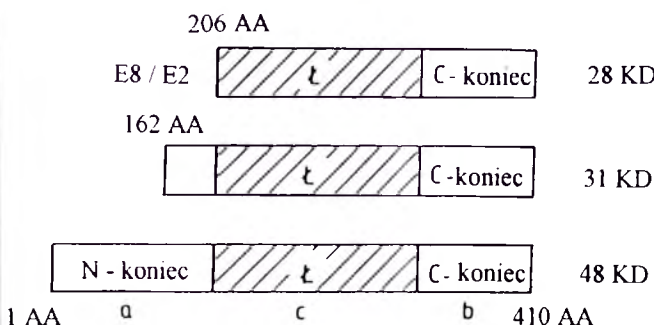
a — domenę odpowiedzialną za funkcję transaktywacyjną białka E2, zlokalizowaną na końcu N cząsteczki.

b — domenę biorącą udział w dimeryzacji cząsteczki E2 (koniec C cząsteczki) oraz

c — region „łączący” obie domeny bogaty w reszty prolinowe.

Dwa pozostałe produkty E2, krótsze od pełnego transkryptu o odcinki usunięte z rejonu końca aminowego cząsteczki, jeden o masie 31kD (E2TR) i drugi o masie 28kD (E8/E2TR) są represorami transkrypcji zależnej od transaktywatora E2TA. Rejon na końcach karboksylowych obu białek ma zdolność wiązania się z DNA oraz łączenia się z E2TA w heterodimeryczne kompleksy.

Białko E2 wiąże się z sekwencją w DNA o strukturze ACCGN₄CGGT występującą wielokrotnie w genomie wirusów PV.



Ryc. 3. Struktura białek E2 wirusów *Papilloma* [18]. objaśnienia: a — domena odpowiedzialna za właściwości transaktywujące białko E2, b — domena wiążąca białko z DNA oraz biorąca udział w tworzeniu dimeru białka E2, c — rejon łączący domeny a i b

Formą funkcjonalną białka E2TA jest najczęściej kompleks dwóch dimerów związany z dwoma miejscami w DNA. Wykazano, że tempo aktywacji transkrypcji z udziałem białka E2TA znacznie zwiększa się w obecności innych aktywatorów jak np. komórkowe białko Spl, NF1 czy Ap1 [18, 30-36]. Stwierdzono, że krótsze formy białka E2 są represorami transkrypcji. Mechanizm represji przy udziale białka E2 polega przypuszczalnie na tworzeniu się nieaktywnych dimerów białka wiążących się z DNA, co utrudnia dostęp komórkowych czynników transkrypcyjnych do promotora. Transkrypcja jest także regulowana przez fosforylację białka E2. Fosforylowane są wszystkie trzy formy białka E2. Miejscami fosforylacji są reszty serynowe 298 i 301 w rejonie końca C cząsteczki. Stwierdzono, że pełnej długości białko E2 może także nieznacznie aktywować transkrypcję genów w promotorach innych wirusów oraz w promotorach ssaków, nawet pozbawionych w rejonie promotorowym miejsc wiążących E2 [18]. Obecność jednak miejsc wiążących białko E2 w DNA może zwiększyć tempo transkrypcji od 6 do 100 razy [18, 36, 37]. Produkt E2 bierze również udział w replikacji wirusowego DNA [30, 38].

W hodowlach wirusa *Papilloma in vitro* stwierdzono, że genom wirusa może ulegać integracji z DNA komórek gospodarza. W integracji bierze udział rejon E1 i E2 wirusa. Ramka E4 cechuje się dużą zmiennością wśród wirusów *Papilloma*. E4 wirusów HPV8 i HPV16 nie zawierają kodonu ATG, dlatego ulegają składaniu z fragmentem zawierającym przy końcu 5' kodon ATG. Produkt E4 u HPV8 wykazuje częściową homologię z białkiem transformującym limfocyty B-wirusa Epsteina-Barra. E4 wirusa HPV1 bierze udział w późnej fazie cyklu replikacji i jest białkiem obecnym także w kapsydie. Wskazuje to raczej na jego rolę strukturalną w dojrzewaniu cząstki wirusa niż na rolę regulatorową.

II-5. Odcinek między regionem wczesnym a późnym E2

Odcinek między końcem 3' otwartej ramki E2 a końcem 5' otwartej ramki L2 zbudowany jest u różnych wirusów PV z 13-36 par zasad i u większości z wirusów nie zawiera sekwencji kodującej. Wyjątek stanowią m.in. HPV1, 6, 16, BPV1, BPV2, u których w tym regionie znajduje się ramka E5, zachodząca na kodon startowy ORF L2 [39].

Białko będące produktem otwartej ramki odczytu ORFE5 (u BPV) jest uznawane za białko transformujące. Zbudowane jest z 44 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 7 kD. Jest to najmniejsze dotychczas scharakteryzowane białko onkogenne. Zawiera ono 68% aminokwasów hydrofobowych (w tym 34% leucyny) oraz moduł o strukturze palców cynkowych zlokalizowany w części końcowej C cząsteczki. Białko to w komórkach zainfekowanych BPV jest zakotwiczone w błonach komórkowych, gdzie może

mieć wpływ na aktywność receptorów czynników wzrostu.

Do wyjaśnienia pozostaje jego udział w transformacji keratynocytów [15].

II-6. Region późny

Region późny (L), składa się z dwóch otwartych ramek odczytu L1 i L2, zachodzących na siebie. W produkcji L2 ponad 70 aminokwasów z rejonu końca aminowego cząsteczki i około 10 aminokwasów z rejonu końca karboksylowego są identyczne u różnych typów PV. Sekwencje środkowe natomiast wykazują niewielki stopień homologii, chociaż w grupach wirusów infekujących podobne tkanki np. HPV1 i HPV8 oraz HPV6 i HPV16 wykryto więcej podobnych sekwencji. Sekwencje te mogą być niezbędne w oddziaływaniu wirusa z komórką [10].

Wśród wirusów PV ramka L1 ma strukturę konserwatywną. Porównując ten region u różnych wirusów *Papilloma* stwierdzono, że homologia sekwencji jest na poziomie 50%. Przypuszcza się, że ORF L1 i L2 kodują odpowiednio większy i mniejszy komponent białka kapsydu wirusa. Białka te wykryto przy użyciu odpowiednich przeciwciał [40]. W przypadku wirusa BPV1 białko kapsydu i przewidywany polipeptyd L1 są podobne. Natomiast białko kodowane przez L2 u HPV1 jest znacznie większe niż prawdopodobny produkt ramki L2, być może produkt L2 jest łączony na poziomie mRNA z produktem innej ramki, choć dostępne obecnie przeciwciała dla transkryptów ramek E2, E1, E4 i E7 nie reagują z tym białkiem [10, 40-42].

II-7. Odcinek między regionami późnym i wczesnym

U wirusów *Papilloma* odcinek znajdujący się między końcem 3' ramki L1 a końcem 5' rozpoczynający się kodonem ATG ramki E6, określa się jako region niekodujący. Wielkość tego regionu waha się od 454 (HPV8) do 979 (HPV1) pz. Zawiera on liczne sygnały kontrolne w postaci sekwencji palindromowych bogatych w pary AT [10]. Koniec 3' zawiera rejon o wielkości od 140 do 580 pz, posiadający miejsca odpowiedzialne za transkrypcję L1. Koniec 5', który jest bardziej konserwatywny cechuje się wielokrotnymi powtórzeniami sekwencji ACCGN₄CGGT. Wirusy infekujące narządy płciowe są rozróżniane poprzez obecność w tym regionie pojedynczej sekwencji TATA zamiast dwóch takich sekwencji charakterystycznych dla innych PV. Wyjątek stanowi HPV6b, u którego między regionem późnym a wczesnym występuje ORF E8.

U wirusa BPV1 region ten posiada miejsca początku replikacji na nici „cis”, w przeciwieństwie do wszystkich ORF znajdujących się na nici „trans”. Wyróżniono także dwa miejsca inicjacji replikacji oznaczone jako EM ori i DZ ori oraz sekwencje: wzmacniające

transkrypcję (tzw. sekwencje enhancerowe) zawierające miejsca wiązania dla licznych czynników transkrypcyjnych (tj. Ap1, Sp1, NF1), element wiążący dla receptorów glukokortykosteroidów [43-46], jak również sekwencję TTTGGCTT. Sekwencję podobną w odwróconej orientacji AANCCAA zwaną sekwencją K znajdowano w sekwencjach wzmacniających (enhancerach) promotorów wielu genów specyficznie transkrybowanych w keratynocytach [47].

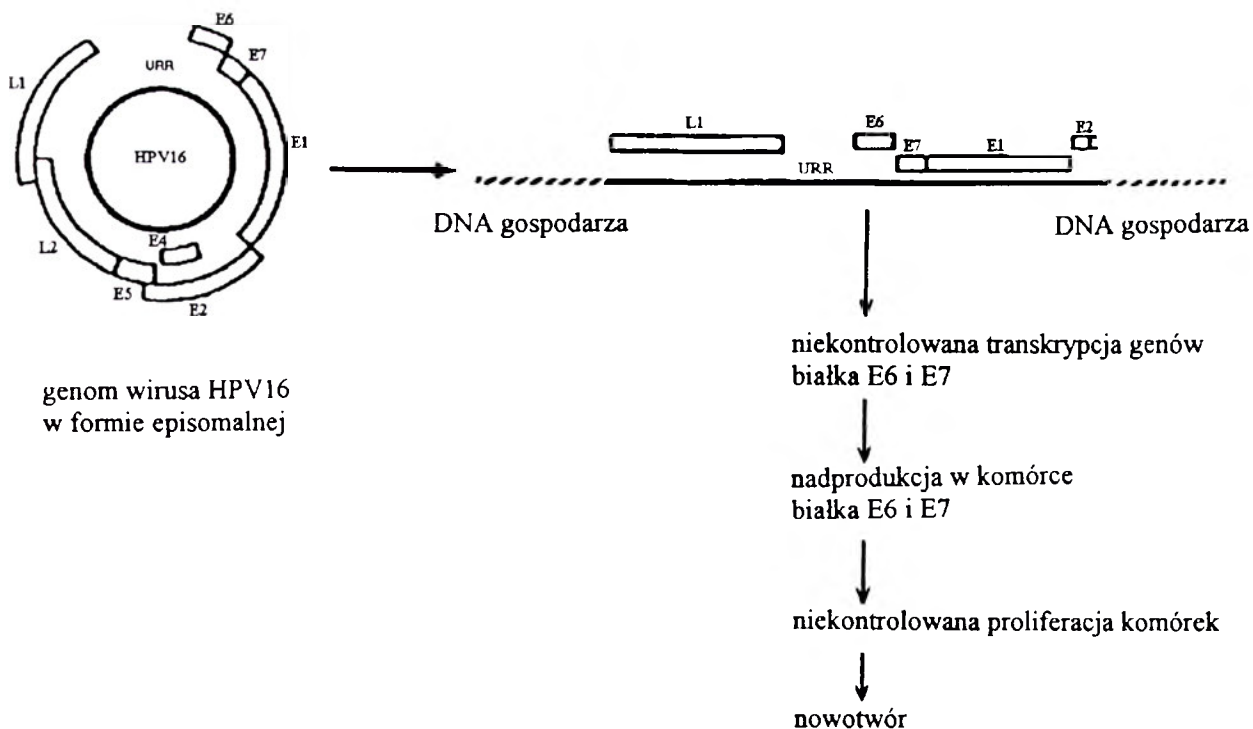
III. Cykl życiowy wirusów *Papilloma*

Wirus *Papilloma* wnika w postaci nici DNA do komórek warstwy bazalnej (podstawnej) nabłonka szyjki macicy, gdzie przechodzi w fazę latentną pozostając w formie kolistnego pozachromosomalnego DNA określanego jako episom [48, 49].

Przypuszcza się, że niedojrzałe komórki nabłonka posiadają pewne własności blokujące proliferację wirusową. Są to tzw. czynniki interferujące (ang. *cellular interfering factors*), które zwiększają odporność komórek i zależą od kontroli genetycznej. Mutacje w loci DNA kodującym te czynniki upośledzają ich funkcjonowanie, umożliwiając wbudowanie DNA wirusa do DNA komórkowego. W ten sposób powstają warunki do transkrypcji wczesnych ramek odczytu ORFsE wirusa, których produkty regulują replikację wirusowego DNA [50, 51]. W czasie podziału komórek warstwy podstawnej nabłonka dochodzi do jednorazowej replikacji DNA wirusa w ciągu jednego cyklu komórkowego. Ekspresja późnych genów kodujących białka strukturalne kapsydu zachodzi w bardziej zróżnicowanych, powierzchniowych warstwach nabłonka szyjki macicy. Tworzenie zatem dojrzałych cząstek wirusa możliwe jest w zróżnicowanych komórkach nabłonka, keratynocytach [52]. Stąd wynikają trudności badawcze w pracy nad wirusami *Papilloma*, gdyż hodowane *in vitro* komórki nabłonka nie ulegają dostatecznemu zróżnicowaniu.

IV. Replikacja wirusów *Papilloma*

Jedyny dostępny model do badań replikacji wirusów *Papilloma* został opracowany dla BPV1, który zdolny jest transformować komórki gryzoni w kulturach *in vitro* [14]. Wirusy *Papilloma* infekują komórkę gospodarza i przenikają do jądra, gdzie następuje replikacja wirusowego DNA. Do zainicjowania replikacji niezbędne są produkty ORFs E1 i E2. Białko E1 samo nie posiada zdolności wiązania się z DNA, natomiast łączy się w kompleks z produktem ORF E2-białkiem E2 TA, zawierającym specyficzną domenę wiążącą się z sekwencją DNA. Ekspresja genów E1 i E2 jest wystarczająca do zapoczątkowania replikacji, natomiast produkty ORF E5, E6 i E7 są niezbędne do jej podtrzymania. Kompleks E1/E2 TA przyłącza się do miejsca inicjacji na nici „cis” i białko E1 dzięki właściwościom zależnej od ATP helikazy rozwija nić



genom wirusa HPV16
w formie episomalnej

Forma wirusa HPV w początkowej
fazie infekcji komórki

Forma wirusa HPV
spotykana w komórce nowotworowej

Ryc. 4. Integracja wirusowego DNA do genomu gospodarza i związany z tym rozwój nowotworu [17].

DNA rozpoczynając replikację.

Replikacja kontrolowana jest w dwóch etapach:

Etap 1. Tworzenie się kompleksu E1/E2 TA

— E1 łączy się z niefosforylowaną formą białka E2TA,

— białka E2 TR i E8/E2 TR gdy występują w dużej ilości mogą łączyć się, uniemożliwiając tworzenie kompleksu E2TA z E1,

— zwiększenie stężenia E2 TA inicjuje replikację (w transformowanych komórkach białka E1 i E2 TA występują w niskich stężeniach)

Etap 2. Łączenie się kompleksu E1/E2 TA z DNA jest kontrolowane przez

— produkty E2 TR i E8/E2 TR, które mogą łączyć się z DNA oraz

— białko E2 TA może także łączyć się między sobą w kompleksy, utrudniając zapoczątkowanie replikacji.

Pełna replikacja wirusowego DNA oraz wytwarzanie wirionów potomnych zachodzi tylko w dojrzałych komórkach nabłonka — keratynocytach. W niedojrzałych warstwach nabłonka skutkiem infekcji wirusowej jest bardzo często transformacja nowotworowa komórki.

W komórkach takich dochodzi do integracji wirusowego DNA z DNA komórkowym. Uszkodzona zostaje ramka odczytu kodująca białko E2, co prowadzi do niekontrolowanej ekspresji w komórce onkogennych białek wirusowych E6 i E7. Onkogenne białka wirusowe poprzez tworzenie kompleksów z białkami

antyonkogenów (p53 i Rb) wpływają na regulację transkrypcji genów biorących udział w cyklu komórkowym [5, 53]. Skutkiem tego jest deregulacja fazy spoczynkowej komórki i jej ponowne wejście w cykl komórkowy i dalsza proliferacja [24, 41, 54]. Schemat procesu nowotworzenia w wyniku integracji wirusowego DNA do genomu gospodarza jest przedstawiony na rycinie 4.

Integracja wirusowego DNA z DNA gospodarza może także zmienić (przez mutagenезę insercyjną) ekspresję genów komórkowych np. aktywując onkogeny komórkowe lub inaktywując antyonkogeny [55].

V. Podsumowanie

Przedstawione sposoby transformacji nowotworowej ukazują niektóre z możliwych mechanizmów działania w komórce wirusów *Papilloma*. Należy również pamiętać, że wirus jest tylko jednym z czynników mogących brać udział w indukcji i rozwoju procesu nowotworowego. Ważną rolę odgrywają w nim także czynniki genetyczne, w tym mutacje w genach supresorowych, onkogenach komórkowych, genach modulatorowych, upośledzony system immunologiczny, jak również zaburzenia hormonalne.

Artykuł otrzymano 29 lutego 1996 r.
Zaakceptowano do druku 28 listopada 1996 r.

1. Crum C, Ikenberg H, Ricchart R (1984) *N Eng J Med* **310**: 880-883
2. Dürst M, Gissman L, Ikenberg H (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3812-3816
3. Fuchs PG, Girardi F, Pfister H (1988) *Int J Cancer* **41**: 41-45
4. Gissman L, Schneider A (1986) *Gold Spring Harbor Laboratory* 217-224
5. Meisels A, Fortin R, Roy M (1976) *Acta Cytol* **20**: 505-509
6. Blaskowič D, Kaňtoch M (1984) w: *Wirusologia lekarska*
7. Gissman L (1984) *Cancer Surv* **3**: 161-181
8. Syjänen KJ (1987) *Med Biol* **65**: 21-39
9. Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, Turyk M, Hosken M, Wilbanks GD, Laimins LA (1991) *J Virol* **65**: 2254-2260
10. Komly CA, Breitburd F, Croissant O (1985) *J Virol* **60**: 13-18
11. Taichman LB, La Porte RF (1987) *Plenum, NY* **2**: 109-139
12. Lambert PF (1991) *J Virol* **65**: 3417-3420
13. Smotkin D, Wettstein FO (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 4680-4684
14. Rabson MS, Yee C, Yang YC, Howley PW (1986) *J Virol* **60**: 626-634
15. Sousa R, Dostatni N, Yaniv M (1990) *Biochimica et Biophysica Acta* **1932**: 19-37
16. Phelps WC, Mürger K, Yee CL, Barnes JA, Howley PM (1992) *J Virol* **66**: 2418-2427
17. Vousden K (1993) *FASEB* **7**: 872-879
18. Goździcka-Józefiak A, Poręba E, Kędzia H (1994) w: *Kliniczna Perinatologia i Ginekologia PTMP X*
19. Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA (1992) *EMBOJ* **11**: 3045-3052
20. Dyson N, Howley PM, Mürger K (1989) *Science* **243**: 934-936
21. Kaelin W, Pallas D, De Caprio J, Kaye F, Livingston DM (1991) *Cell* **64**: 521-532
22. McKnight S, Ijian R (1986) *Cell* **46**: 795-805
23. Sompayrac L, Danne KJ (1992) *Virology* **191**: 439-442
24. Chellappan SP, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nervins JR (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4549-4553
25. Gloss B, Bernard H (1990) *J Virol* **64**: 5577-5584
26. Goździcka-Józefiak A, Poręba E, Kędzia H, Wasilewska DL (1991) 15th International Congress of Biochemistry, Jerusalem, Abstracts **152**
27. McBride AA, Schlegel R, Howley PM (1988) *EMBOJ* **7**: 533-539
28. Romanczuk H, Thierry F, Howley PM (1990) *J Virol* **64**: 2849-2859
29. Thompson G, Roman A (1987) *Gene* **56**: 289-295
30. Alderborn A, Jarenborg N, Burnett S (1992) *J General Virology* **73**: 2639-2651
31. Bohmann D, Bos IJ, Admon A, Nishimura I, Vogt PK, Tijan R (1987) *Science* **238**: 1386-1392
32. Gloss B, Yoe-Gloss M, Meistereerst M, Rogge L, Winnacker EL, Bernard HU (1989) *Nucleic Acid Research* **17**: 3519-3533
33. Ham J, Steger G, Yamir M (1992) *FEBS* **307**: 81-86
34. Letovsky J, Dynam WS (1989) *Nucleic Acid Research* **17**: 2639-2653
35. Lewin B (1991) *Cell* **64**: 303-312
36. Li R, Knight JD, Jackson SP, Tijan R, Botchan MR (1991) *Cell* **65**: 493-505
37. Hermonat PL, Spalholz BA, Howley PM (1988) *EMBOJ* **7**: 2815-2822
38. Mohr JJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson, Botchan MR (1990) *Science* **250**: 1654-1699
39. Schlegel R, Wade-Glass M, Rabson MS (1986) *Science* **233**: 464-467
40. Nakai Y, Lancaster WD, Lim LY, Jenson AB (1986) *Intervirology* **25**: 30-37
41. Berbeć H (1994) *Post Biochem* **40** (1): 6-10
42. Bishop JM (1991) *Cell* **64**: 235-248
43. Gloss B, Bernard H, Seedorf K, Klock G (1987) *EMBOJ* **6**: 3735-3743
44. Landet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D (1992) *EMBOJ* **11**: 1003-1013
45. Lees JS, Fawell SE, Parker MG (1989) *Nucleic Acids Research* **17**: 5477-5488
46. Pater MM, Hughes GA, Hyslop DE, Nakshatri H, Pater A (1988) *Nature (Lond)* **335**: 832-835
47. Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG, Dürst M, Gissman L, Rosman A, Turek LP (1987) *EMBOJ* **6**: 3745-3753
48. Dürst M (1987) W: *Papillomaviruses and human disease* (red. Syrjanen K.), Springer-Verlag, **393**
49. Howley PM (1988) w: *Fundamental Virology*, New York, Raven Press, 743-768
50. Zur Hausen H (1990) *Virology* **184**: 9-13
51. Zur Hausen H (1986) *Lancet* **2**: 489-491
52. Koss L (1987) w: *Papillomaviruses and human disease* (red. Syrjanen K.) Springer-Verlag 235-286
53. Scheffner M, Mürger K, Huibregste JM, Howley PM (1992) *EMBOJ* **11**: 2425-2431
54. Kaufmann WK, Kaufmann DG (1993) *FASEB J* **7**: 1188-1191
55. Schneider-Mannoury S, Croissant O, Ost G (1987) *J Virol* **61**: 3295-3298
56. Syjänen KJ, Gissman L, Koss LG (1987) W: *Papilloma viruses and human disease* Springer-Verlag

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

Obecny adres:

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

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

„X” — ostatnia niewiadoma wirusa zapalenia wątroby typu B?

Gen X i produkty jego ekspresji

„X” — the last unknown of hepatitis B virus? X gene and its expression products

MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Gen X
 - II-1. ORF X
 - II-2. Promotor genu X
 - II-3. Produkty transkrypcji genu X
 - II-4. Mutacje związane z ORF X
- III. Własności białka X
 - III-1. HBxAg — nowo odkryty marker serologiczny
 - III-2. Białko X a domena Kunitz'a
 - III-3. Inne własności białka X
- IV. Wpływ białka X na przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu B
- V. Uwagi końcowe

Contents:

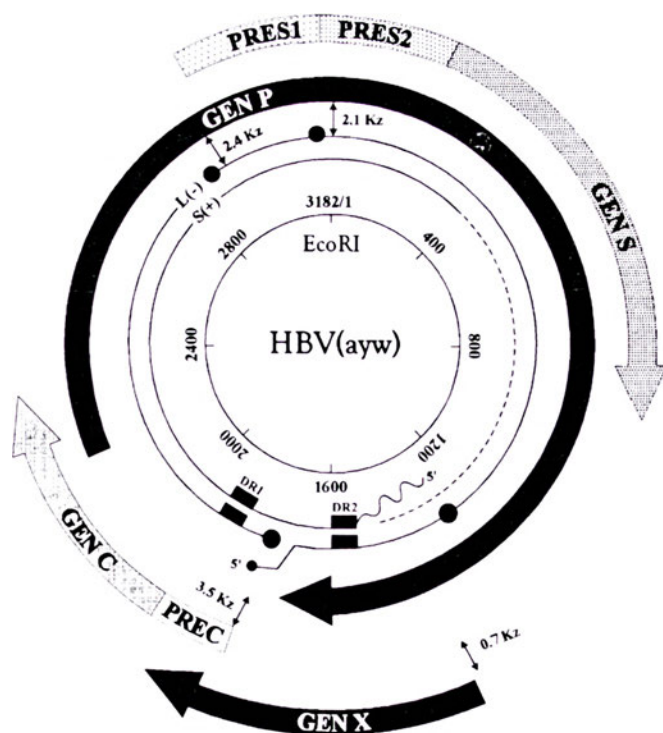
- I. Introduction
- II. X gene
 - II-1. ORF X
 - II-2. X gene promoter
 - II-3. Transcription products of X gene
 - II-4. Mutations connected with ORF X
- III. Properties of X protein
 - III-1. HBxAg — newly discovered serological marker
 - III-2. X protein and Kunitz domain
 - III-3. Other properties of X protein
- IV. Influence of X protein on the course of hepatitis B virus
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: HBV — wirus zapalenia wątroby typu B; ORF — otwarta ramka odczytu; HBxAg — antygen x; anti-HBx — przeciwciała skierowane przeciw białku X; pz — pary zasad; kz — tysiąc zasad; aa — aminokwas (y); ENH — enhancer; nt — nukleotydy(y).

I. Wstęp

Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) należy do rodziny wirusów *Hepadna*, charakteryzujących się silnym hepatotropizmem i swoistością gatunkową [1]. Specyficzną cechą zakażenia HBV jest możliwość rozwoju zapalenia wątroby o charakterze przewlekłym (ok. 10% przypadków), co dalej prowadzić może do marskości i/lub pierwotnego raka wątroby.

HBV posiada częściowo dwuniciowy, kolisty genom (Ryc. 1). Długa nić (—) genomowego DNA, mająca długość 3,2 kz zawiera przesunięte w fazie i częściowo nakładające się cztery otarte ramki odczytu (ORF): P, preS/S, preC/C i X. ORF P — najdłuższa ramka odczytu koduje wirusową polimerazę o własnościach odwrotnej transkryptazy, która bierze udział w unikalnym procesie replikacji HBV [2]. ORF preS/S koduje trzy białka powierzchniowe (L, M, S) tworzące otoczkę wirusa. ORF C koduje antygen rdzeniowy C otaczają-



Ryc. 1. Schemat organizacji genetycznej wirusa zapalenia wątroby typu B. Zaznaczono cztery otwarte ramki odczytu: preS/S, X, P, preC/C i powstające produkty transkrypcji.

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

cy genom wirusowy oraz rozpuszczalny antygen „e” obecny w surowicy osób zakażonych „dzikim” szcze-

pem HBV. Organizacja genetyczna i produkty ekspresji ORF preS/S i preC/C omówione zostały dokładniej na łamach wcześniejszych numerów *Postępów Biochemii* [3, 4].

Najmniejsza ramka odczytu w genomie HBV ORF X koduje białko X, inaczej HBxAg [5, 6]. Określenie X, użyte w stosunku do genu jak i białka, związane jest z faktem, że przez wiele lat nie udawało się wykryć białkowego produktu genu X, a jego funkcja w cyklu życiowym wirusa do tej pory nie jest w pełni wyjaśniona. Obecnie wiadomo, że białko X ma własności transaktywatora i jest zdolne do modyfikacji transkrypcji zarówno genów wirusowych jak i komórkowych. Wiele badań wskazuje, że transaktywujące działanie białka X ma bezpośredni wpływ nie tylko na rozwój przewlekłego zapalenia wątroby, ale także na powstawanie raka wątroby.

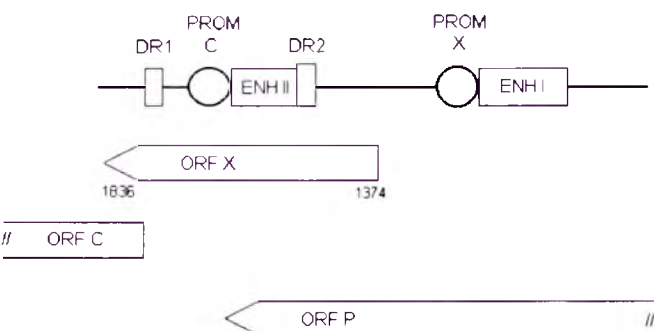
II. Gen X

II-1. ORF X

ORF X występuje tylko u tych przedstawicieli wirusów *Hepadna*, których gospodarzami są ssaki: człowiek (HBV), świstak (WHV), wiewiórka ziemna (GSHV) [7]. Silny konserwatyzm sekwencyjny rejonu X występujący wśród podtypów HBV [8] oraz obecność homologicznych z X ORF w genomach WHV i GSHV sugeruje, że białkowy produkt genu X może odgrywać istotną rolę w replikacji wirusa. W genomach ptasich *Hepadna* wirusów brak jest ORF X, a w następstwie zakażenia tymi wirusami nie dochodzi do rozwoju pierwotnego raka wątroby.

ORF X HBV zawiera 462 zasady. W podtypie *ayw* ulokowana jest pomiędzy 1374 i 1836 nukleotydem. ORF X nakłada się częściowo na ORF P, preC oraz pewne rejony regulatorowe wirusa w tym: sekwencje prostych powtórzeń (*direct repeats*) DR1, DR2, rejon enhancera II i promotor genu C (Ryc. 2). Taka lokalizacja sugeruje, że zmiany w sekwencji rejonu X mogą mieć wpływ na regulację cyklu życiowego wirusa.

Specyficzną cechą ORF X jest obecność kodonów charakterystycznych dla genów komórek eukariotycznych [8]. Sugeruje się w związku z tym, że gen



Ryc. 2. ORF X w otoczeniu innych otwartych ramek odczytu i rejonów regulatorowych genomu HBV.

X pochodzić może od homologicznej sekwencji komórkowej. Wykrycie sekwencji podobnych do genu X („X-like”) w genomie ludzkim wydaje się prawdopodobnie tę hipotezę [10].

II-2. Promotor genu X

Promotor genu X znajduje się w odległości ponad 100 nukleotydów w kierunku 5' od ORF X [11]. W podtypie *ayw* jest to sekwencja między nukleotydem 1239 a 1376. Promotor genu X nie zawiera charakterystycznych sekwencji TATA box ani GC box. Komórkowy czynnik, który w sposób swoisty wpływa na transkrypcję genu X, nazwano roboczo białkiem wiążącym promotor X — X-PBP (*promotor binding protein*) [12, 13]. Za pomocą mapowania DNA-za I i nukleazą S1 miejsce wiązania X-PBP zlokalizowano w sekwencji promotorowej graniczącej z sekwencją enhancera. Miejsce to zawiera charakterystyczną palindromową sekwencję o długości 8 pz, z centralnie położonym miejscem rozpoznawanym przez nukleazę restrykcyjną SphI. Wykazano, że miejsce startu syntezy X-specyficznego m-RNA znajduje zaraz obok miejsca wiążącego X-PBP. Wprowadzenie mutacji do palindromowej sekwencji odpowiedzialnej za wiązanie z X-PBP powoduje utratę zdolności wiązania białka X oraz utratę aktywności promotorowej. Niepoznana jest dotąd struktura czynnika X-PBP. Prawdopodobnie wydaje się, że X-PBP oddziałuje z którymś z typowych czynników transkrypcyjnych. Jako oddziałujące z promotorem genu X/ ENH I opisano liczne czynniki białkowe jak: NF-1, C/EBP, AP-1, EF-c, eH-TF [14]. Białko X-PBP jest nie tylko niezbędne do transkrypcji genu X, ale umożliwia także syntezę białka X z x-specyficznego m-RNA (0,7 kz), ale nie z innych wirusowych transkryptów np. z pregenomowego RNA (3,5 kz). Nie znaleziono żadnej homologii pomiędzy sekwencją wiążącą X-PBP a klasycznymi sekwencjami wiążącymi czynniki transkrypcyjne, takimi jak TATA box czy GT box. Sekwencja promotora genu X stanowi zupełnie odrębny typ sekwencji inicjującej transkrypcję [15].

Na poziom transkrypcji genu X ma także wpływ sekwencja enhancera I wirusa (ENH I), położona pomiędzy 1071 i 1238 nt. Jak wykazały badania subregion zawarty pomiędzy 1222-1238 nt wpływa na aktywność transkrypcyjną genu X w różnych typach linii komórkowych [16]. Natomiast na poziom ekspresji genu X w komórkach różniących się (np. pochodzących z linii Huh7, Hep3B, HepG2) oddziałuje subregion ENH I zawarty pomiędzy nukleotydami 1117-1204.

Charakterystyczną cechą ENH I jest wrażliwość na transaktywację przez białko X [14]. Transaktywacyjne działanie HBxAg odbywa się poprzez krótką, 26-nukleotydową sekwencję XRE, która została zidentyfikowana [17] w ENH I genomu HBV jako element odpowiadający na białko X (*X-response element*).

Podobne elementy odnaleziono w innych genach, które ulegają transaktywacji pod wpływem białka X [18-20]. Ostatnie doniesienia dotyczące regulacji ekspresji genu X [21] potwierdzają, że jest ona aktywowana przez białko X natomiast czynnikiem, który powoduje represję jest normalne białko supresorowe p53 (produkt białkowy zmutowanego genu p53 nie wykazuje takiej zdolności), przy czym białko X i normalny produkt p53 mają antagonistyczny wpływ na regulację ekspresji genu X.

II-3. Produkty transkrypcji genu X

Trudności z wykryciem transkryptu specyficznego dla genu X *ex vivo* wynikają z faktu, że prezentuje on mniej niż 1% całego m-RNA obecnego w zakażonych komórkach wątroby [22]. Specyficzny dla genu X m-RNA o długości 0,7 kZ został wykryty początkowo w komórkach ssaków transfekowanych całym genomem HBV [4] lub fragmentem genomu HBV zawierającym ORF S i X [23]. Oprócz X-specyficznego produktu transkrypcji o długości 0,7 kZ, w liniach komórkowych pochodzących od ludzkiego wątrobiaika transfekowanego genem HBV, zaobserwowano powstawanie transkryptów o długości 3,9 kZ, które zawierały dwie sekwencje charakterystyczne dla genu X [24]. Powstawanie tego transkryptu inicjowane jest przez promotor genu X. Po odczytaniu genu X, na skutek „ignorowania” przez aparat transkrypcyjny sygnału stop, następuje przepisanie całej informacji genetycznej HBV łącznie z ponowną transkrypcją genu X. Powstająca w efekcie cząstka RNA jest dłuższa od największego naturalnie występującego transkryptu wirusa (3,5 kZ).

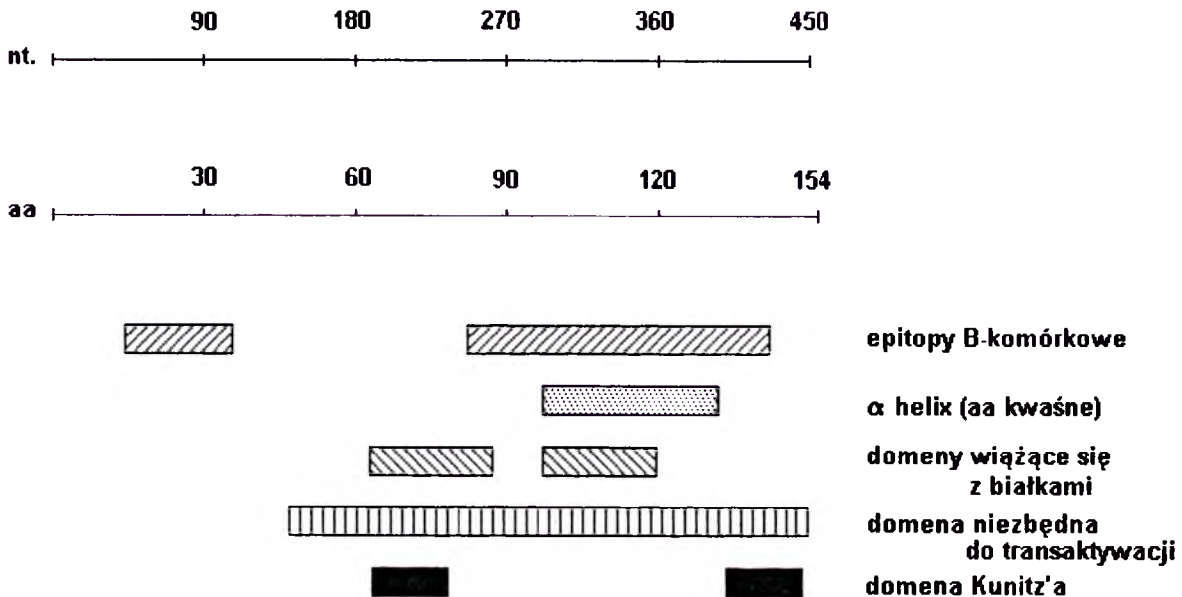
II-4. Mutacje związane z ORF X

Opisane są liczne przypadki naturalnie występują-

cych zakażeń wirusem, mającym zmienioną sekwencję w rejonie ORF X. Jedną ze zmian polega na występowaniu dodatkowego, znajdującego się w fazie kodonu ATG w odległości 56 tripletów przed ATG specyficznym dla genu X i utworzeniu tzw. rejonu „preX” [25]. Tego typu mutacja wykrywana jest zarówno u „zdrowych” jak i „chorych” nosicieli HBV. Interesujące jest występowanie w tym rejonie mutacji, które stwierdza się tylko u „chorych”, nie zaś u „zdrowych” nosicieli, co wskazuje na powiązanie zmienności w rejonie preX z przebiegiem choroby [26]. Stwierdzono także, że przynajmniej część przypadków zapalenia wątroby nie-A, nie-B, nie-C, nie-D, nie-E czyli tzw. typu F wywołwana jest przez zmienioną formę HBV, w której występuje mutacja (T→C) lub delecja (8 pz) w rejonie ORF X [27]. Wykryto liczne inne typy mutantów delecyjnych związanych z genem X [28, 29]. Delecje w rejonie X prowadzić mogą do zahamowania replikacji i ekspresji białek wirusowych, czego efektem jest brak u chorych serologicznych markerów HBV. Obok zakażenia mutantami typu „e-minus”, zakażenia wywołwane przez „ciche” mutanty typu X stanowią etiologiczną podstawę zapalenia wątroby typu F.

III. Własności białka X

Białko X pojawia się w czasie zakażenia HBV i jest immunogenne [30, 31]. W surowicy wykrywane jest w postaci polipeptydu o masie 17 kD, co odpowiada łańcuchowi polipeptydowemu o długości 154 aa (Ryc. 3) [32]. Mimo zasadowego charakteru (pI = 8,3), białko X nie wiąże się bezpośrednio z DNA [33]. N- i C-końce białka X zawierają głównie aminokwasy o charakterze hydrofobowym. C-końcowa część białka X jest preferencyjnie rozpoznawana przez przeciwciała i zawiera immunodominujący rejon złożony z dwóch epitopów [34]. Wiele danych wskazuje, że funkcje transaktywujące lub/i onkogenne tego białka związane



Ryc. 3. Schemat ilustrujący budowę i właściwości białka X.

są z oddziaływaniami typu białko-białko między HBxAg i komórkowymi czynnikami regulacyjnymi.

III-1. HBxAg — nowoodkryty marker serologiczny

Bezpośredni dowód na to, że gen X może kodować produkt białkowy dostarczyła jego ekspresja w systemach prokariotycznych [5, 30, 31, 34] i eukariotycznych [6, 35]. Rekombinacyjne antygeny jak i syntetyczne peptydy, analogi fragmentów białka X posłużyły do wykrywania przeciwciał anti-HBx w surowicach zakażonych osób [5, 6, 30, 31, 35]. Wykazano wyraźną heterogenność w odpowiedzi humoralnej na białko X. Przeciwciała anti-X pojawiają się około 3-4 tygodni po wystąpieniu objawów klinicznych. Przeciwciała te wykrywane są przede wszystkim w surowicach chorych z pierwotnym rakiem wątroby, przewlekłym aktywnym zapaleniem i marskością wątroby. Najwyższe miano anti-HBx wykrywano u chorych z aktywnym przewlekłym zapaleniem wątroby. Niższe miano przeciwciał występują u pacjentów z normalnym ostrym przebiegiem zapalenia wątroby typu B jak i z infekcją ustępującą [36].

O występowaniu białka X w surowicy chorych na zapalenie wątroby typu B dowiedziano się również drogą pośrednią. Przeciwciała anti-HBx użyte zostały do wykrycia krzyżowo reagujących białek w komórkach wątrobowych pochodzących od osób zakażonych HBV oraz liniach komórkowych hepatoma zawierających zintegrowany genom HBV [37]. Wirusowa integracja z genomem gospodarza, występująca w następstwie rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby, daje w wyniku nadprodukcję HBxAg [38], który zachowuje funkcję transaktywatora i jest ściśle związany z rozwojem pierwotnego raka wątroby.

III-2. Białko X a domena Kunitz'a

Porównanie sekwencji aminokwasowej białka X *Hepadna* wirusów wskazuje na obecność trzech silnie zakonserwowanych rejonów: w części aminoterминальной pomiędzy 1-20 aa, w części wewnętrznej pomiędzy 58-84 aa oraz w rejonie karboksyterminalnym (98-140 aa).

Wykazano także silne podobieństwo sekwencji aminokwasowej pomiędzy białkiem X i inhibitorami proteaz serynowych [39]. Podobieństwo dotyczy niezbędnej do funkcjonowania inhibitora domeny Kunitz'a i obejmuje dwa rejony (Ryc. 3) w obrębie białka X (61-69aa i 132-140aa). Inhibitory proteaz serynowych (typu Kunitz'a) posiadają charakterystyczną domenę, w obrębie której występują również dwa fragmenty wykazujące znaczny konserwatyzm sekwencyjny [40]. Jedna z nich (Gly-Pro-Gly) położona jest obok miejsca reakcji (Arg lub Lys). Sekwencja taka występuje w białkach X pochodzących ze wszystkich podtypów HBV oraz analogicznych pochodzących od hepadnawirusów zakażających świstaki (WHV) i wie-

wiórki ziemne (GSHV). Druga sekwencja charakterystyczna dla domeny Kunitz'a (Phe-Val/Ile-X-Gly-Gly-Cys-Arg/Lys) jest również zbliżona do miejsca katalitycznego poprzez wewnętrzny mostek dwusiarczkowy. Podobna sekwencja występuje w białku X, ale jej odległość (na poziomie struktury pierwszorzędowej) od miejsca katalitycznego jest większa niż w przypadku inhibitorów serynowych. Istnieje ścisła zależność między własnościami transaktywującymi białka X i zachowaniem niezmienionej struktury rejonu białka X analogicznego do domeny Kunitz'a [41]. Badano także bezpośrednio zdolność białka X do inhibicji proteaz serynowych izolowanych z hepatocytów [42]. Działanie inhibitorów proteaz serynowych oparte jest na wiązaniu do centrum aktywnego proteazy, co blokuje jej funkcję. Okazało się, że rekombinacyjne białko X ma zdolność wiązania się z dwoma dominującymi w hepatocytach proteazami serynowymi, przy czym nie ulega jednocześnie degradacji. Wiązanie białka X z tryptazami TL₁ i TL₂ powodowało inhibicję ich działania, co wykazano stosując jako substraty odpowiednie syntetyczne peptydy. Jest więc prawdopodobne, że transaktywujące własności białka X ujawniają się poprzez modulację aktywności proteaz serynowych, a tym samym ograniczenie proteolitycznej degradacji komórkowych czynników transkrypcyjnych.

III-3. Inne własności białka X

Białko X wykazuje *in vitro* szereg innych właściwości, które mogą mieć wpływ na jego transaktywujące funkcje. Biochemiczna analiza rekombinacyjnego białka X [43] wykazała, że posiada ono aktywność hydrolityczną specyficzną w stosunku do nukleotydów adeninowych. To samo białko X pochodzące ze zrekombinowanych bakterii *E. coli* wykazuje strukturalne jak i funkcjonalne podobieństwo do kinaz difosfonukleozydowych [44]. Gen kodujący białko X mógł, jak sugerują autorzy, wyewoluować z genów tej grupy kinaz. Inna potencjalna aktywność związana z białkiem X to udział w przekazywaniu sygnału komórkowego poprzez zwiększanie aktywności endogennej białkowej kinazy C [45, 46]. Wykazano także, że białko X posiada aktywność białkowej kinazy serynowo/treoninowej [47]. Jednak te wyniki przyjmować należy z dużą ostrożnością, gdyż nie udało się ich powtórzyć [48].

IV. Wpływ białka X na przebieg wirusowego zapalenia wątroby

Wpływem HBxAg na komórkowe sekwencje regulatorowe w hepatocytach tłumaczyć można pewne zjawiska towarzyszące infekcji HBV. Zmiany w poziomie ekspresji antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy II na powierzchni zakażonych hepatocytów mogą wynikać z transaktywacji rejonu regulatorowego genu MHC II przez HBxAg [49]. Ekspresja MHC II przez

hepatocyty może mieć różnorodne konsekwencje. Hepatocyty stać się mogą komórkami prezentującymi antygen pomocniczym komórkom T, które wydzielając limfokiny aktywują cytotoksyczne limfocyty T (CTL), zwiększając tym samym liczbę hepatocytów wywołaną przez CTL. Z drugiej strony ekspresja MHC klasy II przez zakażone hepatocyty przyczyniać się może do inaktywacji pomocniczych komórek T przez prezentację antygeny przy jednoczesnym braku zdolności wydzielania limfokin przez komórki prezentujące antygen, co w konsekwencji prowadzić może do rozwoju zakażenia o charakterze przewlekłym [7].

Transaktywacja genu MHC klasy I przez HBxAg ma wpływ na zwiększoną ekspresję antygenów zgodności tkankowej na powierzchni hepatocytów w czasie infekcji. Zhou i w s p. [50] wykazali, że rejon promotorowy mysiego genu MHC klasy I jest pobudzany przez HBxAg w komórkach ludzkiego hepatoma. Wynik ten jest zgodny z obserwowaną zwiększoną produkcją MHC I przez komórki HepG2 transfekowane dimerem genu HBV i produkujące cząstki wirusowe. Zwiększona ekspresja antygenów MHC I może powodować przyspieszoną martwicę hepatocytów spowodowaną działaniem cytotoksycznych komórek T, co ma miejsce na przykład w tzw. nadostrym przebiegu zapalenia wątroby (*hepatitis fulminans*).

Charakterystyczną cechą przewlekłego zapalenia wątroby typu B jest integracja genu HBV z genomem gospodarza. Najczęściej odnajdywaną w postaci zintegrowanej z ludzkim genomem sekwencją wirusową jest sekwencja kodująca białko X (głównie w postaci skróconej na 3' końcu). Zachowany w takiej postaci rejon X ulega ekspresji, a powstające białko X zachowuje zdolność do transaktywacji. W konsekwencji prowadzić to może do zmiany ekspresji genów komórkowych odpowiedzialnych za proliferację komórkową i może mieć wpływ na powstanie lub rozwój raka wątroby [37, 38, 51].

V. Uwagi końcowe

Białko X, produkt ekspresji ORF X genu HBV, wykazuje funkcje transaktywatora, działając poprzez tzw. XRE ("X-responsive elements") na ekspresję licznych genów wirusowych oraz komórkowych transkrybowanych przez polimerazę II i III. Białko X nie wiąże się bezpośrednio z DNA zaś funkcje transaktywujące są następstwem oddziaływań typu białko-białko pomiędzy HBxAg a białkowymi czynnikami regulatorowymi. Mechanizm tych oddziaływań wynikający z podstawowych strukturalnych i biochemicznych właściwości białka X (podobieństwo do domeny Kunitz'a inhibitorów proteaz serynowych, aktywność ATP-azowa,) i ich powiązanie z rozwojem pierwotnego raka wątroby są obecnie przedmiotem intensywnych badań.

Artykuł otrzymano 16 września 1996 r.

Zaakceptowano do druku 10 grudnia 1996 r.

Piśmiennictwo

- Ganem D, Varmus HE (1987) *Ann Rev Biochem* **56**: 651-693
- Summers J, Mason WS (1982) *Cell* **29**: 403-415
- Sidorkiewicz M, Płucienniczak A (1993) *Post Biochem* **39**: 99-104
- Sidorkiewicz M, Płucienniczak A (1994) *Post Biochem* **40**: 143-149
- Kay A, Mandart E, Trepo C, Galibert F (1985) *EMBO J* **4**: 1287-1292
- Koike K, Akatsuka T, Miyamura T (1988) *Virology* **163**: 233-235
- Rossner MT (1992) *J Med Virol* **36**: 101-117
- Lo SJ, Chen ML, Lee YHW (1988) *Virology* **167**: 289-295
- Miller RH, Robinson WS (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2531-2535
- Nakamura I, Lopper R (1987) *Science* **235**: 1616-1622
- Trenin M, Laub O (1986) *Moll Cell Biol* **7**: 545-548
- Nakamura I, Koike K (1992) *Virology* **191**: 533-540
- Yaginuma K, Nakamura I, Takada S, Koike K (1993) *J Virol* **67**: 2559-2565
- Trujillo MA, Letovsky J, Maguire HF, Lopez-Cabera M, Siddiqui A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3797-3801
- Koike K, Takada S (1995) *Intervirology* **38**: 89-99
- Zhang P, Raney AK, McLachlan A (1992) *Virology* **191**: 31-41
- Factor O, Budlowsky S, Ben-Levy R, Shaul Y (1990) *J Virol* **64**: 1861-1863
- Seto E, Mitchell PJ, Yen TS (1990) *Nature (Lond)* **344**: 72-74
- Siddiqui A, Gayner R, Srinivasan A, Mapoles J, Farr RW (1989) *Virology* **169**: 479-484
- Twu JS, Chu K, Robinson WS (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5168-5172
- Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K (1996) *Virology* **216**: 80-89
- Kaneko S, Miller RH (1988) *J Virol* **62**: 3979-3984
- Saito I, Oya Y, Shimajo H (1986) *J Virol* **58**: 554-560
- Guo WT, Wang J, Tam G, Yen TS, Ou JS (1991) *Virology* **181**: 630-636
- Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH (1990) *Nucl Aci Res* **16**: 4940-4940
- Takahashi K, Kishimoto S, Otori K, Yoshizawa H, Akahane Y, Okamoto H, Mshiro S (1995) *Int Hepatol Commun* **3**: 131-138
- Uchida T, Shimojima M, Gotoh K, Shikata T, Tanaaka E, Kiyosawa K (1994) *Microbiol Immunol* **38**: 281-285
- Feitelson MA, Duan LX, Guo J, Blumberg BS (1995) *Gastroenterology* **108**: 1810-1819
- Feitelson MA, Duan LX, Guo J, Sun B, Woo J, Steensma K, Horiike N, Blumberg BS (1995) *J Infect Dis* **172**: 713-722
- Theilmann L, Salfeld J, Kommerell B, Pfaff E (1988) *Hepatogastroenterology* **35**: 104-106
- Hess J, Stemler M, Will H, Schroder CH, Kuhn J, Braun R (1988) *Med Microbiol Immunol Berl* **177**: 195-205
- Feitelson MA, Clayton MM (1990) *Virology* **177**: 367-371
- Jameel S, Siddiqui A, Maguire HF, Rao KV (1990) *J Virol* **64**: 3963-3973
- Stemler M, Weimer T, Tu ZX, Wan DF, Leverero M, Jung C, Pape GR, Will H (1990) *J Virol* **64**: 2802-2809
- Leverero M, Jean Jean O, Balsano C, Will H, Perricaudet M (1990) *Virology* **174**: 299-304
- Slage BL, Lee T-H, Butel JS (1992) *Prog med virol* **39**: 167-203
- Moriarty AM, Alexander H, Lerner RA (1985) *Science* **227**: 429-433
- Schluter V, Meyer M, Hofschneider PH, Koshy R, Caselman WH (1994) *Oncogene* **9**: 3335-3344
- Takada S, Koike K (1990) *Jpn J Cancer Res* **81**: 1191-1194
- Lascowski M, Kato I (1990) *Annu Rev Biochem* **49**: 593-626

41. Arii M, Takada S, Koike K (1992) *Oncogene* 7: 397-403
 42. Takada S, Kido H, Fukutomi A, Mori T, Koike K (1994) *Oncogene* 9: 341-348
 43. De Medina T, Shaul Y (1994) *Febs Lett* 351: 423-426
 44. De Medina T, Haviv I, Noiman S, Shaul Y (1994) *Virology* 202: 401-407
 45. Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Lubner B, Hofschneider PH (1993) *Nature (Lond)* 361: 742-745
 46. Lubner B, Lauer U, Weiss L, Hohne M, Hofschneider PH, Kekule AS (1993) *Res Virol* 144: 311-321
 47. Wu JY, Zhou ZY, Judd A, Cartwright CA, Robinson WS (1990) *Cell* 63: 687-695
 48. (1993) *Cell* 63: 687
 49. Hu KQ, Vierling JM, Siddiqui A (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7140-7144
 50. Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, Yen TS (1990) *J Virol* 64: 4025-4028
 51. Caselman WH (1995) *J Hepatol* 22: 34-37

Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA związane z rozwojem stanów patologicznych i starzeniem się

Oxidative damage of mitochondrial DNA in degenerative diseases and aging

MAREK JURGOWIAK¹,
 RYSZARD OLIŃSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Powstawanie RFT w mitochondriach. Łańcuch oddechowyy
- III. Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA
 - III-1. Charakterystyka mtDNA
 - III-2. Uszkodzenia mtDNA spowodowane działaniem RFT
- IV. Niektóre jednostki chorobowe związane z uszkodzeniami mitochondriów
- V. Mitochondria a proces starzenia się
- VI. Ochronne działanie czynników antyoksydacyjnych w chorobach i starzeniu się

Wykaz stosowanych skrótów: RFT — reaktywne formy tlenu; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa; MnSOD — dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca mangan; O₂^{•-} — anionorodnik ponadtlenkowy; OH — rodnik hydroksylowy; H₂O₂ — nadtlenek wodoru; 8-OH-dG — 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna; 8-oxo-dG — 8-oxo-2'-deoksyguanozyna; ATP — adenozy-notrójfosforan; mtDNA — mitochondrialny DNA; TNF — czynnik martwicy nowotworu; HPLC — wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa; PCR — polimerazowa reakcja łańcuchowa; MPP⁺ — metylfenylopirydyna.

I. Wstęp

W ciągu ostatniego dziesięciolecia, w wielu pracach, zwrócono uwagę na znaczenie dysfunkcji mitochondriów (najczęściej będących skutkiem defektów geno-

Contents:

- I. Introduction
- II. Reactive oxygen species production in mitochondria. Respiratory chain
- III. Oxidative damage to mitochondrial DNA
 - III-1. Mitochondrial DNA
 - III-2. Damage to mtDNA
- IV. Damage of mitochondria in degenerative diseases
- V. Mitochondria and aging
- VI. Prevention and antioxidative therapy in diseases and aging

mu mitochondrialnego), jako czynnika decydującego o patogenezie wielu chorób i naturalnego starzenia się [1, 2]. Wykazano, że postępujące uszkodzenia mitochondriów spowodowane działaniem endogennie generowanych oksydantów są prawdopodobnie związane z zaburzeniami funkcji tych organelli jakie obserwuje się wraz ze wzrastającym wiekiem badanych organizmów [3]. Wiadomo również, że procesy utleniania mogą mieć znaczący udział, zarówno w starzeniu się komórek, jak i rozwoju chorób degeneracyjnych charakterystycznych dla osobników w wieku starczym, takich jak: nowotwory, choroby układu krążenia, niedobory układu immunologicznego, choroby związane z uszkodzeniami mózgu (choroba Parkinsona, choroba Alzheimera) czy też zaćma [4-6]. W tym aspekcie interesujące wydają się spostrzeżenia, że naturalne antyoksydanty zawarte w diecie, takie jak: kwas askrobinowy, tokoferol, karotenoidy, których

¹Dr, ²prof. dr hab. Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

znacznym źródłem są warzywa i owoce, chronią w pewnym stopniu przed rozwojem wymienionych wyżej chorób [7].

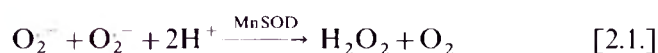
Reaktywne formy tlenu (RFT), takie jak O_2^- (anionorodnik ponadtlenkowy), H_2O_2 (nadtlenek wodoru), $\cdot OH$ (rodnik hydroksylowy), powstają w mitochondriach jako produkt uboczny metabolizmu tlenu. RFT mogą powodować uszkodzenia makromolekuł komórkowych, takich jak DNA, białka i lipidy. Akumulacja oksydacyjnie uszkodzonych makrocząsteczek jest, jak wykazano czynnikiem przyspieszającym starzenie się i rozwój licznych zmian patologicznych [4, 6].

Około 1-2% tlenu metabolizowanego w warunkach fizjologicznych może uczestniczyć w generowaniu H_2O_2 [8]. Ilość ta może wzrastać pod wpływem ksenobiotyków wyzwalających w komórce szok tlenowy [9]. Etiologia wielu chorób, często związanych z zaburzeniami funkcji mitochondriów to zagadnienie wymagające jeszcze licznych, szczegółowych wyjaśnień. Ponieważ mitochondria są znaczącym źródłem RFT przyjmuje się, że DNA tych organelli (mtDNA) jest w sposób szczególny narażony na uszkodzenia oksydacyjne. Wykazano w nich bardzo wysoki (w porównaniu z DNA jądrowym) poziom 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG), jednej z wielu oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych DNA. Nie bez znaczenia pozostają oksydacyjne uszkodzenia białek i lipidów obecnych w mitochondriach. Uszkodzone w ten sposób organella są z pewnością czynnikiem destabilizującym funkcjonowanie poszczególnych komórek a tym samym tkanek i całego organizmu wielokomórkowego.

II. Powstawanie RFT w mitochondriach. Łańcuch oddechowy

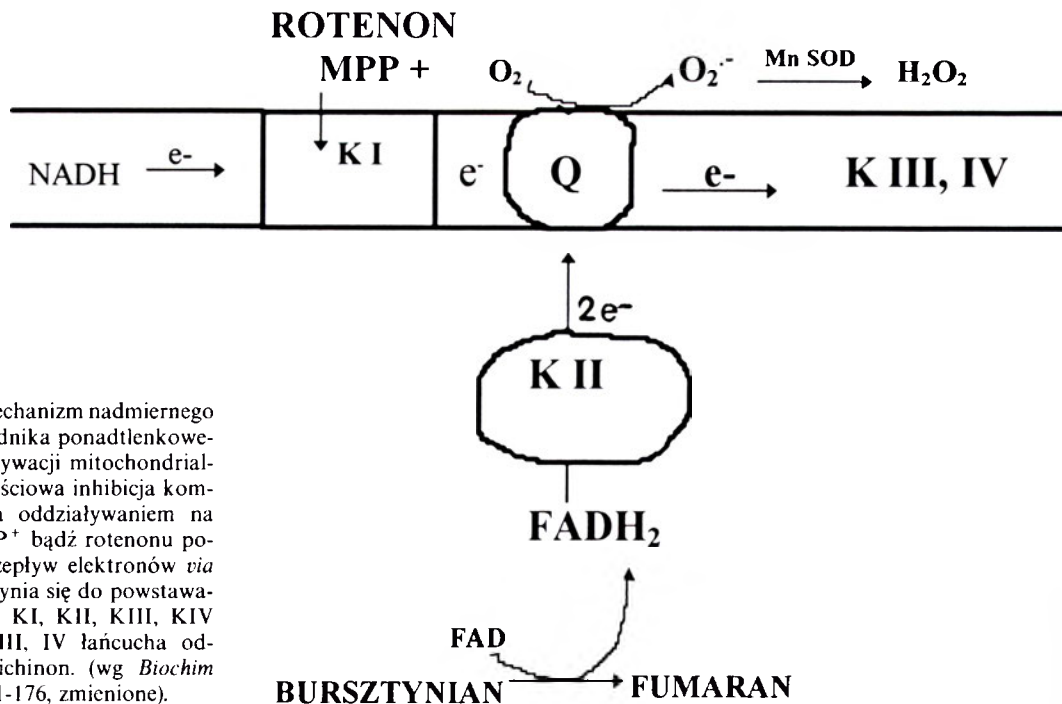
W porównaniu z innymi systemami komórkowymi generującymi oksydanty (np. cytochrom P-450, różne oksydazy cytozolowe, β -oksydacja kwasów tłuszczowych w peroksysomach), mitochondria będąc niezbędnymi do produkcji ATP zużywanego przez komórkę, obecne są w stosunkowo dużych ilościach, niemal we wszystkich komórkach ciała. Deficyt energii w komórce spowodowany spadkiem wydolności mitochondriów osłabia jej prawidłową aktywność, jak również ogranicza możliwości adaptacyjne komórki w warunkach różnego typu szoku fizjologicznego [7].

Mitochondria określane są często we współczesnym piśmiennictwie jako swoisty „zegar biologiczny”, odmierzący czas życia organizmu [10]. Na przykład, okres życia myszy wynosi tylko około 2 lat, co wyjaśnia się faktem, że mitochondria tych zwierząt „pracują” 40-krotnie intensywniej w porównaniu do mitochondriów człowieka, wytwarzając jednocześnie duże ilości O_2^- , który łatwo ulega przemianie do H_2O_2 .



Mitochondria wykorzystują 85%-95% tlenu zużywanego przez komórkę [11]. Jak obliczono, jedno mitochondrium wątroby szczura produkuje w przebiegu prawidłowego metabolizmu około 3×10^7 anionorodnika ponadtlenkowego każdego dnia [12]. Powstające w mitochondriach O_2^- i H_2O_2 (w ilościach pikomolarnych i nanomolarnych) są prekursorami wysoce reaktywnej cząsteczki jaką jest rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Ponadto, RFT generowane mogą być w dużych ilościach przez mitochondria w niektórych stanach patologicznych, jak również pod wpływem różnorodnych ksenobiotyków. Do czynników tych zalicza się etanol [13], alloksan, menadion, rotenon, metylfenylopirydynę (MPP^+) (Ryc. 1), podwyższony poziom Ca^{2+} oraz $TNF-\alpha$ i stan ischemii/reperfuzji stymulujący produkcję RFT w mitochondriach (różni autorzy, wg [14]). Konsekwencją oddziaływania np. rotenonu i MPP^+ jest inaktywacja (niedobór) mitochondrialnego kompleksu I, co przyczynia się do nasilonej produkcji O_2^- , a dalszą konsekwencją może być nadmierne generowanie rodnika hydroksylowego i uszkodzenie a nawet śmierć komórki (Ryc. 2). Badania przeprowadzone zarówno na komórkach owadów jak i ssaków wykazały, że mitochondria podlegają znacznym zmianom morfologicznym jak również produkują większą ilość RFT podczas starzenia się komórek [15-18]. Badania dotyczyły zatem organizmów, których maksymalny czas życia jest przeciwnie skorelowany z tempem zużycia tlenu i wykazuje pozytywną korelację odnośnie wydajności systemów antyoksydacyjnych [19].

Produkowane w mitochondriach O_2^- i H_2O_2 są metabolizowane w tych organellach, odpowiednio z udziałem manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (Mn SOD) i zawierającej selen (Se) peroksydazy glutationowej [20]. Ponadto RFT zmiatane są przez witaminy o działaniu antyoksydacyjnym, glutation oraz ubiquinol-10 (CoQ_{10}) [21-23]. Pomimo obecności tak licznych mechanizmów ochronnych w mitochondrium, makrocząsteczki zawarte w tej organelli ulegają oksydacyjnym modyfikacjom; np. wykorzystując metodę HPLC z detekcją elektrochemiczną wykazano, że w mtDNA wątroby szczura poziom 8-hydroksyguaniny jest dość wysoki i stanowi 25 cząsteczek na 10^5 pz [11]. Dla porównania w mtDNA wątroby myszy wykazującej wyższe tempo metabolizmu (zużycia tlenu) odnotowano znacznie wyższy poziom 8-hydroksyguaniny [24]. Różni autorzy wskazują jednak na możliwość powstania artefaktów wynikających ze stosowania metod chromatograficznych i stosując inne metody oznaczeń wykazali niższy poziom oksydacyjnie uszkodzonych zasad mtDNA w tkankach zwierząt [25]. Mitochondria starych szczurów wykazują podwyższony poziom produktów peroksydacji lipidów i ubytek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych co wskazuje na nasilenie szoku tlenowego wraz ze wzrastającym wiekiem badanych zwierząt [26]. Mitochondrialny łańcuch oddechowy wbudowany jest w wewnę-

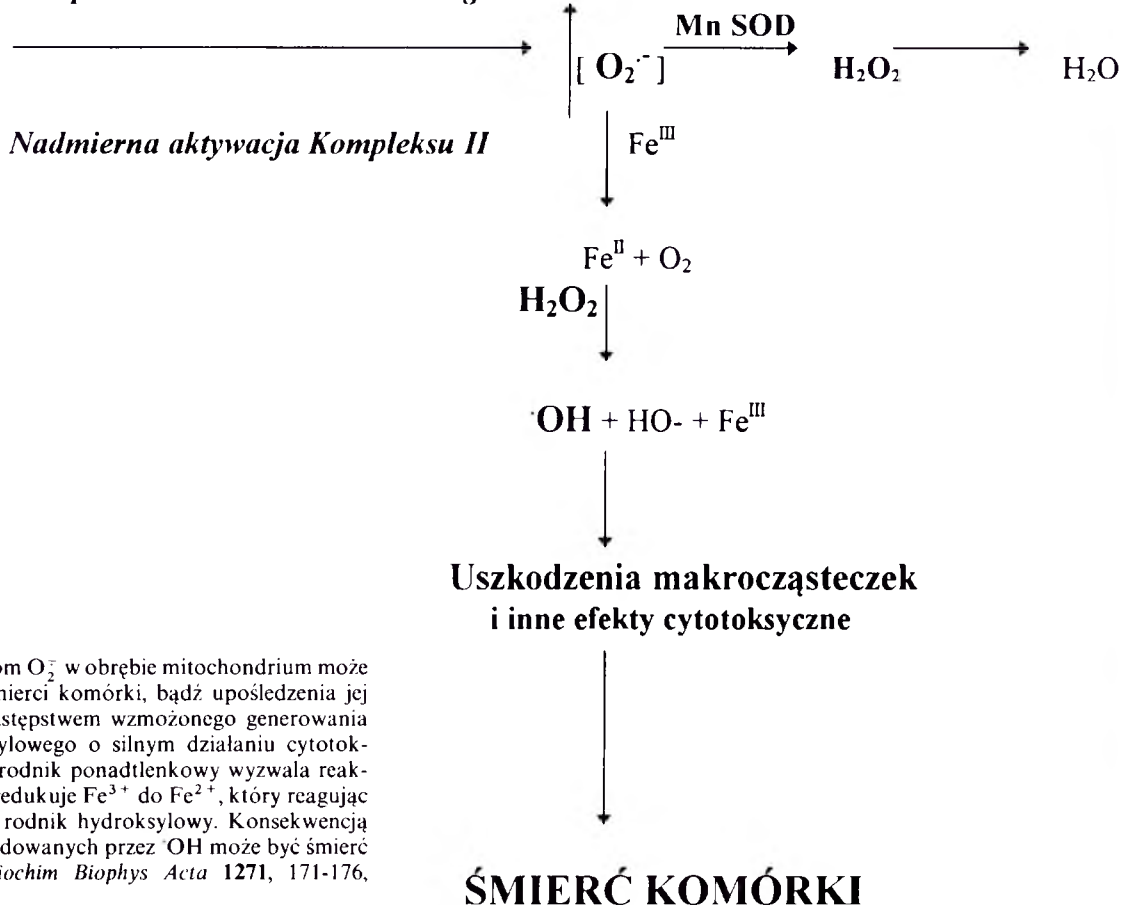


Ryc. 1. Schemat obrazujący mechanizm nadmiernego generowania anionorodnika ponadtlenkowego po częściowej inaktywacji mitochondrialnego kompleksu I. Częściowa inaktywacja kompleksu I wywoływana oddziaływaniem na mitochondria np. MPP^+ bądź rotenonu powoduje wzmożony przepływ elektronów *via* kompleks II, co przyczynia się do powstawania dużych ilości O_2^- . KI, KII, KIII, KIV — kompleksy I, II, III, IV łańcucha oddechowego, Q — ubichinon. (wg *Biochim Biophys Acta* 1271, 171-176, zmienione).

trzną błonę mitochondrialną i skomponowany jest z produktów genów zawartych, zarówno w jądrowym DNA, jak i mtDNA. W skład łańcucha oddechowego wchodzi 5 kompleksów białkowych (I-V). mtDNA zawiera geny kodujące 13 białek wchodzących w skład tych kompleksów, natomiast jądrowy DNA koduje około 60 białek [27].

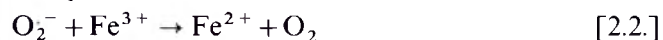
Jakkolwiek większość cząsteczek tlenu konsumowanego przez mitochondria ulega konwersji do wody w kompleksie IV łańcucha oddechowego, to jednak około 4%-5% tlenu przyjmuje elektrony wprost z dehydrogenaz flawinowych i zredukowanej formy CoQ ($CoQH_2$), generując anionorodnik ponadtlenkowy. Powstający na skutek takiego „przecieku” elektronów

Niedostateczne funkcjonowanie Kompleksu I łańcucha oddechowego



Ryc. 2. Zwiększony poziom O_2^- w obrębie mitochondrium może być przyczyną śmierci komórki, bądź upośledzenia jej funkcji co jest następstwem wzmożonego generowania rodnika hydroksylowego o silnym działaniu cytotoksycznym. Anionorodnik ponadtlenkowy wywołuje reakcję Fentona. O_2^- redukuje Fe^{3+} do Fe^{2+} , który reagując z H_2O_2 generuje rodnik hydroksylowy. Konsekwencją uszkodzeń spowodowanych przez OH może być śmierć komórki. (wg *Biochim Biophys Acta* 1271, 171-176, zmienione).

O_2^- (jest to najważniejsze źródło anionorodnika ponadtlenkowego w większości komórek aerobowych) ulega przemianie do H_2O_2 w reakcji katalizowanej przez mitochondrialną Mn SOD [2.1.] i do wysoce reaktywnej cząsteczki $\cdot OH$, w obecności metali przejściowych.



W tym miejscu należy również podkreślić rolę cytochromu c jako czynnika generującego rodniki hydroksylowe. Jest on około 20-krotnie bardziej wydajny od jonów Fe^{3+} w reakcji Fentona (patrz powyżej), i występując w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (ruchomy składnik łańcucha oddechowego) może być jednym z głównych źródeł rodników $\cdot OH$ w tym organellum.

Hamowanie mitochondrialnego transportu elektronów wzmacnia wytwarzanie RFT [28, 29]. Generowane w mitochondriach RFT uszkadzają błony mitochondriów, białka i DNA, a następstwem tego jest upośledzenie procesu fosforylacji oksydacyjnej.

III. Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA

III-1. Charakterystyka mtDNA

Przeciętna komórka ciała człowieka zawierać może tysiące cząsteczek mtDNA. Mitochondrialny DNA człowieka jest kolistą, zamkniętą cząsteczką zbudowaną z 16 568 par nukleotydów i uformowaną przez dwa komplementarne łańcuchy-łańcuch ciężki (H) i lekki (L). DNA mitochondriów zawiera 37 genów: 13 z tej liczby to geny polipeptydów będących podjednostkami łańcucha oddechowego i układu fosforylacji oksydacyjnej wewnętrznej błony mitochondrialnej, inne to geny kodujące 12S i 16S rRNA i 22 geny kodujące cząsteczki tRNA [30]. Białka siedmiu podjednostek kompleksu I kodowane są przez geny ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6; jedna podjednostka kompleksu III kodowana jest przez gen cytochromu b (Cyt b); trzy podjednostki kompleksu IV kodowane są przez geny COI, COII i COIII oraz dwie podjednostki kompleksu V kodują geny ATPazy 6 i 8. Inne, bardzo liczne mitochondrialne polipeptydy kodowane są w DNA jądra komórkowego i muszą być inkorporowane przez organellum z cytoplazmy [31].

Mitochondria dzielą się niezależnie od przebiegu cyklu komórkowego w sposób przypominający wzrost i podział bakterii. Jest to interesująca obserwacja w świetle teorii wywodzących pochodzenie mitochondriów komórek *Eukaryota* od symbiotycznych komórek bakteryjnych [32]. W przypadku dorosłych szczurów okres półtrwania ich mtDNA wynosi od kilku dni do miesiąca w zależności od narządu [33]. Podczas podziału komórki mitochondria podlegają dystrybucji do komórek potomnych w procesie określanym jako segregacja replikacyjna.

U ssaków mtDNA podlega mutacji 5-10 razy szybciej niż DNA jądrowy [34]. Ciekawy jest fakt, że w przypadku rekinów, których tempo metabolizmu (tym samym zużycie tlenu) jest 5-10 razy niższe niż u ssaków, przy zbliżonej masie ciała, tempo ewolucji mtDNA jest 7-8 razy niższe niż w przypadku Naczelnych [35].

Mutacje mtDNA powstają zarówno w komórkach linii płciowej, jak i w komórkach somatycznych. Liczne mutacje w komórkach linii płciowej są przyczyną wielu chorób przekazywanych potomstwu przez matkę (komórka jajowa jest źródłem mitochondriów a tym samym mtDNA dla rozwijającego się zarodka), podczas gdy akumulacja mutacji somatycznych w obrębie tkanek postmitotycznych powoduje postępujący spadek wydolności mitochondriów co może być przyczyną rozwoju wielu chorób i starzenia się [28, 30].

III-2. Uszkodzenia mtDNA spowodowane działaniem RFT

Powszechność występowania w komórkach *Eukaryota* jądrowych enzymów usuwających oksydacyjnie uszkodzone zasady z DNA [36, 37] sugeruje, że oksydacyjne uszkodzenia tej makromolekuły mogą mieć olbrzymie implikacje biologiczne. Wiadomo również, że mutanty *Escherichia coli* z upośledzoną zdolnością do naprawy DNA są zabijane w hodowli przez niskie stężenia nadtlenu wodoru [38]. Brak mechanizmów naprawy oksydacyjnie uszkodzonego DNA może zatem być dla komórki letalny.

Poziom oksydacyjnych uszkodzeń mtDNA izolowanego z wątroby szczura, bądź różnych obszarów ludzkiego mózgu jest ponad 10-krotnie wyższy w porównaniu do DNA jądrowego [39, 40]. Koreluje to ze znacznie wyższym tempem pojawiania się mutacji w mtDNA w porównaniu do DNA jądrowego [41]. Podobnie interesującym wydaje się stwierdzony fakt, że chroniczna ekspozycja na działanie etanolu powoduje wzrost poziomu utlenienia białek i DNA mitochondriów, czego nie obserwowano w przypadku białek cytozolowych i jądrowego DNA [13].

Wynikiem oddziaływania RFT z DNA są oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych wchodzących w skład tej makromolekuły [42, 43]. Jedną z najbardziej znanych i najczęściej badanych modyfikacji zasad jest 8-oxo dG (8-oxo-2'-deoksyguanozyna) znana też i opisywana jako forma tautomeryczna 8-OH-dG (8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna), która jednak w warunkach fizjologicznych jest mniej stabilna. Powstaje ona w wyniku oddziaływania rodnika hydroksylowego, bądź tlenu singletowego z DNA. 8-OH-dG (nazwy obu form tautomerycznych stosowane są w tym opracowaniu zgodnie z pracami źródłowymi) z dużą czułością jest wykrywana za pomocą metody HPLC. Szacuje się, że poziom wymienionego markera wolnorodnikowych modyfikacji DNA jest 16-krotnie wyższy w mtDNA w porównaniu z DNA jądrowym, co

odpowiada poziomowi uszkodzeń 1 na 8000 zasad [11, 43]. W mitochondriach wątroby szczura poziom cząsteczek 8-hydroksyguaniny wynosi $0,8 \pm 0,2$ na 10^5 pz. Niższy poziom 8-oxo dG stwierdzono w nerce świni ($0,5 \pm 0,3$ na 10^5 pz) i wątrobie ($0,4 \pm 0,2$ na 10^5 pz). Natomiast ilość miejsc z delecją zasad (miejsca AP, miejsca apurynowe i apirymidynowe) była niższa niż, 0,2 na 10^5 pz we wszystkich badanych przypadkach [25].

Z biologicznego, ale i z klinicznego punktu widzenia istotny wydaje się fakt, że 8-OH-dG będąca swoistym markerem oksydacyjnych uszkodzeń DNA ma działanie mutagenne [44]. Poziom 8-oxo-dG mtDNA w mięśniu przepony człowieka, w wieku 85 lat, stanowi około 0,5% cząsteczek deoksygwanozyny (dG) w DNA tej organelli. W mtDNA izolowanym od osobników młodych stwierdzono 25-krotnie niższy poziom 8-oxo-dG. Wysoki poziom 8-oxo-dG (0,87% cząsteczek dG) obserwowano także w mtDNA izolowanym z tkanki mózgowej pochodzącej od osobnika w wieku 90 lat [39].

Wyższy poziom uszkodzonych oksydacyjnie zasad i mutacji w mtDNA w porównaniu do DNA jądrowego wynika z kilku przyczyn:

- 1) jest efektem lokalizacji DNA w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej gdzie produkowane są oksydanty;
- 2) mtDNA nie jest skompleksowany z białkami (brak histonów i białek niehistonowych, które w jądrze komórki wchodzi w skład chromatyny);
- 3) mniej skutecznie działają w mitochondriach mechanizmy naprawy DNA (są jednak w nich obecne);
- 4) mtDNA ssaków (w tym i człowieka) nie zawiera intronów, co powoduje, że do utrzymania funkcji bioenergetycznych niezbędna jest ekspresja całego genomu, a w jądrze tylko jego 7%.

RFT mogą powodować również pęknięcia nici mtDNA. Takie czynniki jak adriamycyna i bleomycyna są przyczyną tlenowo-zależnych pęknięć mtDNA w warunkach *in vivo*, w hodowlach komórkowych, jak również w izolowanych mitochondriach. Alloksan, ulegający cyklowi redoks w komórkach (co prowadzi do wytwarzania RFT) powoduje, jak wykazano, fragmentację łańcucha DNA w izolowanych mitochondriach. mtDNA jest również w większym stopniu zagrożony uszkodzeniami wywołanymi przez środki alkilujące i policykliczne aromatyczne węglowodory niż DNA jądrowy [14].

W mitochondriach system naprawy DNA jest, jak wspomniano, mniej skuteczny niż w jądrze komórkowym, ale w prawidłowym stanie fizjologicznym poziom oksydacyjnych modyfikacji mtDNA jest niższy niż zaobserwowany w stanach chorobowych związanych z upośledzeniem funkcji mitochondriów, czy też podczas starzenia się. Jest to w pewnym stopniu wynik częściowej inaktywacji generowanych w organelli RFT jak i obecności mechanizmów naprawczych w prawidłowo funkcjonujących mitochondriach. Mi-

tochondria ssaków nie posiadają funkcjonujących w wystarczający sposób mechanizmów reparacji rekombinacyjnej ale mogą usuwać uszkodzone zasady, zawierając glikozylazy uracylu, AP endonukleazy oraz posiadają zdolność naprawy alkilowanych zasad DNA [45-47, 25]. Natomiast wyraźnie można zauważyć, że poziom 8-oxo-dG w mtDNA wątroby szczura (Fisher 344) ulega 2-3 krotnemu podwyższeniu u zwierząt starych tzn. w wieku 24 miesięcy (przy maksymalnym okresie życia wynoszącym 30 miesięcy) [48]. Związana ze wzrastającym wiekiem organizmu akumulacja oksydacyjnych uszkodzeń mtDNA koreluje z poziomem delecji stwierdzonych w licznych tkankach. Tego typu uszkodzenia mogą być przyczyną dysfunkcji mitochondriów.

IV. Niektóre jednostki chorobowe związane z uszkodzeniami mitochondriów

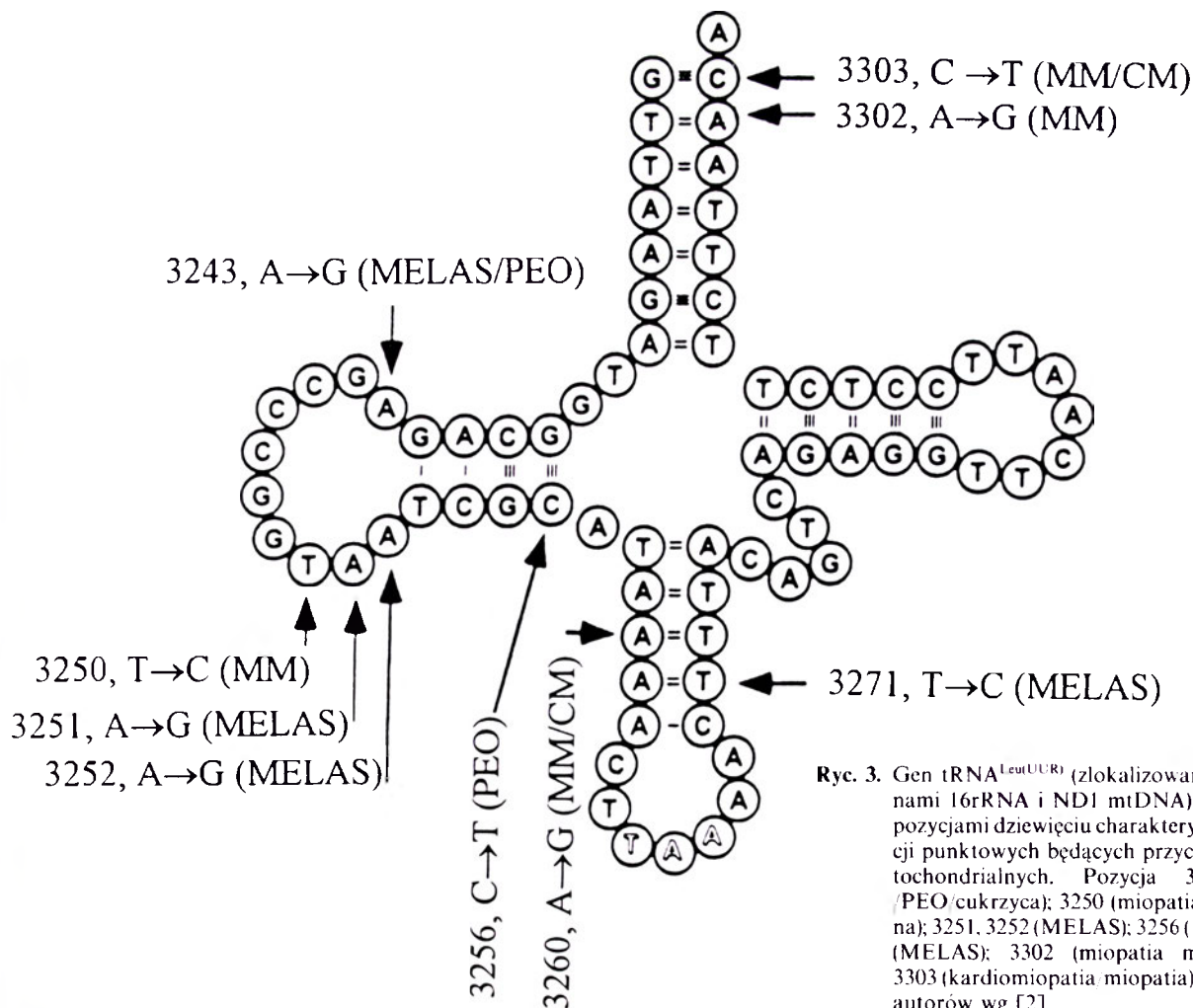
Miopatie, encefalomiopatie, encefalopatie. Koncepcja zakładająca, że dysfunkcje mitochondriów mogą być przyczyną chorób człowieka wysunięta została początkowo głównie przez zespół Ernster'a i Lufta [49]. W 1962 roku opisany został przypadek pacjentki z objawami ostrego hipermetabolizmu, u której stwierdzono zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów włókien mięśniowych [50]. W ciągu następnych lat opisane zostały przypadki innych stanów patologicznych, w których zaburzenia funkcji mitochondriów stanowią istotny czynnik patogenetyczny. Szczególną uwagę zwrócono na mutacje mtDNA obecne w niektórych miopatiach mitochondrialnych czy też wrodzonej neuropatii nerwu wzrokowego Lebera (ang. *Leber's hereditary optic neuropathy*, LHON). W przypadku LHON obserwuje się ostrą lub podostrą utratę wzroku u mężczyzn około 20 roku życia. W 1988 roku opisano przypadek encefalomiopatii z dużą delecją w obrębie mtDNA [51], oraz tranżycję G na A w parze nukleotydów 11778 mtDNA u pacjenta z LHON będącą przyczyną zmiany struktury podjednostki 4 dehydrogenazy NADH [52]. W przypadku LHON charakterystyczną cechą, (dotyczącą zresztą także większości miopatii jak np. MERRF, MELAS i innych — patrz poniżej), jest występowanie (koegzystencja) w tej samej komórce, zarówno zmutowanych cząsteczek mtDNA, jak i makromolekuł typu dzikiego (heteroplazmia). Najprawdopodobniej wynika to z faktu losowej segregacji mitochondriów w czasie podziału do komórek potomnych, oraz mutacji powstających *de novo*, wskutek czego tworzy się swoisty rodzaj mozaiki komórek zawierających różną liczbę uszkodzonych kopii genów. Wiąże się z tym mniejsze lub większe upośledzenie funkcji mitochondriów i różny stopień nasilenia objawów chorobowych. Heteroplazmia może być specyficzna narządowo oraz zróżnicowana indywidualnie. Do dnia dzisiejszego opisanych zostało szereg zespołów klinicznych u podłoża których leżą specyficz-

ne mutacje, delecje i duplikacje mtDNA oraz upośledzona synteza białek podjednostek kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Przykład stanowią mutacje punktowe lizynowego tRNA (gen tRNA^{Lys}, pozycja 8344) w mioklonalnej padaczce z kosmatymi czerwonymi włóknami (ang. *myoclonic epilepsy with ragged-red fibers* (RRF), MERRF) [53] i mutacje punktowe leucynowego tRNA (gen tRNA^{Leu(UUR)}, pozycja 3243) w encefalopatii mitochondrialnej z kwasicą mleczanową i epizodami udaropodobnymi (ang. *mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes*, MELAS) [54] (patrz również Ryc. 3). U 50% pacjentów z chroniczną postępującą zewnętrzną oftalmoplegią (ang. *chronic progressive external ophthalmoplegia*, CPEO) z kosmatymi czerwonymi włóknami, stwierdzone zostały duże delecje od 1,3 do 7,6 kb, bądź duplikacje, a w prawie 100% dotyczy to pacjentów z zespołem Kearns-Sayrea (ang. *Kearns-Sayre syndrome*, KSS) [49]. Stopień delecji często skorelowany jest z natężeniem objawów CPEO. Delecje tego typu wydają się powstawać w czasie oogenezy i stąd nie są dziedziczone po matce. Co również jest interesujące nie muszą one występować we wszystkich komórkach, np. może ich nie być w leukocytach.

Interesujące wydają się obserwacje wskazujące, że jeden z czynników egzogennych jakim jest AZT (3'-azy-

do-3'-deoksytymidyna) podawany w długofalowym leczeniu HIV-pozytywnych pacjentów może być przyczyną rozwoju miopatii z RRF [2]. Ponieważ AZT jest analogiem zasad, który podlega inkorporacji w mtDNA, fakt ten wiąże się obecnie z upośledzeniem zdolności do syntezy tej makrocząsteczki. Ponadto znane są inne analogi zasad podobnie hamujące replikację mtDNA, takie jak 2', 3'-dideoksytydina i fialurydina [2]. Podejrzewa się, że terapia z zastosowaniem AZT wywalała w komórkach „szok tlenowy”. Na podstawie badań eksperymentalnych dowiedziono, że podawanie myszom AZT wywalało konwersję deoksyguanozyny do 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny w mitochondrialnym DNA komórek tych zwierząt.

Wyniki wielu badań wskazują, że generalnie wyróżnić można dwie grupy zespołów klinicznych w których stwierdza się uszkodzenia mtDNA. Pierwsza grupa obejmująca miopatie i encefalomiopatie charakteryzuje się występowaniem u pacjentów kosmatych czerwonych włókien (RRF). Włókna te barwiące się charakterystycznie metodą Gomoriego, zawierają rozmieszczone peryferycznie i w obszarze intermiofibrylarnym nieprawidłowe mitochondria. RRF stanowią zatem „histologiczny marker” chorób tej grupy do której zalicza się: MERRF, MELAS, KSS, CPEO oraz dziedziczną po matce miopatię i kardiomiopatię (ang.



Ryc. 3. Gen tRNA^{Leu(UUR)} (zlokalizowany pomiędzy genami 16rRNA i ND1 mtDNA) z zaznaczonymi pozycjami dziewięciu charakterystycznych mutacji punktowych będących przyczyną chorób mitochondrialnych. Pozycja 3243 (MELAS/PEO/cukrzyca); 3250 (miopatia mitochondrialna); 3251, 3252 (MELAS); 3256 (PEO); 3260, 3271 (MELAS); 3302 (miopatia mitochondrialna); 3303 (kardiomiopatia miopatia) — dane różnych autorów wg [2].

maternally inherited myopathy and cardiomyopathy, MMC). Drugą grupę chorób stanowią „czyste” encefalopatie (bez znaczących zmian w obrębie tkanki mięśniowej). Obejmuje ona LHON i ataksję neurogenną, neurogenną słabość mięśni oraz barwnikowe zwyrodnienie siatkówki. Ostatnia z wymienionych chorób (RP-matczyne barwnikowe zwyrodnienie siatkówki) opisana została w jednej rodzinie. Charakterystyczna dla tej jednostki chorobowej jest mutacja punktowa w podjednostce 6 H⁺-ATPazy w pozycji 8993 (wg Harding A E (1991) *Trends Neurosci* 14, 132).

Oprócz wymienionych powyżej stanów chorobowych do dnia dzisiejszego zidentyfikowano i opisano wiele innych chorób powiązanych z uszkodzeniami mtDNA. Często są to przypadłości charakterystyczne dla osobników w starszym wieku (choroby degeneracyjne wieku starczego) [49]. W badaniach patogenezy chorób powiązanych z defektami procesu fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach i uszkodzeniami mtDNA zwraca się uwagę na tkanki, które w sposób szczególny zależne są od dopływu dużych ilości ATP zapewniającego ich prawidłowe funkcjonowanie. Są to tkanki centralnego układu nerwowego, mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych, nerki, wątroby oraz siatkówka i wyspy trzustki. Mózg człowieka stanowiąc ok. 2% masy ciała konsumuje aż 20% tlenu zużywanego przez organizm. Dla porównania, mięśnie szkieletowe stanowiąc ok. 30% masy ciała zużywają tylko 40% tlenu wykorzystywanego przez organizm. Niemniej istotnym jest fakt, że konsumpcja tlenu w mięśniach wzrasta ponad dwukrotnie podczas wysokiej aktywności fizycznej i w niektórych stanach patologicznych [55].

Układ sercowo-naczyniowy. Jak wykazano, chronicznemu niedokrwieniu mięśnia sercowego towarzyszą delecje 5-kz mtDNA, jak również kompensacyjna indukcja niektórych genów mitochondrialnych [56]. Stwierdzone delecje mtDNA i zahamowanie aktywności enzymów procesu fosforylacji oksydacyjnej w starzejącym się mięśniu sercowym stanowić mogą przyczynę zachwiania równowagi oksydacyjnej (co nasila szok tlenowy), z bardzo rozległymi konsekwencjami biologicznymi. Przejawia się to między innymi odkładaniem płytek miażdżycowych (których jednak główną pierwotną przyczyną jest zaburzony metabolizm cholesterolu) i rozwojem chorób mięśnia sercowego, takich jak np. kardiomiopatia rozstrzeniowa i zespół niedokrwienia układu sercowo-naczyniowego. Według niektórych autorów w tych przypadkach niezbędne jest określenie poziomu antyoksydantów w płynach ustrojowych pacjentów i w razie jego obniżenia podanie dużych — terapeutycznych dawek koenzymu Q [49].

Cukrzyca. Insulino-niezależna cukrzyca (ang. *non-insulin dependent diabetes mellitus*, NIDDM) jest schorzeniem często występującym u osobników w wieku starszym. Z patogenezą tej choroby związane są mutacje w obrębie mtDNA [57]. U pacjentów dotkniętych NIDDM stwierdzone zostały bardzo duże

delecje (10,4 kz) mtDNA, które zaburzają replikację łańcucha lekkiego tej makrocząsteczki. NIDDM, którą dotkniętych jest 90% populacji cukrzyków może być powiązana ze specyficznymi mutacjami mtDNA. Nie należy jednakże zapominać, że w patofizjologii cukrzycy odgrywać mogą pewną rolę zarówno czynniki środowiskowe związane ze stylem życia, jak i obniżenie wydajności procesu fosforylacji oksydacyjnej jakie obserwuje się wraz ze wzrastającym wiekiem [49].

Wiele tzw. czynników diabetogennych atakujących słabo chroniony genom mitochondrialny wyzwała w tych organellach szok tlenowy [58]. Do czynników tych należą interleukina-1 β , interferon- γ , TNF- α , allosan i streptozotocyna [59]. Ich patogenne działanie jest hamowane przez antyoksydanty, co stwierdzono zarówno w badaniach na modelach zwierzęcych jak i w przypadku człowieka [58, 60]. Powyższe obserwacje pozwoliły na wysunięcie hipotezy, że czynniki o działaniu diabetogennym indukują pęknięcia łańcucha mtDNA komórek beta wysp trzustki, co stanowi jedną z przyczyn śmierci tych komórek [61], chociaż niektórzy autorzy kwestionują uniwersalność tej hipotezy [62]. Uszkodzenia genomu mitochondrialnego brane są także pod uwagę jako czynnik w patogeniezie cukrzycy insulino-zależnej (ang. *insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM) [59]. Niektóre dane kliniczne zdają się potwierdzać rolę uszkodzeń mtDNA w rozwoju cukrzycy. Otóż pacjenci z KSS i CPEO zapadają na cukrzycę znacznie częściej niż przeciętny osobnik populacji [63-65]. Oprócz wspomnianej wyżej delecji, w rodzinach cukrzyków opisane zostały tranzycje A do G w parze nukleotydów np. 3243 mitochondrialnego genu dla tRNA^{Leu}(UUR) [66, 67]. Mutacje tego typu są przyczyną zaburzeń terminacji transkrypcji mitochondrialnej wynikiem czego są defekty syntezy białek mitochondrialnych [68].

Centralny układ nerwowy. Komórki centralnego układu nerwowego konsumują w procesach metabolicznych duże ilości tlenu (głównie podczas produkcji energii w procesie fosforylacji oksydacyjnej). Zmiany degeneracyjne w obrębie neuronów mogą być wynikiem zaburzenia równowagi oksydacyjno/antyoksydacyjnej co wyzwała w komórce szok tlenowy [69, 70]. Konsekwencją tego stanu są akumulowane w komórce uszkodzenia DNA, białek i lipidów. Implikacje związane z szokiem tlenowym odnosi się obecnie do niektórych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS), choroba Huntingtona i choroba Alzheimerera. Wszystkie wymienione stany patologiczne charakteryzują się występowaniem delecji, bądź mutacji mtDNA oraz nieprawidłowym funkcjonowaniem kompleksów łańcucha oddechowego. We wszystkich przypadkach szok tlenowy stanowić może jedną z przyczyn postępującej degeneracji neuronów co jest charakterystycznym objawem chorób centralnego układu nerwowego. Mitochondria pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimerera wykazują

defekty kompleksu IV łańcucha oddechowego [71], nie do końca jest jednak wyjaśnione czy przyczyną tego są mutacje mtDNA. Podobnie jest w przypadku choroby Huntingtona. Defekty kompleksu I i IV stwierdzone zostały w zwojach podstawy mózgu i mitochondriach płytek krwi pacjentów [72, 73]. U pacjentów z chorobą Huntingtona obserwuje się 5-11-krotny wzrost delecji mtDNA w obrębie neuronów korowych, w porównaniu do osób tej samej grupy wiekowej, stanowiących kontrolę [74]. W przypadku choroby Parkinsona niektórzy autorzy opisali chorobowo-specyficzne delecje mtDNA w mózgu pacjentów [75, 76], nie zostało to jednak potwierdzone przez innych badaczy [77, 78]. Stwierdzono natomiast akumulację delecji (podobnego typu) w mózgach osób w podeszłym wieku.

V. Mitochondria a proces starzenia się

Na podstawie wyników uzyskanych w wielu badaniach przyjmuje się obecnie, że wolne rodniki tlenowe mogą być jednym z czynników wyzwalających zmiany prowadzące do starzenia się [4, 6]. W jednej z hipotez zakłada się, że mutacje mtDNA i tym samym zmiany w bioenergetyce komórkowej stanowią znaczący czynnik starzenia się i rozwoju chorób często występujących w wieku podeszłym [2, 79]. Wykazano, że wydajność procesu fosforylacji oksydacyjnej obniża się wraz ze wzrastającym wiekiem [80], czemu towarzyszy akumulacja defektów mitochondrialnego bądź jądrowego DNA (czasem dotyczy to obu makromolekuł). Produkcja ATP spada poniżej poziomu niezbędnego dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Udowodnionym jest fakt, że procesowi „fizjologicznego starzenia” towarzyszą uszkodzenia makrocząsteczek komórkowych takich jak mtDNA (ale również białek i lipidów) oraz, że tego typu uszkodzenia akumulowa-

ne są wraz z wiekiem [81-84] (Tab. 1., Ryc. 4). Stosując metodę PCR stwierdzono w mitochondrialnym genomie różnych tkanek człowieka (w starszym wieku) występowanie delecji 5-kz (pomiędzy pozycjami nukleotydów 8, 470 i 13, 459) [85]. Ta sama metoda pozwoliła na detekcję delecji w prawidłowym mięśniu sercowym i mózgu osobników w podeszłym wieku [86], jak również w wątrobie człowieka. Delecje mtDNA w mięśniu sercowym, wielkości 3,6-kz, jak i delecje 3-kz w mięśniach szkieletowych występują u ludzi powyżej 35 roku życia [56, 86-88]. Ponadto, poziom cząsteczek mitochondrialnych mRNA i rRNA obniża się wraz z wiekiem, co wykazano w badaniach mózgu i serca szczurów [89] i związane to jest z 50% spadkiem tempa transkrypcji [90]. W ischemicznych sercach, hamowanie procesu fosforylacji oksydacyjnej jest związane ze wzrostem uszkodzeń mtDNA [91]. Znaczenie reaktywnych form tlenu jako czynnika generującego delecje mtDNA jest poparte obserwacjami wskazującymi, że dokсорubicyna — będąca czynnikiem stymulującym produkcję wolnych rodników tlenowych w mitochondriach wyzwała znaczący wzrost delecji mtDNA tkanki mięśnia sercowego. Efekt ten jest natomiast hamowany przez ubihinon (Koenzym Q₁₀), kluczowy składnik mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, którego zredukowana forma (ubihinol) wykazuje działanie antyoksydacyjne [23].

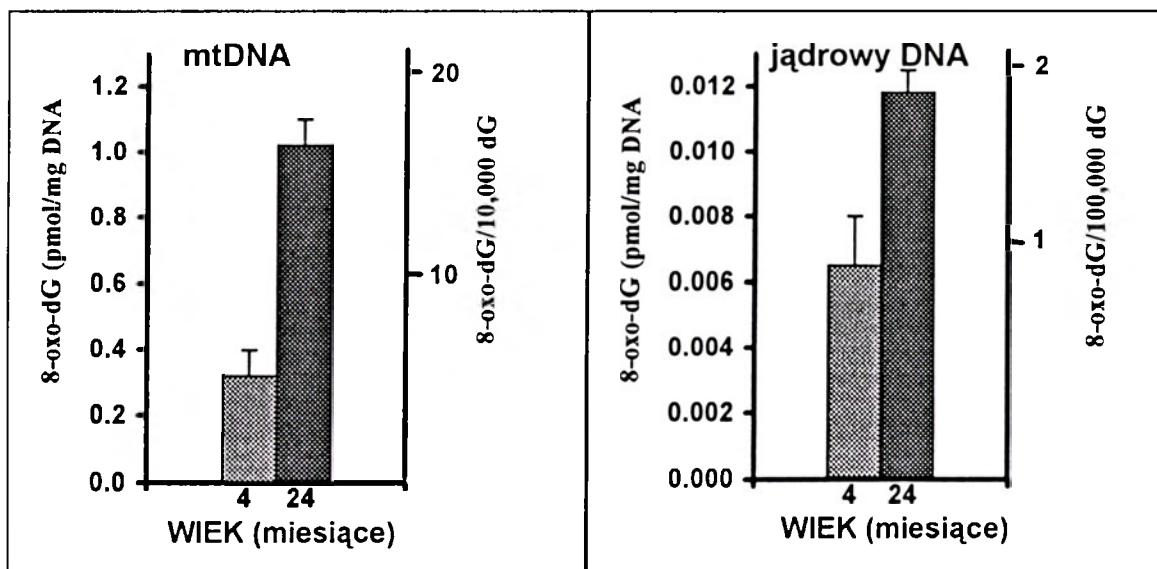
Interesujące są wyniki badań wykazujących, że szybkość wytwarzania Q₂ przez mitochondria mięśni poruszających skrzydłami muchy domowej (*Musca domestica*) zwiększa się ponad dwukrotnie pomiędzy 8 a 15 dniem życia owada dorosłego (co odpowiada 40% i 75% przeciętnej długości trwania życia imago). Podobnie u szczurów, szybkość uwalniania H₂O₂ przez mitochondria serca i mózgu jest odpowiednio o 21% i 30% większa dla zwierząt 18 miesięcznych niż

Tabela 1.

Zmiany w mitochondriach obserwowane podczas starzenia się organizmów (dane różnych autorów wg [3])

Badany parametr	Obserwowany efekt	Narząd	Organizm
produkcja O ₂ ⁻ i H ₂ O ₂	wzrost	serce	szczur
produkcja O ₂ ⁻ i H ₂ O ₂	wzrost	wątroba	różne
produkcja O ₂ ⁻ i H ₂ O ₂	wzrost	nerka, serce	różne
oksydacyjne uszkodzenia mtDNA	wzrost	mózg i mięsień przepony	człowiek
oksydacyjne uszkodzenia mtDNA	wzrost	wątroba	szczur
delecje mtDNA	wzrost	różne obszary mózgu	człowiek
delecje mtDNA	wzrost	mięsień przepony, inne narządy	człowiek
addycje/delecje mtDNA	wzrost	wątroba	mysz, szczur
wiązania krzyżowe mtDNA-białko	wzrost	wątroba	szczur
peroksydacja lipidów	wzrost	frakcja mikrosomalna mitochondriów wątroby	szczur
płynność błony ADP/O	obniżenie bez zmian	wątroba	szczur
		różne narządy	różne

ADP/O — oznacza stosunek produkcji ATP do wielkości konsumpcji tlenu cząsteczkowego.



Ryc. 4. Poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA wzrasta wraz z wiekiem. Schemat obrazuje wzrost poziomu 8-oxo-2-deoksyguanozyny w mitochondrialnym i jądrowym DNA izolowanym z wątroby młodych i starych szczurów (wg [40]).

3 miesięcznych. Efekt ten wynikać może z względnego obniżenia aktywności oksydazy cytochromowej (w stosunku do aktywności enzymów kompleksów I-III łańcucha oddechowego) u zwierząt starszych [92]. Ponadto, wykazane zostały wiekowo-zależne zmiany poziomu koenzymu Q w obrębie różnych tkanek szczura [93] i człowieka [94].

Obecnie, coraz powszechniej przyjmuje się, że proces starzenia się związany jest z zaburzeniami równowagi pomiędzy formowaniem reaktywnych form tlenu i działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego (co wywala szok tlenowy). Leży to u podstaw obniżenia wydajności procesu fosforylacji oksydacyjnej w wielu tkankach i uszkodzeń makromolekuł komórkowych, w tym mtDNA. Morfologicznym wyznacznikiem tych zmian w komórce mogą być gromadzone, wraz ze wzrastającym wiekiem, ziarnistości lipofuscyny, znane też jako „pigment starczy” [95].

VI. Ochronne działanie czynników antyoksydacyjnych w chorobach i starzeniu się

Pełne zrozumienie mechanizmów leżących u podłoża rozwoju tzw. „chorób mitochondrialnych”, może zaowocować opracowaniem skutecznych form terapii i umożliwić zapobieganie rozwojowi tych dotkliwych schorzeń, oraz opóźnić i łagodzić efekty starzenia się organizmu. W prawidłowych warunkach fizjologicznych wolnorodnikowym uszkodzeniom makromolekuł komórkowych zapobiegają, w pewnym stopniu, obecne w organizmie endogenne systemy ochronne. W przypadku nadmiernej produkcji wolnych rodników, czy też obniżenia aktywności endogennych antyoksydantów bądź/i sprawności mechanizmów naprawczych ten stan równowagi zostaje zaburzony (patrz: artykuł opisujący cykl rodników tlenowych w organizmie [96]).

Obiecujące wyniki terapii z zastosowaniem antyoksydantów (tzw. terapia redoks) opisano w przypadku licznych pacjentów dotkniętych „klasycznymi” schorzeniami mitochondrialnymi, np. KSS. Koenzym Q (CoQ) zajmuje szczególne miejsce w tego typu terapii. CoQ, będący nośnikiem elektronów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, stabilizuje podjednostki łańcucha oddechowego i wykazuje działanie antyoksydacyjne. Ochrona wrażliwej na peroksydację kardioplipiny ma istotne znaczenie w utrzymaniu funkcji mitochondriów, na co wskazuje fakt, że lipid ten warunkuje prawidłową interakcję pomiędzy cytochromem c i oksydazą cytochromową [97]. CoQ, jak wykazano, ma znaczące działanie lecznicze w przypadku wspomnianego powyżej zespołu KSS jak i CPEO oraz w przypadku MELAS. Bursztynian, dawca elektronów dla mitochondrialnego łańcucha oddechowego, eliminuje udaropodobne epizody u pacjentów z MELAS. Witaminy K₁ i K₃ transportują elektrony na cytochrom c z pominięciem elektronów z CoQ. Również witamina C, bądź witamina C łącznie z menadionem (witamina K₃) może redukować cytochrom c. Kombinacja obu reduktantów poprawia wydolność bioenergetyczną mięśni szkieletowych z różnymi defektami w kompleksie III łańcucha oddechowego, jak wykazano w badaniach *in vivo*. Witamina K₁ usprawnia funkcję siatkówki u pacjentów z CPEO. Podawanie choremu ryboflawiny, prekursora flawinowych nukleotydów adeninowych, poprawia sprawność pacjentów z dysfunkcją kompleksu I [14]. CoQ stosowany zaczyna być również jako środek leczniczy w przypadku zaburzenia równowagi oksydacyjno/antyoksydacyjnej w chorobach wieku starczego [49]. Pomimo licznych już pozytywnych doniesień, prowadzenie dalszych badań nad zastosowaniem antyoksydantów w terapii jest niezbędne dla dokładniejszego zrozumienia ich roli jako środków terapeutycznych łącznie

z zastosowaniem ich w terapii innych niż opisywane schorzeń, oraz jako czynników łagodzących objawy starzenia się.

Artykuł otrzymano 9 kwietnia 1996 r.

Zaakceptowano do druku 17 października 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Miquel J, de Juan E, Sevilla I (1992) W: Emerit I, Chance B (red) *Free Radicals and Aging*. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, str 47-57
2. Grossman LI (1995) *Environmental and Molecular Mutagenesis* **25**: (Suppl 26): 30-37
3. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10771-10778
4. Jurgowiak M, Oliński R (1995) *Kosmos* **44** (1): 71-88
5. Jaruga P, Oliński R (1994) *Post Hig Med Dośw* **48** (4): 443-456
6. Bartosz G (1995) *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN
7. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1995) *Biochim Biophys Acta* **1271**: 165-170
8. Boveris A, Oshino N, Change B (1972) *Biochem J* **128**: 617-630
9. Kappus H, Sies H (1981) *Experientia* **37**: 1233-1241
10. Harman D (1972) *J Amer Geriatr Soc* **20**: 145-147
11. Richter C, Park JW, Ames BN (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6465-6467
12. Richter C (1988) *FEBS Lett* **241**: 1-5
13. Wieland P, Lauterburg BH (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 815-819
14. Richter C (1995) *Current Topics in Bioenergetics* **17**: 1-19
15. Takasawa M, Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Ito T, Ozawa T (1993) *Exp Gerontol* **28**: 269-280
16. Sohal RS (1991) *Mech Ageing Dev* **60**: 189-198
17. Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH (1990) *Free Radic Biol Med* **10**: 495-500
18. Sohal RS, Sohal BH, Orr WC (1995) *Free Radic Biol Med* **19**: 499-504
19. Cutler RG (1984) W: *Free Radicals in Biology*, W A Pryor (red), Academic Press, Orlando, FL **4**: 371-428
20. Fridovich I (1995) *Annu Rev Biochem* **64**: 97-112
21. Thomas SM, Gebicki JM, Dean RT (1989) *Biochim Biophys Acta* **1002**: 189-197
22. Sies H (1989) *Naturwissenschaften* **76**: 57-64
23. Frei B, Kim M, Ames BN (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4879-4883
24. Hayakawa M, Ogawa T, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **176**: 87-93
25. Hegler J, Bittner D, Boiteux S, Epe B (1993) *Carcinogenesis* **14**: 2309-2312
26. Nohl H, Hegner D (1978) *Eur J Biochem* **82**: 563-567
27. Wallace DC (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8739-8746
28. Wallace DC (1992) *Science* **256**: 628-632
29. Bandy B, Davison AJ (1990) *Mutat Res* **8**: 523-539
30. Wallace DC, Lott MT, Torroni A, Brown MD, Shoffner JS (1994) W: *Human gene mapping: A compendium*, Cuticchia A J, Pearson P L (red) Johns Hopkins University Press, Baltimore str 813-845
31. Attardi G, Schatz G (1988) *Annu Rev Cell Biol* **4**: 289-333
32. Margolis L (1981) *Symbiosis in cell evolution*, Freeman, San Francisco
33. Gross NJ, Getz GS, Rabinowitz M (1969) *J Biol Chem* **244**: 1552-1562
34. Brown WM, George MJR, Wilson AC (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1967-1971
35. Martin AP, Naylor GJP, Palumbi SR (1992) *Nature (Lond)* **357**: 153-155
36. Saul RL, Gee P, Ames BN (1987) W: *Modern biological theories of aging*, Warner HR, Butler RN, Sprott RL, Schneider EL (red) Raven Press, New York str 113-129
37. Zastawny TH (1995) *Post Hig Med Dośw* **49**: 609-630
38. Inlay JA, Linn S (1986) *J Bacteriol* **166**: 519-527
39. Mecocci P, Mac Garvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal M F (1993) *Ann Neurol* **34**: 609-616
40. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4533-4537
41. Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN, Singh G, Webster KA, Greenberg BD (1987) *Curr Genet* **12**: 81-90
42. Oliński R (1993) *Post Hig Med Dośw*. **47**: 463-474
43. Halliwell B, Aruoma OI (1991) *FEBS Lett* **281**: 9-19
44. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb L (1992) *J Biol Chem* **267**: 166-172
45. Tomkinson AE, Bonk RT, Linn S (1988) *J Biol Chem* **263**: 12532-12537
46. Tomkinson AE, Bonk RT, Kim J, Bartfeld N, Linn S (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 929-935
47. Myers KA, Saffhill R, O'Connor PJ (1988) *Carcinogenesis* **9**: 285-292
48. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7915-7922
49. Luft R (1995) *Biochim Biophys Acta* **1271**: 1-6
50. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962) *J Clin Invest* **41**: 1776-1804
51. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) *Nature (Lond)* **331**: 717-719
52. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, Elsas IMJ, Nikoskelainen E (1988) *Science* **242**: 1427-1430
53. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC (1990) *Cell* **61**: 931-937
54. Goto Y, Nowaka I, Horai S (1990) *Nature (Lond)* **348**: 651-653
55. Frisell WR (1982) *Human Biochemistry*, Mac Millan, New York
56. Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT, Kanter K, Wallace DC (1991) *JAMA J Am Med Assoc* **266**: 1812-1816
57. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC (1992) *Nat Genet* **1**: 11-15
58. Heineke EW, Johnson MB, Dillberger JE, Robinson K M (1993) *Diabetes* **42**: 1721-1730
59. Gerbitz KD (1992) *Diabetologia* **35**: 1181-1186
60. Elliott RB, Chase HP (1991) *Diabetologia* **34**: 362-365
61. Okamoto H (1990) W: *The molecular biology of the islets of Langerhans*, Okamoto H (red), University Press Cambridge str 209-231
62. Eizirik DL, Sandler S, Ahnstrom G, Welsh M (1991) *Biochem Pharmacol* **42**: 2275-2282
63. Quada A, Ziers S, Klingmuller D (1988) *Klin Wochenschr* **66** (Suppl XIII): 34-38
64. Lakin M, Locke S (1961) *Diabetes* **10**: 228-231
65. Tanabe Y, Migamoto S, Kinoshita Y, Yamada S, Sasaki N, Makino E, Nakajima H (1988) *Eur Neur* **28**: 34-38
66. Van den Ouweland JMV, Lemkes H, Massen JA (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 1962
67. Reardon W, Ross RJM, Sweeney MG, Luxon L, Pembrey ME, Harding AE, Trembath RC (1992) *Lancet* **34**: 1376-1379
68. Hess JF, Parisi MA, Bennett JL, Clayton DA (1991) *Nature (Lond)* **351**: 236-239
69. Kato K, Puttfarcken PS, Lyons WE, Coyle JT (1991) *Pharmacol Exp Ther* **256**: 402-411
70. Choi DW, Maulucci-Gedde C, Kriegstein AR (1987) *J Neurosci* **7**: 357-368
71. Parker WD Jr, Filley CM, Parks JK (1990) *Neurology* **40**: 1302-1303
72. Brennan Wa Jr, Bird ED, Aprille JR (1985) *J Neurochem* **44**: 1948-1950
73. Parker WD Jr, Boyson SJ, Luder AS, Parks JK (1990) *Neurology* **40**: 1231-1234
74. Wallace DC (1995) *Am J Hum Genet* **57**: 201-223
75. Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Hattori K, Kondo T, Mizuno Y, Ozawa T (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 1044-1048
76. Ozawa T, Tanaka M, Ikebe S, Ohno K, Kondo T, Mizuno Y (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 483-489

77. Schapira AHV, Holt IJ, Sweeney M, Harding AE, Jenner P, Marsden CD (1990) *Movement Dis* 5: 294-297
78. Mann VM, Cooper JM, Schapira AHV (1992) *FEBS Lett* 299: 218-222
79. Piko L, Hougham AJ, Bulpitt KJ (1988) *Mech Ageing Dev* 43: 279-293
80. Wallace DC (1992) *Annu Rev Biochem* 61: 1175-1212
81. Ames BN, Shigenaga MK (1992) *Ann NY Acad Sci* 663: 85-96
82. Sai K, Takagi A, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y (1992) *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 11: 139-143
83. Stadtman ER (1992) *Science* 257: 1220-1224
84. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M (1989) *Lancet* 1: 642-645
85. Linnane AW, Baumer A, Maxwell RJ, Preston H, Zhang C, Marzuki S (1990) *Biochem Int* 22: 1067-1076
86. Cortopassi GA, Arnheim N (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 6927-6933
87. Hattori K, Tanaka M, Sugiyama S, Obayashi T, Ito T, Satake T, Hanaki Y, Asai J, Nagaas M, Ozawa T (1991) *Am Heart J* 121: 1735-1742
88. Katayama M, Tanaka M, Yamamoto H, Obayashi T, Mimura Y, Ozawa T (1991) *Biochem Int* 25: 47-56
89. Gadaleta MN, Petruzella V, Renis M, Fracasso F, Cantalore P (1990) *Eur J Biochem* 187: 501-506
90. Fernandez-Silva P, Petruzella V, Fracasso F, Gadaleta MN, Cantalore P (1991) *Biochem Biophys Res Commun* 176: 645-653
91. Ames BN (1989) *Mut Res* 214: 41-46
92. Sohal RS, Svensson I, Brunk UT (1990) *Mech Ageing Dev* 53: 209-215
93. Beyer RE, Burnett BA, Cartwright KJ, Edington DW, Falzon MJ, Kreitman KR, Kuhn TW, Ramp BJ, Rhee SYS, Rosenwasser MJ, Stein M, An LCI (1985) *Mech Ageing Dev* 32: 267-281
94. Kalen A, Appelkvist EL, Dallner G (1989) *Lipids* 24: 579-584
95. Zhang JR, Sevanian A (1991) *Biochem Biophys Acta* 1085: 159-166
96. Gondko R (1995) *Post Biochem* 41: 243-247
97. Vik SB, Georgevich G, Capaldi R (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1458-1460

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

Regulamin nagrody

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

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

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

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

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

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

Białko Rieskego — składnik transmembranowych kompleksów cytochromowych

Rieske Protein — a component of transmembrane cytochrome complexes

BEATA GUBERNATOR¹,
JAROSŁAW KRÓLICZEWSKI¹,
JACEK RYBKA³,
ANDRZEJ SZCZEPANIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa
 - II-1. Struktura pierwszorzędowa
 - II-2. Izoformy
 - II-3. Grupa prostetyczna
- III. Lokalizacja w błonie
- IV. Funkcja
- V. Biosynteza
 - V-1. Struktura genu
 - V-2. Transport białka do organelli i wbudowywanie w kompleks
- VI. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure
 - II-1. Primary structure
 - II-2. Isoforms
 - II-3. Prosthetic group
- III. Topography
- IV. Function
- V. Biosynthesis
 - V-1. Gene structure
 - V-2. Protein transport to the organells and assembly into a complex
- VI. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: cyt. — cytochrom; pl — punkt izoelektryczny; kDal — kilodalton; EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny; NMR — jądrowy rezonans magnetyczny; UHDBT — 5-n-undecyl-6-hydroksy-4,7-dioksobenzotiazol; Q_p — miejsca wiązania chinolu po stronie pozytywnej błony; b_p — hem cytochromu b po stronie pozytywnej błony; LHClI — kompleks zbierający światło II; NADP — 2'-fosforan dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego; bc₁ — kompleks cytochromów bc₁; b₆f — kompleks cytochromów b₆f; Cpn60 — białko chaperonowe 60 kDal; Hsp — białko szoku cieplnego 70 kDal.

I. Wstęp

Białko Rieskego występuje powszechnie w błonach zaangażowanych w procesy energetyczne (wewnętrzne błony mitochondrialne, błony tylakoidowe, błony chromatoforów), jako niezbędny składnik wielopodjednostkowych, transmembranowych kompleksów cytochromowych bc₁ i b₆f. Nazwa białka pochodzi od nazwiska jego odkrywczy: J. S. R i e s k e, który po raz pierwszy opisał wspomniane białko, jako składnik mitochondrialnego kompleksu cytochrom bc₁ [1-2].

Uniwersalność występowania transmembranowych białkowych kompleksów bc₁ i b₆f w świecie materii żywej związana jest z ich zaangażowaniem w procesy energetyczne: heterotroficznego metabolizmu oddechowego i autotroficznego metabolizmu fotosyntetycznego. Zarówno kompleks cytochrom bc₁ jak i cytochrom b₆f są zaangażowane w transport elektronów wzdłuż błony lipidowej z równoczesną translokacją protonów w poprzek membrany. Energia wytworzonego gradientu protonów wykorzystywana jest następnie do produkcji energii chemicznej w postaci ATP.

Kompleks typu bc₁ został wyizolowany z wewnętrznej błony mitochondrialnej [3-4], chromatoforów bakterii fotosyntetyzujących oraz z błon bakterii heterotroficznych [5-7]. Kompleks b₆f wyizolowano z tylakoidowych błon chloroplastów roślin wyższych oraz sinic [8-9]. Pełniące analogiczną funkcję, kompleksy te znacznie różnią się składem polipeptydowym. Wszystkie zawierają trzy podstawowe podjednostki białkowe: cytochrom typu b (cyt. b lub cyt. b₆), białko Rieskego zawierające centrum żelazowo-siarkowe oraz cytochrom typu c (cyt. c₁ lub cyt. f). W kompleksie b₆f cytochrom b₆ oraz podjednostka IV stanowią strukturalny oraz funkcjonalny analog cytochromu b kompleksu bc₁ [10]. Kompleksy te zawierają również

¹Mgr, ²dr, Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław. ³mgr, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław.

identyczny skład grup prostetycznych: dwa hemy typu b, jeden hem typu c i jedno wysokopotencjalowe centrum żelazowo-siarkowe [4-5, 11].

Najprostszy aktywny bakteryjny kompleks bc_1 składa się z trzech podjednostek białkowych: cyt. b, cyt. c_1 i białko Riesego [5] z wyjątkiem kompleksu wyizolowanego z *Rhodobacter spheroides* wykazującego obecność czterech podjednostek polipeptydowych [6-7].

Wśród badaczy istnieje powszechna zgoda dotycząca struktury oraz lokalizacji (liczby fragmentów transmembranowych i orientacji) cytochromów typu b i c w błonie biologicznej. Natomiast badania nad białkiem Riesego nadal dostarczają kontrowersyjnych danych dotyczących struktury przestrzennej tej podjednostki oraz jej usytuowania w błonie.

Niniejsza praca jest próbą zestawienia dostępnych danych dotyczących struktury, umiejscowienia w błonie, funkcji oraz biosyntezy białka Riesego pochodzącego z różnych organizmów — od prymitywnych bakterii po wyższe organizmy roślinne i zwierzęce.

II. Budowa

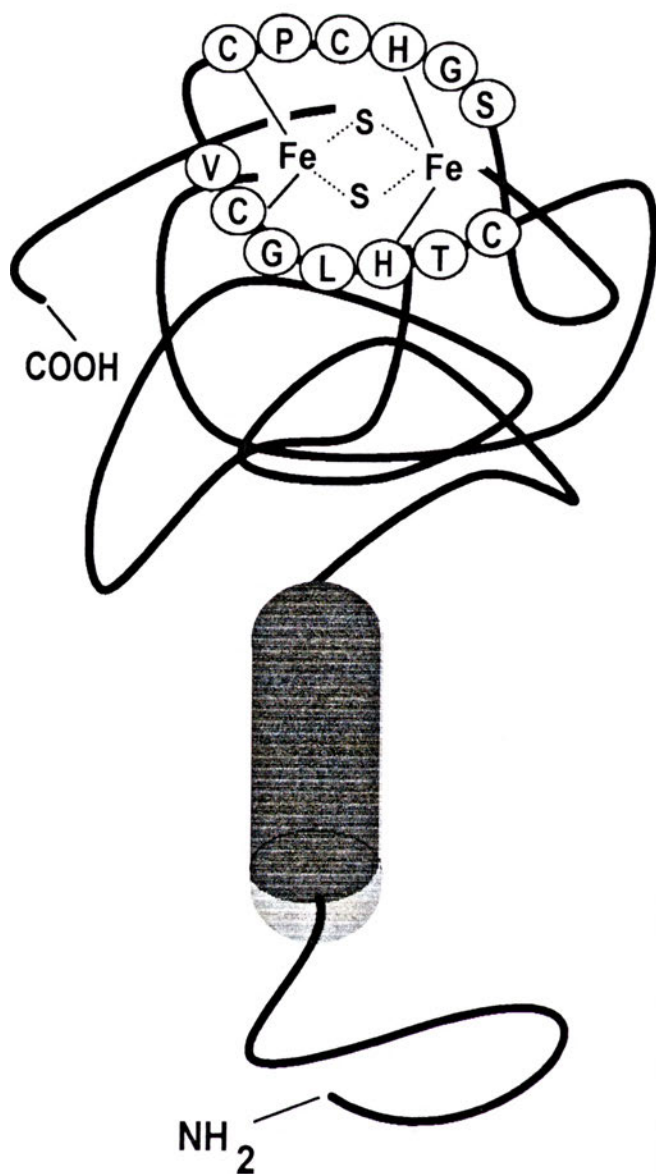
II-1. Struktura pierwszorzędowa

Białko Riesego zawiera od 179 (szpinak) do 215 (drożdże) reszt aminokwasowych. Jedynymi fragmentami konserwatywnymi tego białka są dwa regiony blisko C-końca o następującej sekwencji: C-T-H-L-G-C-V i C-P-C-H-G-S (Ryc. 1) [12]. Fragmenty te są bezpośrednio zaangażowane w koordynację żelazowo-siarkowej grupy prostetycznej, a podkreślone aminokwasy są ligandami centrum żelazowo-siarkowego. N-koniec, zawierający niepolarne reszty aminokwasowe, zaangażowany jest w zakotwiczenie białka w kompleks lub/i błonę (Ryc. 1 i 2) [12-13].

Sekwencje chloroplastowych i sinicowych białek Riesego wykazują obecność hydrofobowego fragmentu składającego się z 21 reszt aminokwasowych. Fragment ten zaczyna się od reszty siedemnastej, następnie występuje Lys lub Ser i drugi fragment hydrofobowy składający się z 16 reszt [12]. Analiza ta sugeruje występowanie jednej lub dwóch transbłonowych helis α . Położenie transbłonowych fragmentów w białku Riesego z kompleksów bc_1 jest inne. Dlatego, jeżeli porównuje się sekwencje białek Riesego z chloroplastów, mitochondriów i chromatoforów bakteryjnych nie można wykazać występowania konserwatywnych hydrofobowych fragmentów [12]. To sugeruje, że polipeptyd ten nie jest białkiem błonowym.

II-2. Izofomy

Białko Riesego pochodzące z błon tylakoidowych liści szpinaku występuje w dwóch izoformach o $pI = 5.4$ (nazwanej R_1) oraz $pI = 5.1$ (nazwanej R_2) [14]. Przyczyna różnicy w wartości pI izoform R_1 i R_2 pozostaje nieznana. W przypadku tytoniu, zidentyfi-

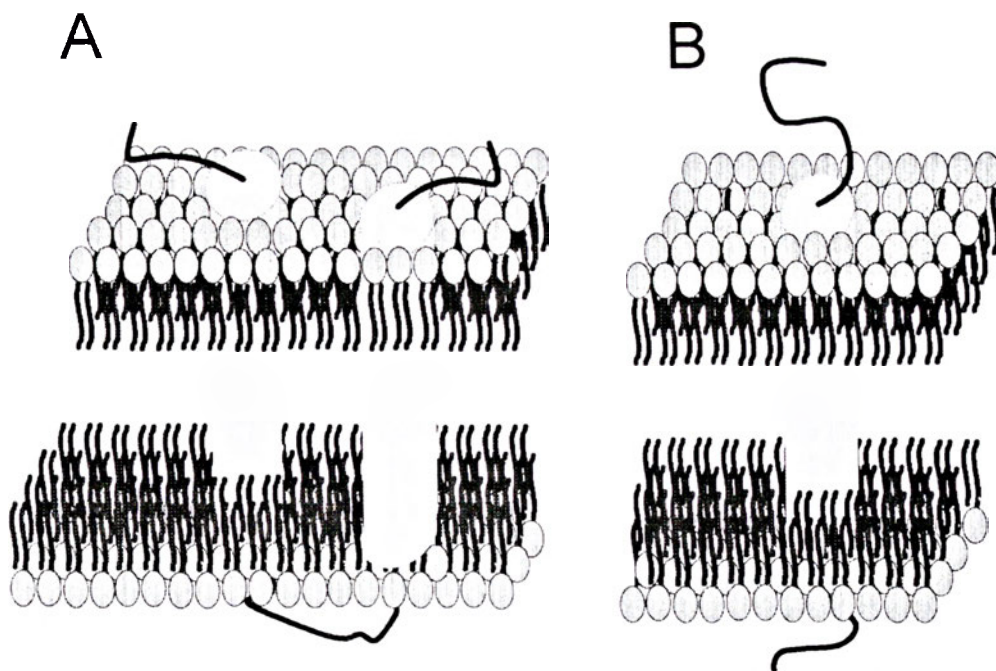


Ryc. 1. Hipotetyczny schemat struktury białka Riesego z wyszczególnioną grupą prostetyczną i konserwatywnymi sekwencjami aminokwasowymi biorącymi udział w koordynacji centrum $2Fe-2S$. Fragment w kształcie walca, blisko N-końca, symbolizuje segment polipeptydu oddziałujący z błoną; jasny obszar — część segmentu o właściwościach hydrofobowych, ciemny obszar — część segmentu o właściwościach hydrofilowych.

kowano dwa typy klonów cDNA nazwane TR3 i TR6 kodujące białko Riesego [15]. Porównanie sekwencji aminokwasowej, ustalonej na podstawie analizy sekwencji nukleotydów dwóch klonów cDNA wykazało, że polipeptydy różnią się jedynie czterema resztami aminokwasowymi. Na tej podstawie zasugerowano, że białko Riesego z chloroplastów tytoniu jest kodowane w genomie jądrowym przez dwa różne geny [15].

Nieznane jest fizjologiczne znaczenie występowania dwóch izoform polipeptydu. Interesujący jest jednak fakt, że kompleks cytochrom b_6f jak i bc_1 zostały wyizolowane w formie dimeru [16-17] i — jak sugerują autorzy pracy [14] — polimorfizm białka Riesego może mieć znaczenie we właściwym funkcjonowaniu kompleksu *in vivo*, co wyrażałoby się koniecznością udziału każdej z izoform w utworzonym dimerze.

Ryc. 2. Schematy struktury białka Rieskiego zakładające występowanie: A) dwóch lub B) jednej helisy transmembranowej.



II-3. Grupa prostetyczna

Grupą prostetyczną białka Rieskiego jest żelazowo-siarkowe centrum o charakterystycznym widmie EPR ($g = 1.90$) [18-20], charakteryzujące się bardzo wysokim potencjałem redoks (Tab. 1) o stałej wartości w zakresie pH od 6.5 do 8.0. Zależność potencjału od pH ukazuje się dopiero w niefizjologicznym, alkalicznym pH [21-22]. Tego typu centrum żelazowo-siarkowe po raz pierwszy zostało zidentyfikowane jako składnik mitochondrialnego kompleksu cytochrom bc_1 . Na bazie danych pochodzących z analizy widma EPR wywnioskowano, że jest to centrum typu 2Fe-2S (Ryc. 1) [23]. Składnik o podobnych właściwościach zidentyfikowano następnie w bakteriiach fotosyntetyzujących [21, 24-25] oraz w chloroplastach roślin wyższych [19]. We wszystkich badanych grupach bakterii fotosyntetyzujących: siarkowe bakterie purpurowe [26], niesiarkowe bakterie purpurowe [24] oraz bakterie zielone [21] wykazano występowanie charakterystycznego centrum 2Fe-2S dowodząc tym samym występowanie białka Rieskiego w tych organizmach. Bakterie purpurowe na ogół charakteryzuje wysoki potencjał redoks centrum 2Fe-2S wynoszący około +280 mV (Tab. 1). Jest to wartość zbliżona do

potencjałów redoks analogicznych składników błon mitochondrialnych i chloroplastowych. Jednak w przypadku innych bakterii fotosyntetyzujących centrum 2Fe-2S ma zredukowany potencjał redoks do wartości około +160 mV w pH = 7.0 (Tab. 1). Potencjał w tym przypadku jest pH zależny: 60 mV/jednostkę pH, co wskazuje na udział protonów w redukcji centrum reakcyjnego [21].

Zastosowanie technik spektroskopowych pozwoliło na wyjaśnienie zastanawiająco wysokiego potencjału redoks centrum 2Fe-2S białka Rieskiego. Badania wykazały, że ligandami centrum żelazowo-siarkowego są: dwie reszty Cys i dwie reszty His w rejonie C-końca (Ryc. 1) [27]. Występowanie dwóch atomów azotu jako ligandów tłumaczy bardzo wysoką wartość potencjału redoks. Dane te zostały również potwierdzone technikami biologii molekularnej [28].

III. Lokalizacja w błonie

Na podstawie analizy profilu hydrofobowości aminokwasów stwierdzono w białku Rieskiego z różnych organizmów obecność regionów o charakterze hydrofobowym. Jednakże, porównanie sekwencji aminokwasowej białka pochodzącego z mitochondriów,

Tabela 1.

Potencjał oksydo-redukcyjny centrum reakcyjnego białka Rieskiego

Organizm	E_m (mV)	pK	Piśmiennictwo
Drożdże	+280	—	[29]
Chloroplasty szpinaku	+290	—	[19]
<i>Chlorobium sp.</i>	+160 (pH 7.0)	> 6.5	[30]
<i>Heliobacillus mobilis</i>	+150	—	[31]
<i>Chromatium</i>	+285 (pH 8.0)	7.4	[24, 32]
<i>Rdp. spheroides</i>	+285 (pH 7.0)	8.0	[22]
<i>Rdp. capsulatus</i>	+310 (pH 7.0)	—	[33]
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	+160 (pH 7.0)	—	[34]

chloroplastów i chromatoforów bakteryjnych nie wykazało konserwatywności segmentów hydrofobowych. Spostrzeżenie to stało się źródłem sporów na temat struktury przestrzennej białka, a zwłaszcza występowania fragmentów transmembranowych. Zaproponowano dwie hipotetyczne struktury białka Rieskego:

1. Strukturę z dwiema transmembranowymi helisami α w obszarze N-końca w przypadku polipeptydu pochodzącego z mitochondriów wołu [35] i chloroplastów roślin wyższych [36];

2. Strukturę z jedną transmembranową helisą α w obszarze N-końca w przypadku białka Rieskego pochodzącego z chloroplastów liści szpinaku [37], mitochondriów *Neurospora crassa* [38] i sinic [39] (Ryc. 2).

Stosowanie jednak różnych metod szczegółowej analizy struktury białka Rieskego, nie potwierdziło istnienia transmembranowej helisy α w hydrofobowym N-końcowym obszarze cząsteczki [40]. Bez powodzenia okazały się również próby znakowania hydrofobowego polipeptydu, w wyniku których nie stwierdzono obecności znacznika związanego z podjednostką Rieskego. [41]. Niezbędnym stało się przeprowadzenie kolejnych badań nad właściwościami białka Rieskego, stosując metody biochemiczne. Stwierdzono, że w wyniku inkubacji błon mitochondrialnych w alkalicznym pH (100 mM CaCO_3) [42], białko Rieskego jest uwalniane do buforu. Na tej podstawie zasugerowano, że jest to białko peryferyjne bez obszarów transmembranowych (Ryc. 3) [40, 42, 43]. Badania wpływu wysokiego pH, czynników chao-

tropowych, detergentów i soli na związaną białka Rieskego z błoną tylakoidową roślin wyższych [44-45] i glonów [46] również dowodzą, że jest to białko peryferyjne. Te wyniki, eksperymenty z użyciem proteaz [45] oraz rekonstrukcja kompleksów b_6f [47] i bc_1 [40, 48] doprowadziły do następujących wniosków:

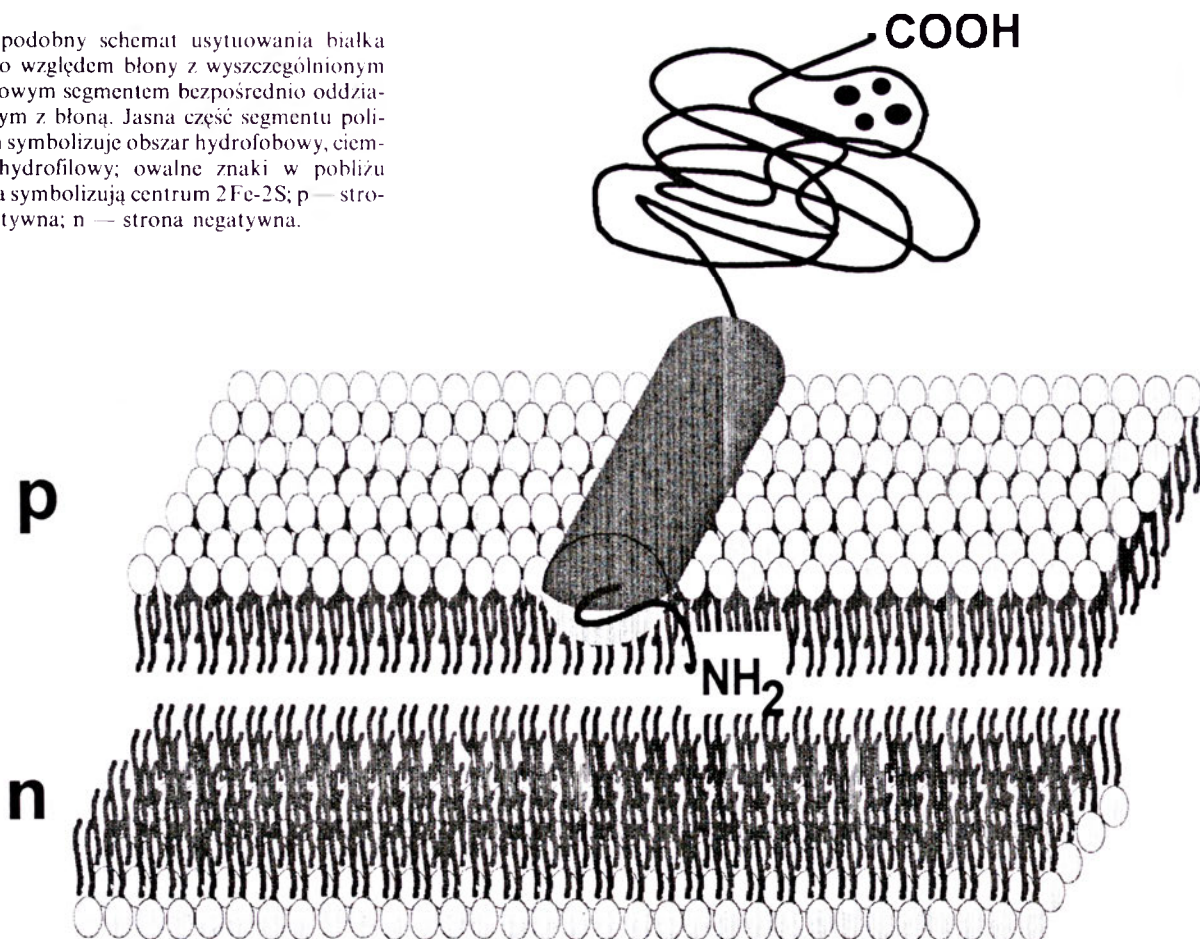
1. Białko Rieskego występuje peryferyjnie (znajduje się po stronie pozytywnej błony) (Ryc. 3) i jest hydrofobowo związane z kompleksem najprawdopodobniej za pośrednictwem cytochromu b (Ryc. 4) [40, 42-46];

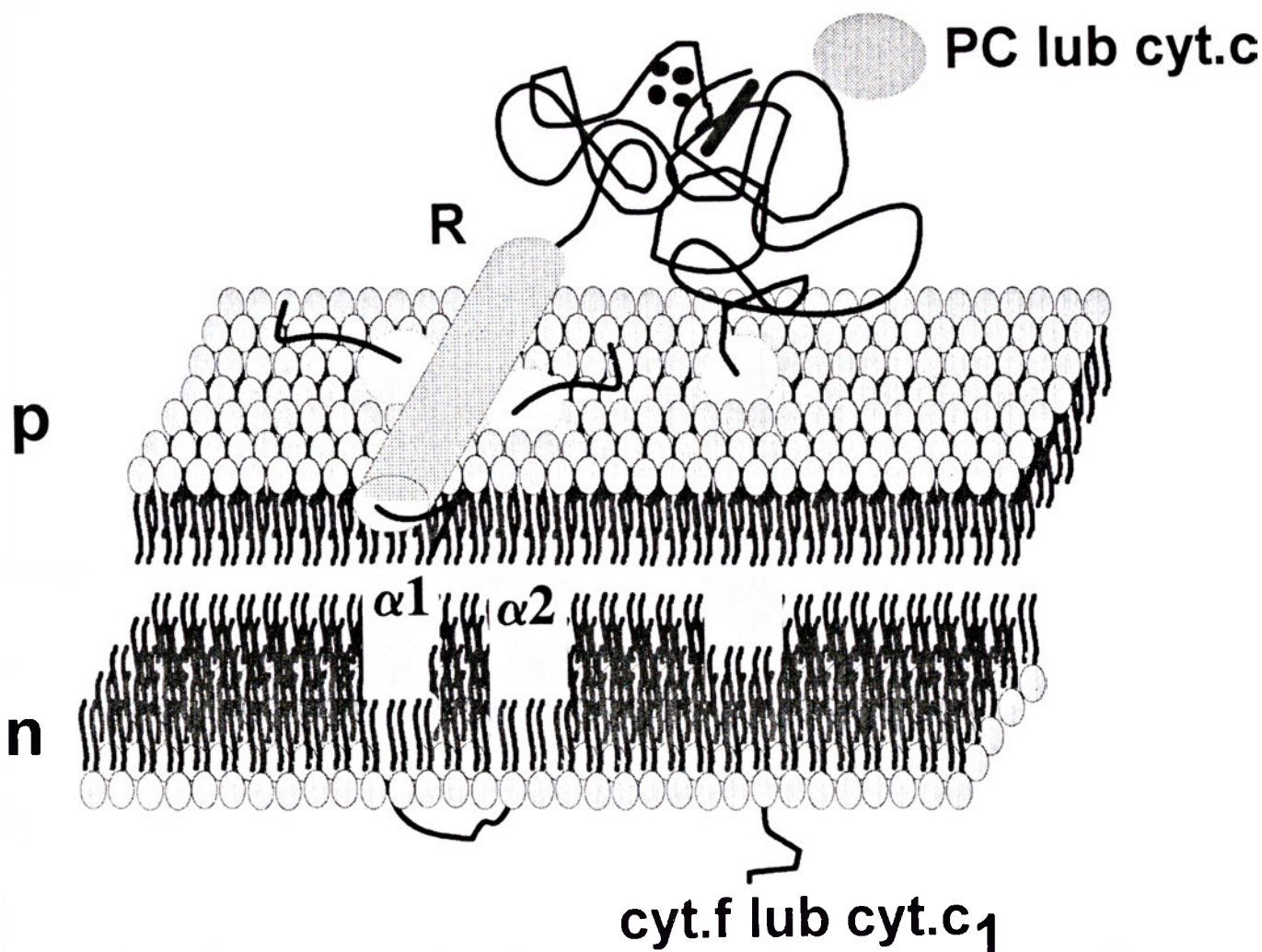
2. W wiązaniu tym bierze udział amfipatyczny fragment składający się z 20 reszt aminokwasowych blisko N-końca od Lys33 do Lys52 [40];

3. Białko Rieskego ulega łatwej, odwracalnej dysocjacji z wyizolowanego kompleksu bc_1 , a warunkiem ponownego zasocjowania podjednostki z kompleksem jest obecność fosfolipidów [48].

Kolejnym ciekawym spostrzeżeniem było stwierdzenie, że w obrębie nienaładowanego fragmentu N-końcowego białka Rieskego niektóre pozycje reszt hydrofobowych są konserwatywne. Próba ułożenia z jednowymiarowej sekwencji aminokwasowej trójwymiarowej helisy α wskazuje na układanie się hydrofobowych konserwatywnych reszt po jednej ze stron struktury α [49]. Sugerowałoby to — co pozostaje w zgodności z wnioskami wysuniętymi wcześniej — powierzchniowe oddziaływanie helisy α z hydrofobowymi częściami pozostałych składników kompleksu, ewentualnie powierzchniowe oddziaływanie z błoną lipidową.

Ryc. 3. Prawdopodobny schemat usytuowania białka Rieskego względem błony z wyszczególnionym N-końcowym segmentem bezpośrednio oddziaływującym z błoną. Jasna część segmentu polipeptydu symbolizuje obszar hydrofobowy, ciemna — hydrofilowy; owalne znaki w pobliżu C-końca symbolizują centrum 2Fe-2S; p — strona pozytywna; n — strona negatywna.





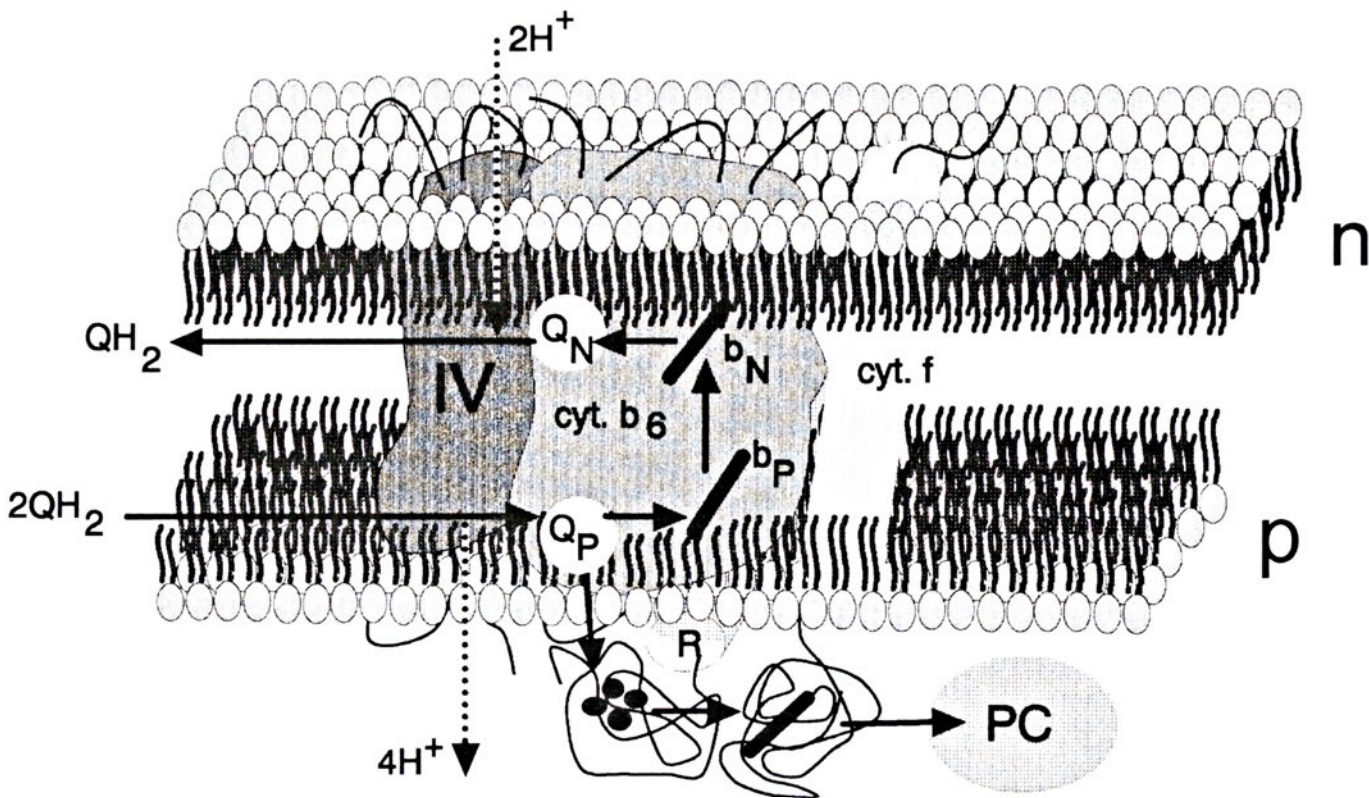
Ryc. 4. Schemat lokalizacji głównych podjednostek w obrębie homologicznych kompleksów cytochromowych: bc_1 i b_6f . PC — plastocyjanina (akceptor elektronów z kompleksu b_6f); cyt. c — cytochrom c (akceptor elektronów z kompleksu bc_1); R — białko Rieskego z centrum reakcyjnym 2Fe-2S; cyt. f — cytochrom f (składnik kompleksu b_6f); cyt. c_1 — cytochrom c_1 (składnik kompleksu bc_1); $\alpha 1$ i $\alpha 2$ — helisy α cytochromu typu b bezpośrednio oddziaływujące z białkiem Rieskego; p — strona pozytywna; n — strona negatywna; owalne znaki w obrębie białka Rieskego symbolizują centrum 2Fe-2S; ukośny, pogrubiony odcinek symbolizuje ugrupowanie hemowe.

W świetle danych eksperymentalnych białko Rieskego jawi się jako peryferyjna podjednostka kompleksów cytochrom bc_1 i b_6f , zasocjowana z powierzchnią błony lub pozostałymi składnikami kompleksu oddziaływaniami hydrofobowymi (Ryc. 4).

IV. Funkcja

Kompleksy cytochromowe bc_1 i b_6f wykazują oksydoreduktazową aktywność. Cytochrom bc_1 pełni funkcję oksydoreduktazy ubichinon — cytochrom c, a kompleks b_6f funkcjonuje jako oksydoreduktaza plastochinon — plastocyjanina. Kompleksy te są zaangażowane w elektrogeniczny transport protonów w poprzek błony lipidowej. W przypadku kompleksu bc_1 błon mitochondrialnych i chromatoforów bakterii fotosyntetyzujących translokacja protonów odbywa się przy zachowaniu stosunku $H^+/e = 2$. Przeniesienie dwóch protonów w poprzek błony towarzyszące przepływowi jednego elektronu wzdłuż dwuwarstwy wyjaśnia mechanizm zwany cyklem Q [50]. Mniej danych przemawiających za takim mechanizmem transportu

dostarczają badania nad chloroplastowym kompleksem b_6f , w którym stosunek H^+/e *in vivo* jest zmienny i waha się od wartości 1 do 2. Wskazuje to na inny — niż cykl Q — mechanizm transportu elektronów przez ten kompleks. Pomimo pewnych kontrowersji dotyczących mechanizmu elektrogenicznej translokacji protonów w kompleksie bc_1 i b_6f , dane eksperymentalne wskazują, że miejsce wiązania chinolu (Q_p) znajduje się w pobliżu centrum żelazowo-siarkowego białka Rieskego i cytochromu b. Centrum to jest następnie donorem elektronu dla cytochromu c_1 . Zostało to potwierdzone badaniami zmian potencjałów redoks cyt. b i cyt. c_1 , jak i wpływem inhibitorów (antymycyna i UHDBT) na zmiany potencjału centrum reakcyjnego białka Rieskego, co wykazały pomiary widm EPR [25]. Takie położenie centrum reakcyjnego białka Rieskego — blisko miejsca wiążącego chinon Q_p i w sąsiedztwie cyt. b — udowodniono również w przypadku kompleksu b_6f (Ryc. 5). Wskazują na to wyniki eksperymentów znakowania kompleksu analogami inhibitorów utleniających chinol i pochodnych azydowych chinonu [51, 52] oraz oddziały-



Ryc. 5. Schemat drogi transportu elektronu i translokacji protonów w kompleksie b_6f z uwzględnieniem prawdopodobnej lokalizacji białka Rieskego względem pozostałych podjednostek kompleksu. PC — plastocyjanina; cyt. f — cytochrom f; cyt. b_6 — cytochrom b_6 ; R — białko Rieskego; IV — podjednostka czwarta; b_N — hem cytochromu b_6 usytuowany w pobliżu strony negatywnej; b_P — hem cytochromu b_6 usytuowany w pobliżu strony pozytywnej; Q_N — miejsce wiązania chinonu; Q_P — miejsce wiązania chinolu; owalne znaki w obrębie białka Rieskego symbolizują centrum $2Fe-2S$; ukośne, pogrubione odcinki symbolizują ugrupowania hemowe; strzałki → wskazują drogę transportu elektronu; strzałki \cdots → wskazują drogę translokacji protonów; n — strona negatywna; p — strona pozytywna.

wanie dwubromotymochinonu (inhibitora przyłączającego się do miejsca Q_P) z hemem b_P i białkiem Rieskego [53]. Zgodnie z faktami przytoczonymi powyżej, w chloroplastach funkcja centrum $2Fe-2S$ polegałaby na przenoszeniu elektronu pomiędzy plastochoinolem a cyt. f. Dodatkowym argumentem było stwierdzenie braku sygnału w widmie EPR pochodzącego od centrum reakcyjnego białka Rieskego z mutanta *Lemna perpusilla*, charakteryzującego się upośledzonym transportem elektronów pomiędzy plastochoinolem a cyt. f [54].

Analiza wyników doświadczeń pozwala na stwierdzenie, że białko Rieskego jest pośrednim donorem elektronów dla cyt. c lub plastocyjaniny w wieloskładnikowych kompleksach cytochromowych: bc_1 i b_6f , odpowiednio.

V. Biosynteza

V-1. Struktura genu

a) Prokaryota

Badania genomu *Rhodospseudomonas viridis* wykazały, że geny: *fbc F*, *fbc B* i *fbc C* kodujące odpowiednio: białko Rieskego, cyt. b i cyt. c_1 , następują kolejno po sobie, posiadają identyczną orientację transkrypcyjną oraz, że cały zespół genów zawiera przypuszczalnie tylko jedno miejsce wiązania rybosomu [55].

Wskazuje to na strukturę pojedynczego operonu. Istotnie, dla *Rhodospseudomonas capsulatus* udowodniono, że mRNA jest pojedynczym policistronowym transkryptem [55].

Występowanie pojedynczego operonu *fbc* stwierdzono również w genomach *Rhodospseudomonas sphaeroides* [56], *Rhodospirillum rubrum* [57] i *Paracoccus denitrificans* [58]. W przypadku *Bradyrhizobium japonicum* organizacja genów kompleksu bc_1 jest odmienna niż u innych organizmów bakteryjnych. Trzy podjednostki polipeptydowe cytochromu bc_1 kodowane są jedynie przez dwa geny oznaczone: *fbc F* i *fbc H*. Pierwszy gen koduje białko homologiczne do polipeptydu Rieskego, natomiast produkt drugiego jest potranslacyjnie rozcinany na dwa polipeptydy — homologi cyt. b i cyt. c_1 [59].

Sinice (*Nostoc*, *Synechococcus*) u których analogiem bakteryjnego kompleksu cyt. bc_1 jest cyt. b_6f wykazują inną, bardziej skomplikowaną organizację genów kompleksu. Geny podjednostek białkowych zorganizowane są w dwóch operonach: *pet CA* i *pet BD*. Pierwszy z nich zawiera geny kodujące białko Rieskego i cyt. f, drugi natomiast cyt. b_6 i podjednostkę IV [39, 60, 61].

b) Eukaryota

W wyniku szeregu przeprowadzonych badań wykazano, że gen tak chloroplastowego jak i mitochondrialnego białka Rieskego jest pochodzenia jądrowego,

Tabela 2.

Wielkość presekwenji białek Rieskego

Typ kompleksu	Organizm	Wielkość presekwenji (ilość reszt aminokw.)	Piśmiennictwo
bc ₁	drożdże	30	[69]
	serce wołu	73 lub 78	[70-71]
	człowiek	78	[72]
b ₆ f	<i>Chl. reinhardtii</i>	29	[63]
	bulwy ziemniaka	53	[73]
	tytoń	49	[15]
	szpinak	66 lub 68	[15, 66]
	groch	50	[66]

a translacja mRNA polipeptydu przebiega w cytoplazmie [62].

U organizmów eukariotycznych sama budowa genu białka Rieskego wykazuje bardziej skomplikowaną budowę niż u *Prokaryota*. W obrębie genu pojawiają się nukleotydowe sekwencje intronowe. Już u niższego eukariota *Chlamydomonas reinhardtii*, gen ten zawiera 4 introny [63]. Różne organizmy eukariotyczne posiadają odmienną ilość kopii genu polipeptydu Rieskego, przykładowo: ssaki (mysz, szczur) [64] i grzyby [65] posiadają tylko jedną kopię genu białka Rieskego w każdej komórce, podobnie groch [66] i szpinak [67], jednak kukurydza i tytoń posiadają w genomie całą rodzinę genów kodujących białko Rieskego [65]. Ponadto każdy eukariotyczny gen białka Rieskego koduje sekwencję liderową.

V-2. Transport białka do organelli i wbudowanie w kompleks

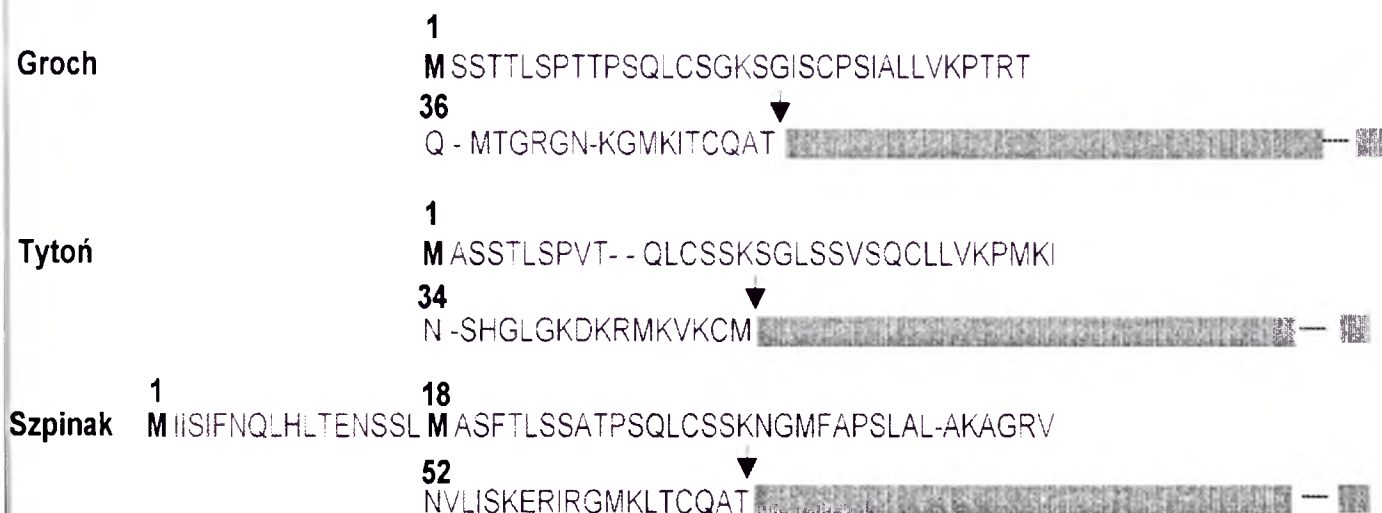
a) Charakterystyka presekwenji

W komórkach eukariotycznych produkt translacji zostaje przeniesiony do odpowiednich organelli. Umożliwiają to odpowiednie sekwencje aminokwasowe (presekwenje) ulokowane na N-końcu białka, w których zakodowana jest informacja o transporcie. Presekwenje białek chloroplastowych i mitochondrialnych

mają wiele wspólnych cech: są hydrofilowe, bogate w reszty hydroksylowe (Ser, Thr) i mają wypadkowy ładunek dodatni. W presekwenjach białek mitochondrialnych, stwierdzono dodatkowo występowanie amfifilowej helisy α , podczas gdy presekwenje chloroplastowe mają zazwyczaj postać statystycznego kłębka [66, 68]. Presekwenje te, zwane sekwencjami liderowymi lub sygnałnymi, a także sekwencjami tranzytowymi, są po spełnieniu swej funkcji proteolitycznie odcinane. Wielkość presekwenji białek Rieskego pochodzących z różnych organizmów waha się od 30 do 78 reszt aminokwasowych (Tab. 2.).

Presekwenje takie różnią się znacznie, lecz można zauważyć ich pokrewieństwo. Przykładem są sekwencje DNA zlokalizowanych w jądrze genów białek Rieskego z chloroplastów grochu, tytoniu i szpinaku oraz opracowane na ich podstawie sekwencje aminokwasowe tej podjednostki wraz z sekwencją liderową. Po porównaniu wszystkich trzech sekwencji [66] (nukleotydowych i aminokwasowych) można zauważyć, że:

1. Presekwenja białka Rieskego ze szpinaku zawiera w obrębie N-końca 17 reszt aminokwasowych nieobecnych w sekwencjach sygnałowych tytoniu i grochu;
2. W przypadku polipeptydu Rieskego pochodzącego ze szpinaku presekwenja zawiera w pozycji 18



Ryc. 6. Porównanie sekwencji aminokwasowych w obrębie sekwencji liderowych białek Rieskego z: grochu, tytoniu oraz szpinaku. Szare wstęgi symbolizują dojrzałe białko; strzałki wskazują miejsce cięcia pomiędzy presekwencją a dojrzałym białkiem.

metioninę, która odpowiada kodonowi „start translacji” w sekwencjach grochu i tytoniu;

3. Brak homologii między sekwencjami nukleotydowymi grochu i szpinaku w regionie „upstream” od kodonu „start” dla grochu;

4. W kierunku „downstream” od powyższego kodonu występuje duży stopień podobieństwa sekwencji (46-55%) (Ryc. 6).

Różnicę w długościach presekwenji białka Rieskego pochodzącego z: grochu, tytoniu i szpinaku można zatem wytłumaczyć delecją fragmentu DNA, która spowodowała utratę części tej presekwenji w toku procesu ewolucyjnego.

b) Ukierunkowany transport do organelli

Znaczące różnice w długości sekwencji liderowych białek Rieskego pochodzących z różnych organizmów oraz różnice w ilościach cięć proteolitycznych prowadzących do powstania dojrzałego białka wbudowanego prawidłowo w odpowiedni kompleks nasuwają pytanie: czy wyłącznie odcinana sekwencja odpowiedzialna jest za import białka Rieskego do organelli? Coraz częściej uważa się, że sekwencje liderowe niezbędne są w przypadku białek nieposiadających odpowiednich hydrofobowych odcinków na końcach sekwencji białkowej koniecznych do przeniesienia naładowanej cząstki przez dwuwarstwę lipidową. Białka błonowe z założenia posiadają takie odcinki i nie wymagają osobnych sekwencji liderowych by prawidłowo wbudować się w błonę. Potwierdzeniem tej hipotezy jest eksperyment w którym błonowe apobiałko chlorofilowe a/b nawet po fuzji ze skierowującą go do stromy sekwencją liderową pochodzącą z małej podjednostki karboksyoksygenazy rybulozodwufosforanowej nadal prawidłowo było wbudowywane do błony tylakoidowej [74]. Dane te sugerują zatem, że informacja o wbudowaniu polipeptydu w błonę zawarta jest w dojrzałym białku, a konieczność występowania sekwencji liderowej jest związana z przeniesieniem białka przez pierwszą barierę hydrofobową jaką jest otoczka (*envelope*) organellum. Proces ten jest jednoetapowy, bowiem transport odbywa się w obszarze styku obu błon otoczki [75]. Prawdopodobny model wyglądałby zatem następująco: ukierunkowany transport do stromy chloroplastu lub matriks mitochondrialnej, następnie odcięcie niepotrzebnej już sekwencji liderowej i wreszcie wbudowanie w błonę tylakoidową lub wewnętrzną błonę mitochondrialną przy pomocy sekwencji hydrofobowych zawartych w dojrzałym białku. Wiele faktów wskazuje, że tak właśnie przebiega import białka Rieskego do odpowiednich organelli.

Ważnym narzędziem badań jest wspomniana wyżej fuzja sekwencji liderowych jednych białek z innymi białkami i badani losów tak powstałych hybryd. Przeprowadzono szereg tego typu eksperymentów z białkiem Rieskego, które wykazały, że sekwencja liderowa istotnie gra rolę w imporcie białka do organellum i jest proteolitycznie odcinana w stromie lub w matriks, natomiast informacja o wbudowywaniu do

błony znajduje się w części dojrzałego produktu (pozbawionego odpowiedniej presekwenji) [76, 77]. Udowodniono, że informacja ta zawarta jest w N-końcowym fragmencie białka Rieskego (pierwsze 55 reszt aminokwasowych) [76, 77].

c) Proteolityczna obróbka prekursora białka Rieskego

Po wprowadzeniu do organellum prekursora białka Rieskego następuje proteolityczne odcięcie sekwencji liderowej. W różnych organizmach proces ten przebiega różnie. Wykazano, że np. w matriks mitochondrialnej niższych *Eukaryota* (*Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* [73, 78] i inne grzyby [69, 79] proces cięcia jest dwuetapowy, przy czym drugie cięcie zachodzi już po umieszczeniu białka Rieskego w kompleksie bc_1 . Natomiast w organizmach wyższych proces ten wydaje się być jednoetapowy (np. w mitochondriach szczura czy wołu [71, 78] lub w mitochondriach z bulw ziemniaka [73]). Zaskakujący fakt odkryty w mitochondriach z serca wołu, gdzie jeden ze składników kompleksu bc_1 — podjednostka IX — okazała się być sekwencją liderową białka Rieskego, która po odcięciu pozostaje w kompleksie [71].

d) Dołączanie grupy prostetycznej do apobiałka

Nadal nieznanym pozostaje mechanizm i czas (*timing*) wbudowywania centrum reakcyjnego 2Fe-2S do apobiałka. W mitochondriach stwierdzono, iż brak cytochromu b obniża wydajność transportu innych białek i dodatkowo wykazują one brak grup prostetycznych oraz nie wbudowują się stabilnie w błonę [80]. Ekspresjonowane w *E. coli* białko Rieskego pozbawione N-końcowego, hydrofobowego fragmentu również nie posiadało centrum żelazowo-siarkowego [49], co doprowadziło do sugestii, że wbudowywanie grupy prostetycznej zachodzi dopiero po asocjacji białka z błoną lub/i kompleksem.

e) Rola białka Rieskego w tworzeniu funkcjonalnych kompleksów b_6f oraz bc_1

Badania nad mutantem *Lemna perpusilla* charakteryzującego się brakiem białka Rieskego, wykazały nieobecność pozostałych podjednostek polipeptydowych kompleksu b_6f [81]. Wykazano również, że w roślinach etiolowanych (groch) zawartość mRNA podjednostki Rieskego jest znikoma i raptownie zwiększa się podczas procesu zielenienia rośliny. Natomiast transkrypty pozostałych składników chloroplastowego kompleksu b_6f obecne są w organellum w stosunkowo dużych ilościach przez cały czas, a różnica w ilościach przed i po naświetleniu jest niewielka [82]. Te oraz inne obserwacje doprowadziły do sformułowania hipotezy według której polipeptyd Rieskego miałby odgrywać kluczową rolę w tworzeniu kompleksu b_6f . Byłby zatem niezbędny do prawidłowego połączenia się wszystkich podjednostek kompleksu, regulując tym samym proces tworzenia się funkcjonalnego kompleksu [82]. Jednakże kolejne badania nad mutantami *L. perpusilla* wykazały, że nie można stwierdzić obecności kompleksu, w którym brakowałoby któregośkol-

wiek ze składników, a pojawienie się polipeptydu Rieskego warunkuje raczej stabilne wbudowanie kompleksu w błonę [83]. Obserwacje te doprowadziły do sugestii, że proces powstawania i stabilizacji kompleksu byłby procesem zachodzącym wg schematu: „wszystko albo nic” w którym wymagana jest obecność wszystkich składników w odpowiednim czasie i miejscu, by mogła zajść prawidłowa asocjacja i wbudowanie w błonę [83]. Hipoteza „białka kluczowego” coraz częściej jest zarzucana.

W przypadku kompleksu bc_1 uważa się, że jedynie polipeptyd Rieskego nie wywiera efektu na włączanie się pozostałych składników w kompleks [84]. Przyjmuje się, że białko Rieskego jest włączane do kompleksu jako ostatnie [78,85], a obróbka prekursora do formy dojrzalej w drożdżowym i ssaczym cytochromie bc_1 ma miejsce po wbudowaniu do kompleksu [71, 78].

Dodatkowo, tworzenie funkcjonalnego kompleksu wymaga nie tylko obecności polipeptydów lecz także grup prostetycznych cytochromów oraz centrum 2Fe-2S białka Rieskego [82].

f) Białka towarzyszące polipeptydowi Rieskego

Zarówno w matriks mitochondrialnej jak i w stromie chloroplastowej białko Rieskego towarzyszą różne białka opiekuńcze. W chloroplastach jest to, jak w przypadku większości białek tego organellum, Cpn60 (chaperonin 60 kDa). Nie wiadomo jednak czy białko Rieskego wiąże się z Cpn60 dopiero w formie dojrzalej, czy w takiej, w której zawiera jeszcze presekwencję [84]. Drugim chloroplastowym białkiem opiekuńczym jest Hsp70 (białko szoku cieplnego 70 kDa). Badanie jego oddziaływania na LHCII wskazuje, że działa ono jako swoisty regulator wbudowywania białek w błonę. Utrzymując białka w stanie częściowo rozfałdowanym sprawia, że są one niezdolne do ulokowania się w miejscu przeznaczenia [86]. Zaskakująca jest kolejność działania powyższych czynników towarzyszących na białko Rieskego. Otóż wyniki badań wskazują, że białko oddziałuje najpierw z Cpn60, a dopiero potem z Hsp70, czyli w odwrotnej kolejności niż np. reduktaza ferredoksyna-NADP [87], czy białka mitochondrialne [88]. Być może w grę wchodzi dwa różne stromalne homologi Hsp70 o masach 75 i 78 kDa [89] działające na różnych etapach transportu białka Rieskego do tylakoidów?

W matriks mitochondrialnej występuje białko chaperonowe Hsp60 (będące analogiem GroEL u *Escherichia coli*), funkcję pomocniczą spełnia kochaperonin Hsp10 (analog GroES z *E. coli*). Oba białka konieczne są do prawidłowego fałdowania i wbudowywania białek w kompartmenty matriks, ponadto są również zaangażowane w prawidłowe skierowywanie różnych białek przechodzących przez matriks mitochondrialną w drodze do przestrzeni międzybłonowej [90].

Produkt genu drożdżowego BCS1 pełni prawdopodobnie także funkcję białka chaperonowego. Mutacja w tym genie powoduje brak białka Rieskego w mitochondrium [63]. Dodanie do mutantów plazmidu

zawierającego gen białka Rieskego powoduje pojawienie się dużej ilości tego białka w mitochondriach, lecz aktywność enzymatyczna kompleksu bc_1 nie zostaje przywrócona. Dane te sugerują, że produkt genu BCS1 pełni funkcję chaperonową, zwłaszcza, że 200 aminokwasowy odcinek sekwencji tego genu wykazuje homologię do sekwencji innych chaperonów.

VI. Podsumowanie

W przeciwieństwie do stosunkowo dobrze poznanej struktury oraz lokalizacji cytochromów typu: b i c kompleksów: bc_1 i b_6f , dane dotyczące podjednostki Rieskego są kontrowersyjne. Ostatnio jednak badania nad białkiem Rieskego poczyniły duże postępy i dostarczyły nowych informacji odnośnie lokalizacji, struktury, oddziaływania z podjednostkami kompleksu oraz funkcji w kompleksie. W świetle najnowszych danych białko Rieskego wydaje się być podjednostką peryferyjną oddziaływującą z kompleksem (najprawdopodobniej przez cyt. b) hydrofobowym fragmentem usytuowanym w pobliżu N-końca. Badania nad funkcją podjednostki Rieskego w kompleksie wskazały na charakter pośredniego donora elektronów dla cyt. c lub plastocyaniny w kompleksach: bc_1 i b_6f , odpowiednio. Nadal jednak pozostaje nieznany mechanizm przyłączania grupy prostetycznej do apobiałka oraz mechanizm włączania podjednostki do kompleksu. Również rola białka Rieskego w tworzeniu funkcjonalnego kompleksu, biorąc pod uwagę dane dotyczące badań nad tą podjednostką w kompleksie bc_1 i b_6f , nie jest jasna. Pytania te nadal czekają na wyjaśnienie.

Artykuł otrzymano 2 lutego 1996 r.

Zaakceptowano do druku 8 grudnia 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Rieske JS, Hansen RF, Zaugg WS (1964) *J Biol Chem* **239**: 3017-3022
2. Rieske JS, Zaugg WS, Hansen RF (1964) *J Biol Chem* **239**: 3023-3030
3. Hatefi Y, Haavik AG, Griffiths DE (1962) *J Biol Chem* **237**: 1681-1685
4. Rieske JS (1976) *Biochim Biophys Acta* **456**: 195-247
5. Trumppower B (1990) *Microbiol Rev* **54**: 101-129
6. Knaff DB (1993) *Photosynth Res* **35**: 117-133
7. Gennis RB, Barquera B, Hacker B, Van Doren SR, Arnaud S, Crofts AR, Davidson E, Gray KA, Daldal F (1993) *J Biomembr Bioenerg* **25**: 195-209
8. Hurt E, Hauska G (1981) *Eur J Biochem* **117**: 591-599
9. Malkin R (1992) *Photosynth Res* **33**: 121-136
10. Willey DL, Gray JC (1988) *Photosynth Res* **17**: 125-144
11. Cramer WA, Black MT, Widger WR, Girvin ME (1987) W: Barber J (red) *The Light Reaction*. Elsevier, Amsterdam, str 447-493
12. Widger WR, Cramer WA (1991) W: Bogorad L, Vasil IK (red) *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants* t 7B. Academic Press, Inc, London, str 149-176
13. Cramer WA, Furbacher PN, Szczepaniak A, Tae G-S (1991) W: Lee CP (red) *Current Topics in Bioenergetics* t 16. Academic Press, Orlando, str 179-222

14. Yu S-G, Romanowska E, Xue Z, Albertsson P-A (1994) *Biochim Biophys Acta* **1185**: 239-242
15. Madueño F, Napier JA, Cejudo FJ, Gray JC (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 289-299
16. Huang D, Everly RM, Cheng RH, Heymann B, Schagger H, Sled V, Ohnishi T, Baker TS, Cramer WA (1994) *Biochem* **33**: 4401-4409
17. Nałęcz MJ, Bolli R, Azzi A (1985) *Arch Biochem Biophys* **236**: 619-628
18. Hurt E, Hauska G, Malkin R (1981) *FEBS Lett* **149**: 211-216
19. Malkin R, Aparicio PJ (1975) *Biochem Biophys Res Comm* **63**: 1157-1160
20. Prince RC, Crowder MS, Bearden AJ (1980) *Biochim Biophys Acta* **592**: 323-337
21. Knaff DB, Malkin R (1976) *Biochim Biophys Acta* **430**: 244-252
22. Prince RC, Dutton PL (1976) *FEBS Lett* **65**: 117-119
23. Rieske JS, MacLennan DH, Coleman R (1965) *Biochem Biophys Res Comm* **15**: 338-344
24. Evans MCW, Lord AV, Reeves SG (1974) *Biochem J* **138**: 177-183
25. Bowyer JR, Dutton PL, Prince RC, Crofts AR (1980) *Biochim Biophys Acta* **592**: 445-460
26. Ingledew WJ, Prince RC (1977) *Arch Biochem Biophys* **178**: 303-307
27. Britt RD, Sauer K, Klein MP, Knaff DB, Kriauciunas A, Yu C-A, Yu L, Malkin R (1991) *Biochem* **30**: 1892-1901
28. Davidson E, Ohnishi T, Atta-Asafo-Adjei E, Daldal F (1992) *Biochem* **31**: 3342-3351
29. Telser J, Hoffman BM, LoBrutto R, Ohnishi T, Tsai A-L, Simpkin D, Palmer G (1987) *FEBS Lett* **214**: 117-121
30. Knaff DB, Malkin R (1973) *Arch Biochem Biophys* **159**: 555-562
31. Zirngibl S, Xie D-L, Riedel A, Nitschke W, Nelson H, Nelson N, Liebl U, LeCoutre J, Hauska G, Kellner E, Grodzitzki D, Büttner M (1992) *Res Photosynth* **2**: 471-478
32. Malkin R, Bearden AJ (1978) *Biochim Biophys Acta* **505**: 147-181
33. Prince RC, Leigh JS, Dutton PL (1974) *Biochem Soc Trans* **2**: 950-953
34. Carrithers R, Yoch DC, Arnon DI (1977) *J Biol Chem* **252**: 7461-7467
35. Schagger H, Borchart U, Macheldt W, Link TA, Jagow G (1987) *FEBS Lett* **219**: 161-168
36. Willey DL, Gray JC (1988) *Photosynth Res* **17**: 125-144
37. Steppuhn J, Rother C, Hermans J, Jansen T, Salnikow J, Hauska G, Herrmann RG (1987) *Mol Gen Genet* **210**: 171-177
38. Harnisch U, Weiss H, Sebald W (1985) *Eur J Biochem* **149**: 95-99
39. Kallas T, Spiller S, Malkin R (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5794-5798
40. Gonzalez-Halphen D, Vazquez-Accvedo M, Garcia-Ponce B (1991) *J Biol Chem* **266**: 3870-3876
41. Gonzalez-Halphen D, Lindorfer MA, Capaldi RA (1988) *Biochem* **27**: 7021-7031
42. Hartl FU, Schmidt E, Wachtert E, Weiss H, Neupert W (1986) *Cell* **47**: 939-951
43. Hartl FU, Pfanner N, Nicolson DW, Neupert W (1988) *Biochim Biophys Acta* **988**: 1-45
44. Szczepaniak A, Huang D, Keen TW, Cramer WA (1991) *EMBO J* **10**: 2757-2764
45. Szczepaniak A, Frank K, Rybka J (1995) *Z Naturforsch* **50c**: 535-542
46. Breyton C, De Vitry C, Popot L-J (1994) *J Biol Chem* **269**: 7597-7602
47. Adam Z, Malkin R (1987) *FEBS Lett* **225**: 67-71
48. Shimomura Y, Nishikimi M, Ozawa T (1984) *J Biol Chem* **259**: 14059-14063
49. Van Doren SR, Yun C-H, Crofts AR, Gennis RB (1993) *Biochem* **32**: 628-636
50. Mitchel P (1976) *J Theor Biol* **62**: 327-367
51. Oettmeier W, Masson K, Soll H-J, Hurt E, Hauska G (1982) *FEBS Lett* **144**: 313-317
52. Oettmeier W, Masson K, Olschewski E (1983) *FEBS Lett* **155**: 241-244
53. Nitschke W, Hauska G (1987) *Biochim Biophys Acta* **892**: 314-319
54. Malkin R, Posner HB (1978) *Biochim Biophys Acta* **501**: 552-554
55. Verbist J, Lang F, Gabellini N, Oesterheld D (1989) *Mol Gen Genet* **219**: 445-452
56. Yun CH, Beci R, Crofts AR, Kaplan S, Gennis RB (1990) *Eur J Biochem* **194**: 399-411
57. Shanker S, Moomaw C, Güner S, Hsu J, Tokito MK, Daldal F, Knaff DB, Harman JG (1992) *Photosynth Res* **32**: 79-94
58. Kurowski B, Ludwig B (1987) *J Biol Chem* **263**: 13805-13811
59. Thony-Meyer LD, Stax D, Hennecke H (1989) *Cell* **57**: 683-697
60. Kallas T, Spiller S, Malkin R (1988) *J Biol Chem* **263**: 14334-14342
61. Widger WR (1991) *Photosynth Res* **30**: 71-84
62. Hauska G (1986) W: Stachelin LA, Arntzen CJ (red) *Encyclopedia of Plant Physiology* t 19. Springer Verlag, Berlin str 496-507
63. De Vitry C (1994) *J Biol Chem* **269**: 7603-7609
64. Nishikimi M, Hosokawa Y, Toda H, Suzuki H, Ozawa T (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 19-25
65. Huang J, Struck F, Matzinger DF, Levings CS (1994) *Plant Cell* **6**: 439-448
66. Salter AH, Newman BJ, Napier JA, Gray JC (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 569-574
67. Tittgen J, Hermans J, Steppuhn J, Jansen T, Jansson C, Andersson B, Nechushtai R, Nelson N, Herrmann RG (1986) *Mol Gen Genet* **204**: 258-265
68. Bassham DC, Creighton AM, Arretz M, Brunner M, Robinson C (1994) *Eur J Biochem* **221**: 523-528
69. Ramabadran RS, Beattie DS (1992) *Arch Biochem Biophys* **296**: 279-285
70. Usui S, Yu L, Yu CA (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **167**: 575-579
71. Brandt U, Yu L, Yu CA, Trumpower BL (1993) *J Biol Chem* **268**: 8387-8390
72. Nishikimi M, Hosokawa Y, Toda H, Suzuki H, Ozawa T (1990) *Biochem Int* **20**: 155-160
73. Emmermann M, Clericus M, Braun HP, Mozo T, Heins L, Kruff V, Schmitz UK (1994) *Plant Mol Biol* **25**: 271-281
74. Lmappa GK (1988) *J Biol Chem* **263**: 14996-14999
75. Bruce BD, Keegstra K (1994) *Advances in Molecular and Cell Biology* t. 10. JAI Press Inc, str 389-430
76. Madueño F, Bradsha SA, Gray JC (1994) *J Biol Chem* **269**: 17458-17463
77. Bartling D, Clausmeyer S, Oelmüller R, Herrmann RG (1990) *Bot Mag Tokyo* **2**: 119-144
78. Graham LA, Brandt U, Sargent JS, Trumpower BL (1993) *J Bioenerg and Biomem* **25**: 245-257
79. Fu W, Japa S, Beattie DS (1990) *J Biol Chem* **265**: 16541-16547
80. Bruce BD, Malkin R (1991) *The Plant Cell* **3**: 203-212
81. Lam E, Malkin R (1985) *Biochim Biophys Acta* **810**: 106-109
82. Willey DL, Gray JC (1988) *Photosynth Res* **17**: 125-144
83. Bruce BD, Malkin R (1991) *The Plant Cell* **3**: 203-212
84. Madueño F, Napier JA, Gray JC (1993) *The Plant Cell* **5**: 1865-1876
85. Davidson E, Ohnishi T, Tokito M, Daldal F (1992) *Biochem* **31**: 3351-3358
86. Yalowski S, Paulsen H, Michaeli D, Chitnis PR, Nechushtai R (1992) *Proc. Natl Acad Sci USA* **89**: 5616-5619
87. Tsugaki R, Nishimura M (1993) *FEBS Lett* **320**: 198-202
88. Mannig-Krieg UC, Scherer PE, Schatz G (1991) *EMBO J* **10**: 3273-3280
89. Marshall JS, DeRoche AE, Keegstra K, Vierling E (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 374-378
90. Hohfeld J, Hartl FU (1994) *J Cell Biol* **126**: 305-315

Inhibitor białka C: jego właściwości, funkcje i znaczenie w układzie równowagi hemostatycznej

Protein C Inhibitor: its properties, functions and significance in haemostatis

IWONA FIJAŁKOWSKA*

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Właściwości fizykochemiczne PCI
- III. Organizacja genu kodującego PCI
- IV. Wiązanie się inhibitora z aktywnym białkiem C
- V. Oddziaływania PCI z innymi enzymami
- VI. Kliniczne znaczenie PCI

Wykaz stosowanych skrótów: ACT — antychymotrypsyna; AP — antyplazmina; APC — aktywne białko C; AT — antytrypsyna; AT III — antytrombina; CI — inhibitor esterazy; DFP/DIPF/ — dwuizopropylodifluorofosforan; Gp — glikoproteina; KK — kallikreina; M — makroglobulina; PAI — inhibitory aktywatorów plazminogenu; PC — fosfatydylocholina; PCI — inhibitor białka C; PS — fosfatydyloseryna; PSA — specyficzny antygen prostaty; tPA — tkankowy aktywator plazminogenu; uPA — moczowy aktywator plazminogenu.

I. Wprowadzenie

Aktywne białko C /APC/ odgrywa dość istotną rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrylizacji. Inaktywuje czynniki Va i VIIIa zapobiegając powstawaniu aktywnego czynnika X (Xa), a co za tym idzie, tworzeniu się trombin. Oprócz reakcji blokujących kaskadę prowadzącą do powstania skrzepu, poprzez wiązanie inhibitorów aktywatorów plazminogenu: pierwszego (PAI-1) i trzeciego (PAI-3), aktywne białko C wspomaga reakcję powstawania plazminy i trawienia skrzepu [1]. Ponieważ obniżona aktywność antykoagulacyjna lub niedobór białka C mogą być przyczynami choroby zakrzepowo-zatorowej niejednokrotnie prowadzącej do śmierci, enzym ten określany jest mianem regulatora równowagi hemostatycznej (Ryc. 1).

Ów regulator hemostazy sam także podlega regulacji. Enzymy biorące udział w procesach krzepnięcia i fibrylizacji aktywują się wzajemnie tworząc samowzmacniającą się kaskadę, a swoistą kontrolę nad tym procesem sprawują inhibitory proteaz serynowych,

Contents:

- I. Introduction
- II. Physical and chemical properties of PCI
- III. Organization of the PCI gene
- IV. Binding of inhibitor with active Protein C
- V. Interactions of PCI with other enzymes
- VI. Clinical significance of PCI

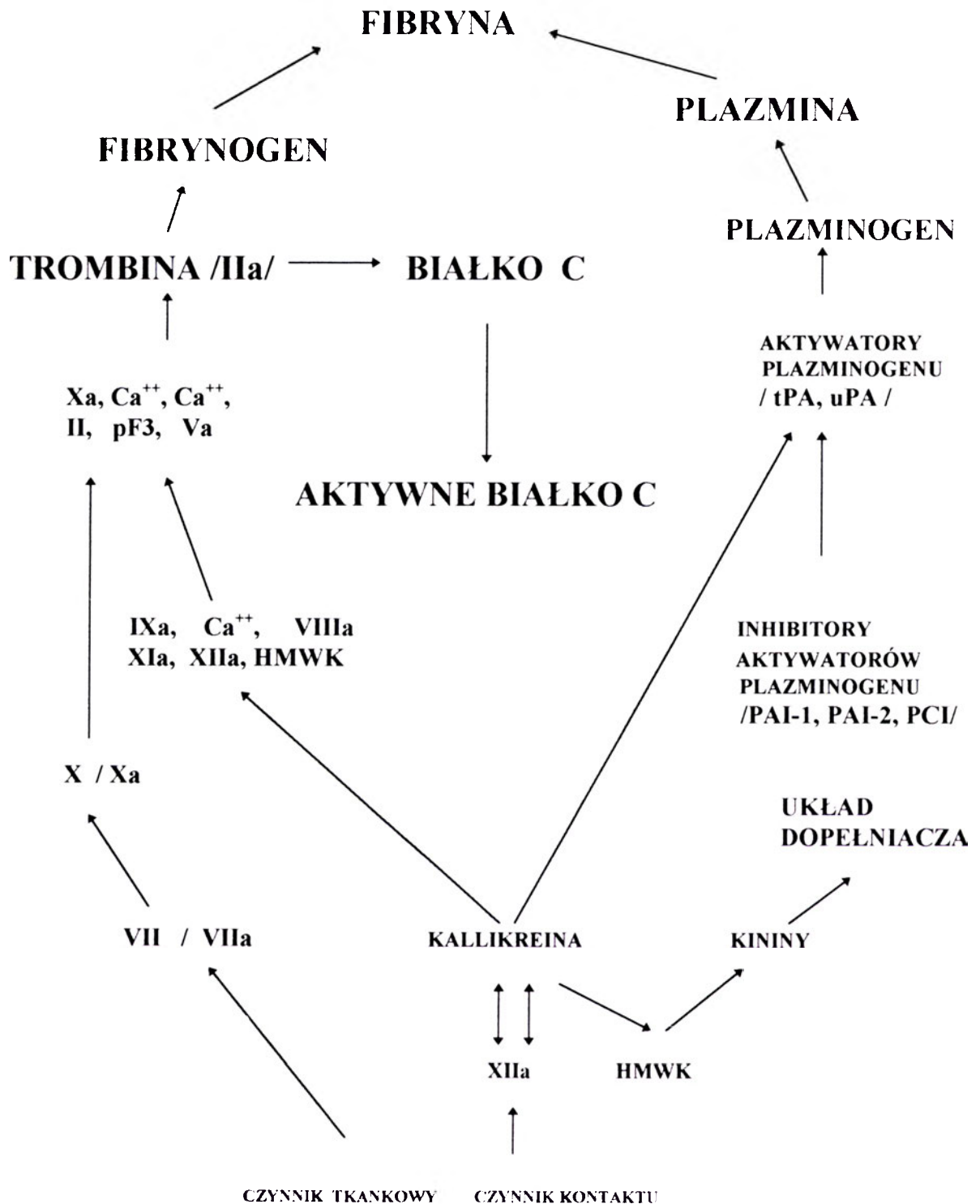
nazywane skrótowo serpinami (*SERine Protease INhibitors*). Więcej informacji o serpinach znaleźć można w pracach przeglądowych [2-5], tutaj przypomnijmy tylko, że do tej grupy inhibitorów należą takie białka jak: antytrombina III (AT III), która hamuje nie tylko trombinę, ale i czynniki IXa i XIa, α_2 AP (antyplazmina), α_2 M (makroglobulina), α_1 AT (antytrypsyna), kofaktor II heparyny, inhibitory aktywatorów plazminogenu 1 i 2 (PAI-1, PAI-2), i ponad 30 innych [6, 7].

Pierwsze sygnały o obecności w osoczu czynnika kontrolującego aktywne białko C pochodzą z 1980 r. [8]. Próby jego wyizolowania i scharakteryzowania początkowo kończyły się niepowodzeniem: w 1982 r. oczyszczono białko, które uważano za PCI, a które w 1985 r. zidentyfikowano jako β_2 Gp (glikoproteinę) [9, 10]. Dopiero trzy lata po odkryciu obecności inhibitora białka C w krwi dokładnie opisano jego cząsteczkę [11]. W 1986 r. wyizolowano z moczu i zidentyfikowano nieznany dotąd, heparyno-zależny inhibitor o masie 50000, tzw. moczowy inhibitor urokinazy [12, 13]. W badaniach *in vitro* przy braku heparyny w mieszaninie inkubacyjnej z taką samą szybkością unieczynnia on urokinazę jak i białko C, w obecności heparyny natomiast aktywność jego wobec białka C znacznie wzrasta. Immunologicznie różni się od innych serpin, włącznie z AT III i PAI-1, ale jest identyczny z osoczym inhibitorem białka C. Później okazało się, że jest on identyczny także z PAI-3 [14]. Można zatem sądzić, że określenia „moczowy inhibitor urokinazy”, „PAI-3” i „osoczy inhibitor białka C” dotyczą jednej substancji.

II. Właściwości fizykochemiczne PCI

Ludzki inhibitor białka C jest jednolącuchową

*Adiunkt, Pracownia Biologii Molekularnej, Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, 93-232 Łódź, ul. Lodo-wa 106



Ryc. 1. Schemat ilustrujący kaskadę procesów krzepnięcia (po lewej stronie) oraz łańcuch reakcji fibrynolitycznych (po prawej stronie). Czynniki tkankowy lub czynnik kontaktu dają początek reakcjom, które prowadzą do powstania trombiny. Trombina ma zdolność przekształcania fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrinę, która jest „rusztowaniem” skrzepu. Nadmiar trombiny wychwytywany jest przez białko błonowe komórek śródbłonnka: trombomodulinę. Trombina traci wtedy aktywność wobec fibrynogenu, a aktywuje białko C, które z kolei nabiera zdolność trawienia niezbędnych kofaktorów krzepnięcia: czynników Va i VIIIa ograniczając tworzenie trombiny, a zatem ma własności antykoagulacyjne. Aktywne białko C wiązane jest przez inhibitor białka C, cząsteczkę z grupy inhibitorów aktywatorów plazminogenu. Białka te wiążąc lub uwalniając aktywatory plazminogenu regulują przekształcanie plazminogenu w aktywną plazminę, która rozpuszcza skrzep. Białko C wykazuje właściwości profibrynolityczne w ten sposób, że wiążąc się z inhibitorem, ułatwia działanie aktywatorom plazminogenu.

glikoproteiną. Wyizolowany z osocza, oczyszczony, wędruje w żelu poliakrylamidowym w postaci pojedynczego prążka o masie 57000, zarówno w warunkach redukujących jak i nieredukujących [15]. Ciężar cząsteczkowy PCI obliczony na podstawie sekwencji tripletów kodujących poszczególne aminokwasy wy-

nosi 43759, co oznacza, że pozostałe 13200 masy cząsteczkowej stanowią węglowodany. Podczas immunoelektroforezy białko to migruje z frakcją alfa jeden-alfa dwa globulin. Punkt izoelektryczny mieści się w przedziale 4.5-6.0, co wskazuje na pewną niejednorodność białka. Współczynnik absorpcji wynosi

E₂₈₀^{1%} 14.1. Przy dłuższym przechowywaniu białko tworzy dimery o masie 118000-115000 łatwo wykrywalne metodą elektroforezy w warunkach nieredukujących [16, 15, 11, 17]. Stężenie PCI w osoczu oznaczane metodą ELISA wynosi od 3.3 mikrogramów/ml do 6.8 mikrogramów/ml [18].

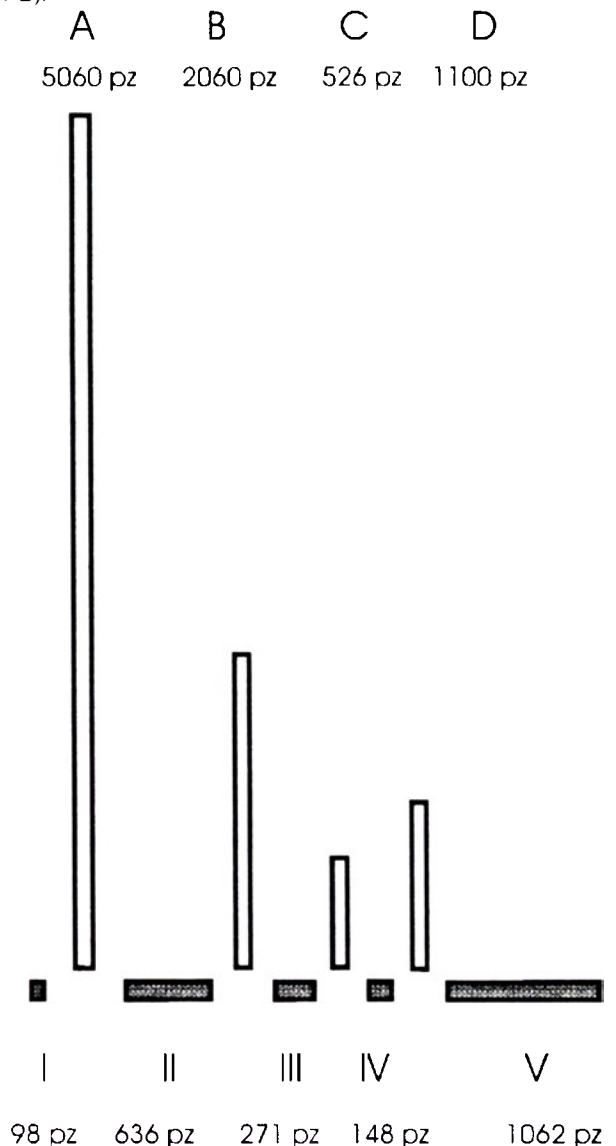
U osób zdrowych fizjologiczna zawartość antygeny PCI może wahać się w granicach 56%-162% (98.6 ± 23.1) [19, 15]. Aktywność PCI oznacza się na podstawie ilości inhibitora potrzebnej do zahamowania aktywności amidolitycznej białka C. (Przypomnijmy, że aktywność amidolityczna jest to zdolność enzymów do rozkładania *in vitro* różnych substratów chromogennych do końcowego produktu barwnego mającego maximum pochłaniania przy długości fali 405 nm). Jednostką aktywności jest zatem ilość inhibitora jaka wiąże aktywne białko C obecne w 1 ml osocza. Wyznaczona w ten sposób aktywność specyficzna oczyszczonego PCI wynosiła 220U/mg-225U/mg [14, 15]. Wyizolowany inhibitor zachowuje zdolność wiązania białka C przez około 4 tygodnie, o ile przechowywany jest w temperaturze 4°C [7]. Badania, w których oczyszczone białko znakowane radioizotopem jodu ¹²⁵I podawano królikom pokazały, że półokres jego trwania w organizmie tych zwierząt wynosi 23.4 godziny.

III. Organizacja genu kodującego PCI

Strukturę i rozmiar mRNA kodującego PCI określono na podstawie analiz cDNA wyizolowanego z komórek wątrobowych linii lambda gt 11. Ilości ponad 2100 par zasad odpowiada dojrzała cząsteczka PCI o długości 387 aminokwasów z peptydem sygnałowym długości 19 aminokwasów [20].

Gen kodujący PCI wyizolowano z trzech niezależnie infekowanych fagów, które zawierały nakładające się wstawki kodujące cały gen. Izolowany genomowy DNA mapowano i sekwencjonowano. Wykazano, że składa się on z 11500 par zasad począwszy od przypuszczalnego miejsca rozpoczęcia transkrypcji do regionu poliadenylowego i obejmuje pięć eksonów: I-IV, i cztery introny A-D [21]. W pierwszym eksonie, który ma długość 98 par zasad znajduje się przypuszczalne miejsce inicjacji transkrypcji i region 5'-nieprzetłaczalny. W wielu dobrze poznanych genach, w sąsiedztwie miejsca inicjacji transkrypcji obecne są charakterystyczne sekwencje: TATA czy CCAAT. W genie kodującym PCI takich obszarów nie znaleziono, napotkano jednak sekwencję, która w pewnych genach indukowanych estrami forbolu czy cAMP wiąże czynniki transkrypcyjne. Przez analogię zatem — a także na podstawie obserwacji, że w większości genów eukariotycznych dwunukleotydy CA powtarza się jako miejsce startu transkrypcji — przyjęto, że w genie PCI miejscem startu transkrypcji jest adenina (A) i dlatego przypisano jej pozycję 1. Ekson drugi (II) o długości 636 par zasad koduje początkową metioninę, peptyd

sygnałowy i część N-terminalną białka, tj. aminokwasy od His1 do Lys187. Eksony trzeci (III) o długości 271 par zasad i czwarty (IV) o długości 148 par zasad kodują odpowiednio regiony Ala188-Arg278 i Arg278-Glu327 dojrzałego białka. Nie ma zgody jaki triplet koduje aminokwas w pozycji 316: czy jest to CGC (Arg) czy GGC (Gly) [21, 22]. Największy ekson: piąty (V), ma długość 1061 par zasad, i obejmuje obszar Met328-Pro387 białka wraz z jego centrum aktywnym Arg354-Ser355, kodon stop oraz 879 par zasad regionu 3'-niekodującego. Eksony I i II oddzielone są od siebie intronem A, największym w genie, zawierającym 5600 par zasad. Intron B pomiędzy eksonami II i III ma długość 2060 par zasad, intron C jest krótszy: ma 526 par zasad. Intron D zawiera 1100 par zasad, z czego około 600 par obejmuje sekwencje statlitarnie typu 3. Zauważono, że na wszystkich granicach ekson-intron pary GT i AG występują częściej niż w innych rejonach (Ryc. 2).



Ryc. 2. Diagram ilustrujący proporcje pomiędzy poszczególnymi intronami i eksonami w genie kodującym cząsteczkę inhibitora białka C. Pionowe słupki oznaczone literami A, B, C, D symbolizują introny, cyfry rzymskie I-V odnoszą się do poziomych, zaciemnionych prostokątów i oznaczają eksony. Pod każdym symbolem umieszczono informację o ilości par zasad tworzących daną strukturę.

Badania hybryd komórkowych ludzko-chemicznych zawierających gen kodujący cząsteczkę inhibitora białka C wykazały, że jest on ulokowany na chromosomie 14. Na tym samym chromosomie w pozycjach 14q31-32.3 znajdują się geny dla alfa jeden AT i alfa jeden ACT. Strukturalnie geny te są bardzo podobne, np. mają takie same ilości intronów i eksonów. Intryny B, C i D zajmują te same pozycje w sekwencji białka. Wykazują też duży stopień homologii: 42.3% homologii z alfa jeden antychymotrypsyną (α_1 ACT), 41.6% — z alfa jeden antytrypsyną (α_1 -AT), 27.9% — z antytrombiną (ATIII), 26.9% homologii z owoalbuminą [21, 13]. Geny innych białek z rodziny serpin mają więcej intronów. Różnice między nimi przypisuje się insercjom lub delecjom podczas ewolucji [23].

Badania przeprowadzone w Japonii wykazały, że w populacji przebadanych 377 osobników znaleziono 2 fenotypy PCI: PCI 1 — występujący z częstością 0.988 oraz PCI 2 — z częstością 0.012. Napotkano nawet rodzinę, gdzie obecne były oba allele kodominujące PCI 1 i PCI 2 [24].

IV. Wiązanie się inhibitora z aktywnym białkiem C

Podczas inkubacji aktywnego białka C (MW 67 000) z inhibitorem (MW 57 000) powstaje kompleks enzym-substrat w stosunku stechiometrycznym 1:1. Reakcji tej towarzyszy utrata przez białko C aktywności amidolitycznej w sposób zależny od czasu i stężenia [15]. Szybkość hamowania aktywnego enzymu przez PCI wynosi $7.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i wzrasta znacznie w obecności heparyny (5 IU/ml). Gdy mieszaninę inkubacyjną rozdziela się elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym z SDS, kompleks inhibitor-enzym widoczny jest w postaci prążka o masie MW 102000. W warunkach redukujących w żelu widoczne są następujące prążki: kompleks inhibitor-enzym MW 88 000, niezwiązany enzym MW 62 000 i dodatkowy prążek MW 54 000, który za pomocą technik autoradiograficznych i immunologicznych zidentyfikowano jako zdegradowany, niezwiązany z enzymem inhibitor. Dokładniejsze analizy pokazują, że podczas tworzenia się kompleksu następuje proteoliza PCI [17]. Jak ustalono, podczas reakcji PCI z enzymem wiązanie peptydowe w obszarze reaktywnym Arg354-Ser355 w cząsteczce inhibitora hydrolizowane jest przez enzym, wskutek czego odłączany jest 33-aminokwasowy odcinek od strony C cząsteczki. Identyczna degradacja proteolityczna inhibitora ma miejsce podczas jego reakcji z trombiną, czynnikiem Xa, urokinazą i kallikreina. Trypsyna i chymotrypsyna, choć nie są specyficznymi substratami inhibitora, także modyfikują go do postaci MW 54 000. Podobnie na kompleksy inhibitora z enzymem o masie MW 102000 działają czynniki nukleofilowe: 1M amoniak pH 11.0 czy 1M hydroksylamina pH 8.0 powodują dysocjację kom-

pleksu na enzym i zdegradowany inhibitor o masie 5400. Nieaktywowane białko C czy aktywne białko lecz z zablokowaną przez DFP domeną katalityczną nie powodują proteolizy inhibitora [25, 26, 17]. Również nieaktywny jest inhibitor pochodzący z długo przechowywanego osocza. Cząsteczka taka nadtrawiona enzymami obecnymi w osoczu dodatkowo pozbawiona jest 3, 6 lub 12 aminokwasów od strony N. Prawdopodobnie owo dodatkowe trawienie następuje w miejscach Arg357-Leu358 oraz Arg362-Leu363. Takie różnice mas cząsteczkowych są zapewne przyczyną heterogenności mającej odbicie w nieostrym punkcie izoelektrycznym [27].

Reakcję wiązania się inhibitora z białkiem C przyspiesza heparyna. Wcześniej sądzono, że główny obszar PCI wiążący heparynę to — podobnie jak w innych serpinach — odcinek kilkunastu konserwatywnych, zasadowych aminokwasów zwany helisą D, mogący związać 8-10 naładowanych ujemnie reszt cukrowych heparyny. Tymczasem nowsze badania wykazały, że w cząsteczce inhibitora są aż trzy takie regiony: His1-Arg11, Lys82-Arg90 i Lys266-Arg278, a wiązanie heparyny odbywa się podług innego schematu. Zastosowanie technik modelowania biologicznego pozwoliło na skonstruowanie hipotezy o przebiegu oddziaływania PCI z substratami [28]. Sugeruje się, że wskutek przemieszczenia się pierwszych 15 N-końcowych aminokwasów (obszar ten zwany jest helisą A⁺), w sąsiedztwo odcinka Ser264-Arg278 (tzw. helisy H), tworzy się duży, naładowany dodatnio obszar wiążący heparynę [29]. Z heparyną oddziałuje także aktywne białko C, prawdopodobnie za pośrednictwem aminokwasów Lys37, Lys38 i Lys39 w taki sposób, że dochodzi do ich bliskiego sąsiedztwa z Arg278 inhibitora. Innymi słowy, heparyna gra rolę mostka łączącego inhibitor z enzymem neutralizując ich dodatkowo naładowane obszary i w ten sposób przyspieszając reakcję [30-32, 28, 33, 29]. Nawiasem mówiąc, PCI jest jedynym inhibitorem serpinowym, który hamuje białko C przy udziale heparyny. Wspomniane zmiany konformacyjne zachodzące podczas oddziaływań z heparyną powodują, że pętla reaktywna inhibitora szybciej staje się dostępna dla reakcji proteolizy ze strony enzymu. Jak pokazały badania za pomocą NMR, pętla reaktywna inhibitora utworzona przez aminokwasy: Thr352-Phe353-Arg354-Ser355-Arg357 odpowiada za specyficzność i rozpoznawanie proteazy przez inhibitor. W serpinach, w odróżnieniu od innych inhibitorów jest ona dość ruchliwa. Po przyłączeniu się heparyny do cząsteczki, pętla przyjmuje konformację pozwalającą na wsunięcie się w szczelinę centrum katalitycznego enzymu. Podczas reakcji, wiązanie peptydowe Arg354-Ser355 inhibitora jest atakowane nukleofilowo przez Ser z centrum aktywnego proteazy, wskutek czego odłączany zostaje 33-aminokwasowy odcinek od strony C cząsteczki inhibitora i tworzy się niezwykle stabilny związek przejściowy. Przemieszczenie się poszczególnych ele-

mentów struktury trzeciorzędowej w obszarze pętli reaktywnej po reakcji PCI z substratem polega na tym, że N-końcowa część pętli powstała po rozcięciu proteazą wsuwa się w środek sąsiadującej, rozległej struktury beta-sheet. Powstała forma jest rozluźniona, bardziej uporządkowana i termostabilna. Przemieszczenie to jest nieodwracalne, stąd zdegradowany inhibitor staje się całkowicie nieaktywny [6, 2, 3, 34] (Ryc. 3).

Badania *in vivo* przeprowadzone na zwierzętach znacznie wzbogaciły wiedzę na temat PCI. Wyniki tych eksperymentów pokazały, że okres półtrwania znakowanego radioizotopem wolnego inhibitora, podanego królikom dożylnie, wynosił 23.4 godziny.



Ryc. 3. Sekwencja aminokwasowa cząsteczki PCI wyznaczona na podstawie sekwencji DNA. Strzałką (↓) zaznaczono miejsce trawione przez proteazę, podkreślenia wskazują aminokwasy związane z węglowodanami, gwiazdkami (****) zaznaczono obszar pętli reaktywnej.

Okres półtrwania podawanych zwierzętom kompleksów: aktywne białko C-inhibitor (APC-PCI), wyznaczony na podstawie szybkości ich usuwania z krwioobiegu, wynosił 19.6 ± 0.3 minut. [27].

Tempo wiązania się inhibitora z enzymem badano po podaniu pawianom znakowanego, aktywnego białka C. Największe stężenie tworzących się w organizmie kompleksów: 1.4 ± 0.3 $\mu\text{g/ml}$ zaobserwowano po upływie 1 godziny od wstrzyknięcia dawki APC: 0.25 mg/kg masy ciała. Okres półtrwania tych kompleksów wynosił 40 min. Po podaniu pięciokrotnie większej dawki aktywnego enzymu zawartość kompleksów osiągała poziom zaledwie 2.5 $\mu\text{g/ml}$, po czym szybko malała. Jednocześnie zwiększała się ilość kompleksów APC z innym inhibitorem, alfa jeden AT. Gdy zwierzętom wstrzykiwano nieaktywne białko C, PCI nie wchodził z nim w reakcję [18]. Inny ciekawy eksperyment przeprowadzono na szympanсах. Podawano im dożylnie określoną dawkę związków uruchamiających system białka C: mieszaninę aktywnego czynnika X (Xa) i pęcherzyków z fosfatydylocholino (PC) i fosfatydyloseryny (PS). Po 2 minutach jakie upłynęły od iniekcji, ilość zymogenu białka C zmniejszyła się o 60% przy niezmienionej zawartości antygenu. Jednocześnie obserwowano gwałtowny, 50%-70%, spadek aktywności substratów białka C tj. czynników VIIIa i Va przy niskiej dawce (24.5 pM Xa-37.7 nM PC/PS), a prawie 100% spadek aktywności przy wysokiej (36.6 pM Xa-56.3 nM PC/PS) dawce aktywującej. Oznaczało to tworzenie się aktywnego białka C/APC/. Pierwsze kompleksy APC z inhibitorem /APC-PCI/ pojawiały się w układzie krążenia już w 5 min., a maksymalną zawartość osiągnęły w 30-tej min. od iniekcji. Po tym czasie ilość kompleksów zmniejszała się szybko i systematycznie. Wyszło wniosek, że prawdopodobnie wskutek wysycenia PCI rolę jego przejmuje alfa jeden AT [34]. Wykazano, że kompleksy APC-PCI usuwane są z krążenia 5-krotnie szybciej niż kompleksy białka C z alfa jeden AT, a także szybciej niż sam inhibitor. Zdegradowany proteolitycznie, nieaktywny inhibitor usuwany jest z krwiobiegu wolniej niż kompleksy APC-PCI [16]. Uważa się, że szybszy klirens kompleksów jest ściśle związany z katabolizmem jakiego podlegają. Panuje pogląd, że kompleksy proteaz z serpinami usuwane są drogą receptorową i że jest to wspólny receptor w błonie hepatocytów. Różne tempo usuwania różnych kompleksów można tłumaczyć tym, że rozpoznawana jest głównie ich część serpinowa [36, 37].

Jak wcześniej wspomniano, tempo hamowania enzymu przez PCI znacznie wzrasta w obecności heparyny. Dodanie 5-10 IU/ml heparyny do mieszaniny reakcyjnej pięciokrotnie podwyższa wartość drugorzędowej stałej szybkości reakcji hamowania aktywnego białka C przez inhibitor. Podobnie dzieje się w przypadku reakcji z trombiną i czynnikiem Xa. [17]. Niektórzy badacze dowodzą, że bez udziału heparyny reakcja wiązania się inhibitora z białkiem C wcale nie

zachodzi, nawet przy 12-krotnym nadmiarze molar-
nym PCI [26]. Zauważono, że polisaccharany chondro-
ityny bardziej niż heparyna przyspieszają tworzenie się
kompleksów; być może decydują o tym ciężar cząstecz-
kowy i zawartość reszt siarczanowych [28, 38].

Z przedstawionych powyżej danych wynika, że PCI
jest preferowanym, szybko działającym inhibitorem
aktywnego białka C.

V. Oddziaływania PCI z innymi enzymami

Jak wspomniano, po wysyceniu się inhibitora nad-
miar aktywnego enzymu wiązany jest i unieczynniany
przez alfa jeden AT i alfa dwa M [32, 39]. Z drugiej
strony, jeśli inhibitor białka C jest w nadmiarze
w stosunku do ilości aktywnego białka C, może on
reagować także z innymi enzymami. Wykazano na
przykład, że zależne od heparyny powinowactwo in-
hibitora wobec urokinazy jest takie samo jak wobec
APC. Uważa się nawet, że urokinaza może współ-
zawodniczyć z białkiem C o wiązanie z inhibitorem.
[40-42]. Trombina oraz czynniki Xa i XIa także mogą
być wiązane i unieczynniane przez PCI, chociaż pod
względem ilościowym nie są to reakcje o dużym
znaczeniu fizjologicznym. Są doniesienia, że PCI unie-
czynnia urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA)
i tkankowy aktywator plazminogenu (tPA). W tych
przypadkach, jak wykazano w doświadczeniach z za-
stosowaniem przeciwciał monoklonalnych, cząsteczka
działając jako trzeci inhibitor aktywatorów plazmino-
geny (PAI-3) może mieć inną konformację, niż kiedy
występuje jako PCI [43].

Ciekawe, i także nie do końca wyjaśnione, jest
oddziaływanie PCI z kallikreiną (KK). Tworzą się
wtedy kompleksy w stosunku molarnym 1:1, w których
uczestniczy jedynie łańcuch lekki kallikreiny, podob-
nie jak ma to miejsce w jej reakcji z inhibitorem
esterazy (C1) czy ATIII. W odróżnieniu od wymienio-
nych wcześniej, reakcja ta jest niezależna, a nawet, jak
sądzą niektórzy, znoszona przez heparynę [35, 26, 44].
Owe kompleksy PCI z kallikreiną osoczową czy
moczową są stabilne i znoszą aktywność amidolitycz-
ną kallikreiny w sposób zależny od czasu, stężenia
i odwrotnie proporcjonalnie od temperatury, jeśli
reakcję prowadzono w chłodzie. Im wyższa była
temperatura inkubacji tym mniej tworzyło się kom-
pleksów KK-PCI, a tym więcej APC-PCI. Niewy-
kluczone, że to właśnie PCI jest owym tajemniczym,
niezidentyfikowanym dotąd białkiem wiążącym kal-
likreinę (KK *Binding Protein*) [45, 46].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, że duża
zawartość PCI, niemal 40-krotnie większą niż w oso-
czu znaleziono w ludzkim płynie nasiennym. Ponieważ
PCI nie tworzy tu kompleksów z APC sądzi się, że on
występuje w formie zdegradowanej MW 54000, albo
jako wielocząsteczkowy polimer. W pewnych stanach
patologicznych PCI tworzy kompleksy ze specyficznym
antygenem prostaty (PSA — *Prostate Specific*

Antigen). Za pomocą badań immunohistochemicznych
wykryto PCI także w jądrach, najądrzach i gruczole
krokovym. Eksperymenty, w których oznaczano
mRNA inhibitora białka C metodą Northern-blotting
pokazały, że inhibitor obecny w tych organach syntetyzowany jest w pęcherzykach nasiennych. Nie wiadomo na razie jaką rolę może odgrywać PCI w męskim układzie rozrodczym, jednak pewne dane wskazują, że białko to może uczestniczyć w procesach związanych z płodnością [47-49].

VI. Kliniczne znaczenie PCI

Wprawdzie udział PCI w kompleksowaniu enzy-
mów innych niż APC jest niewielki, rzędu 7%-11%
(odpowiednio KK i cz. XIa), to jednak dość szeroki
zasięg działania może nadawać mu znaczenie w całym
systemie hemostazy. Owa wielopłaszczyznowość jest
też poważnym utrudnieniem przy próbie oceny jego
znaczenia klinicznego. Panuje pogląd, że w schorze-
niach zakrzepowych wobec ciągłego pobudzenia sys-
temu fibrynolitycznego następuje zużycie PCI [50].
Jednak doniesienia na temat ilości i aktywności in-
hibitora w takich stanach patologicznych jak: złożony
niedobór czynników V/VIII, głęboka zakrzepica żylna,
czy niektóre schorzenia wątroby są sprzeczne [45, 51,
20, 52, 39, 8, 53]. Jedynie chorzy na ostrą niewydolność
wątroby mieli zawsze bardzo niski poziom PCI, co jest
zjawiskiem wtórnym, związanym z zahamowaniem
syntezy białek przez komórki wątrobowe [20]. Nad-
zwyczaj interesujące są wstępne wyniki badań dotyczą-
cych udziału inhibitora białka C w procesach regulują-
cych płodność. Prace nad tym problemem prowadzone
są bardzo intensywnie i być może już niedługo nasza
wiedza o inhibitorze białka C znajdzie szersze prak-
tyczne zastosowanie w leczeniu.

Artykuł otrzymano 19 stycznia 1996 r.

Zaakceptowano do druku 14 października 1996 r.

Prezentowana publikacja jest częściowo finansowana
z grantu nr 6 P203, KBN.

Piśmiennictwo

1. Fijałkowska I, Babińska A, Cierniewski C (1992) *Post Biochem* **38**: 178-183
2. Carrel RW, Evans D, Goldsmith L, Stein PE (1991) *Nature (Lond)* **353**: 576-578
3. Goldsmith EJ, Mottonen J (1994) *Current Biology* **2**: 241-244
4. Potempa J, Korzus E, Travis J (1994) *J Biol Chem* **269**: 15957-15960
5. Wei A, Rubin H, Cooperman BS, Christianson DW (1994) *Structural Biology* **1**: 251-257
6. Bourin M-C, Lindahl U (1993) *Biochem J* **289**: 313-330
7. Pratt CW, Macik BG, Church FC (1989) *Thromb Res* **53**: 595-602
8. Marlar RA, Griffin JH (1980) *J Clin Invest* **66**: 1186-1189
9. Canfield WM, Kiesel W (1982) *J Clin Invest* **70**: 1260-1271
10. Schoubse I (1985) *Blood* **66**: 1086-1091

11. Suzuki K, Nishioka J, Hashimoto S (1983) *J Biochem Chem* **258**: 163-168
12. Geiger M, Heeb MJ, Binder BR, Griffin JH (1988) *FASEB J* **2**: 2263-2267
13. Suzuki K, Deyashiki J, Nishioka J, Toma K (1989) *Thromb Haemost* **61**: 337-342
14. Heeb MJ, Espana F, Geiger M, Collen D, Strump DC, Griffin JH (1987) *J Biol Chem* **262**: 15813-15816
15. Radtke KP, Stief TW, Heimbürger N (1988) *Biol Chem* **369**: 965-974
16. Laurell M, Stenflo J, Carlson T (1990) *Blood* **76**: 2290-2295
17. Suzuki K, Nishioka J, Kusumoto H, Hashimoto S (1984) *J Biochem* **95**: 187-195
18. Espana F, Gruber A, Heeb MJ, Hanson R, Harker LA, Griffin JH (1991) *Blood* **8**: 1754-1760
19. Espana F, Griffin JH (1989) *Thromb Res* **55**: 671-682
20. Francis RB, Thomas W (1984) *Thromb Haemost* **52**: 71-74
21. Meijers JCM, Chung DW (1991) *J Biol Chem* **266**: 15028-15034
22. Meijers JCM, Chung D (1990) *Thromb Res* **59**: 389-393
23. Prochownik E, Boch SC, Orkin SH (1985) *J Biol Chem* **260**: 9608-9612
24. Yatsuda T, Nadamo D, Lida R, Tanaka Y, Nakanaga M, Kishi K (1992) *Human Genetics* **89**: 265-269
25. Laurell M, Stenflo J (1989) *Thromb Haemost* **62**: 885-891
26. Meijers JCM, Kanters DHJ, Vlooswijk RAA, van Erp HE, Hessing M, Bouma B (1988) *Biochem* **27**: 4231-4237
27. Laurell M, Carlson T, Stenflo J (1988) *Thromb Haemost* **60**: 334-339
28. Kuhn LA, Griffin JH, Fisher CL, Greengard JS, Bouma BN, Espana F, Tainer JA (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8506-8510
29. Shirk RA, Elisen MGLM, Meijers JCM, Church FC (1994) *J Biol Chem* **269**: 28690-28695
30. Casu B, Petiton H, Provascoli M, Sinaij P (1988) *Trends in Biochem Sci* **13**: 221-225
31. Cooper ST, Whinna HC, Jackson TP, Boyd JM, Church FC (1995) *Biochemistry* **34**: 12991-12997
32. Hoogendoorn H, Toh CH, Nesheim ME, Giles AR (1991) *Blood* **78**: 2283-2290
33. Pratt CW, Church FC (1992) *J Biol Chem* **267**: 8789-8794
34. Hoogendoorn H, Nesheim ME, Giles AR (1990) *Blood* **75**: 2164-2171
35. Stein PE, Carrel RW (1995) *Structural Biology* **2**: 96-113
36. Fuchs HE, Michalopoulos GK, Pizzo SV (1984) *J Cell Biochem* **25**: 231-235
37. Pratt CW, Church FC, Pizzo SV (1988) *Arch Biochem Biophys* **262**: 111-116
38. Kazama Y, Niwa M, Yamagishi R, Takahashi K, Sakuragawa N, Koide T (1987) *Thromb Res* **48**: 179-185
39. Heeb MJ, Griffin JH (1988) *J Biol Chem* **263**: 11613-11617
40. Geiger M, Binder BR, Heeb MJ, Griffin JH (1986) *Circulation* **74**: 11-234
41. Stief TW, Radtke KP, Heimbürger N (1987) *Biol Chem* **368**: 1427-1433
42. Stump DC, Thienpont M, Collen D (1986) *J Biol Chem* **261**: 1259-1266
43. Guzdek A, Potempa J, Dubin A, Travis J (1990) *FEBS Lett* **272**: 125-127
44. van der Graaf F, Koedam JA, Griffin JH, Bouma BN (1983) *Biochem* **22**: 4860-4866
45. Espana F, Estelles A, Griffin JH, Aznar J (1991) *Thromb Haemost* **65**: 46-51
46. Ecke S, Geiger M, Resh I, Jeranek I, Sting L, Maier M, Binder BR (1992) *J Biol Chem* **267**: 7048-7052
47. Christensson A, Lilja H (1994) *Eur J Biochem* **220**: 45-53
48. Espana F, Sanchez-Cuenza J, Vera CP, Estelles A, Gilabert J (1993) *J Lab Clin Med* **122**: 711-719
49. Laurell M, Christensson A, Abrahamsson PA, Stenflo J, Lilja H (1992) *J Clin Invest* **89**: 1049-1051
50. Seully MF, Toh CH, Hoogendoorn H, Manuel RP, Nesheim ME, Solymoss S (1993) *Thromb Haemost* **70**: 377-382
51. Espana F, Vicente V, Tabernero P, Sehavver I, Griffin JH (1990) *Thromb Res* **59**: 593-608
52. Heeb MJ, Espana F, Griffin JH (1989) *Blood* **73**: 446-452
53. Tabernero D, Espana F, Vicente V, Estelles A, Gilabert J, Aznar J (1990) *Thromb Haemost* **63**: 380-382

UWAGA

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

LIST DO REDAKCJI

Warszawa, 10 grudzień 1996 r.

Prof. dr Zofia Zielińska
Redaktor Naczelny Postępów Biochemii
w Warszawie

Szanowna Pani Profesor,

W 41. numerze naszego biuletynu (LIST do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Szczecin, czerwiec/lipiec 1996 r.) ukazała się notatka, informująca, że kierownicy zakładów biochemii na swym dorocznym (dydaktycznym) zebraniu zaprotestowali przeciwko „zamysłom zniesienia Centralnej Komisji ds. Tytułu i Stopni Naukowych” i protest ten skierwali do Marszałków Sejmu i Senatu RP. Protest ten nie odpowiada moim poglądom na tę sprawę i być może — wielu innych polskich biochemików. Tych mianowicie, którzy nie widzą merytorycznego (w odróżnieniu od biurokratycznego) uzasadnienia dla kontynuowania działalności owego reliktu lat minionych — Centralnej Komisji Kwalifikacyjnej ds. Kadr Naukowych (CKK). CKK była bowiem instancją nadrzędną nad Radami Wydziałów uczelni wyższych i Radami Naukowymi instytutów naukowych i miała zapobiegać nadawaniu tytułów i stopni naukowych osobom na szczyt ten w oczach teźże CKK nie zasługującym. Nie zapobiegła jednak pojawianiu się tytułów i stopni naukowych przy nazwiskach raczej nie znanych w środowiskach naukowych, najczęściej przy okazji tych czy innych perturbacji politycznych. Odmowy zaś zatwierdzenia tytułów nadanych przez Rady Wydziałowe czy Naukowe, często nietrwale, z reguły budziły ostrą niechęć w środowiskach naukowych. Zarówno tradycja jak aktualne przepisy prawa gwarantują kompetencję tych Rad: jeżeli zrobią błąd, to tym gorzej dla danej Rady.

A może jednak aktualna Centralna Komisja nie będzie kontynuatką byłej CKK, a postępować będzie zgodnie z literą swojej nazwy, a nie jej duchem tj. zajmie się semiotyką tytułów i stopni naukowych? Przeciwno tej supozycji przemawia fakt utrzymania — jak to się pokazało przy okazji aktualnych wyborów do CKdsTiSN — dwu komisji dla badania stopni i tytułów nadawanych biofizykom (odrębnie „fizycznym” i odrębnie „biologicznym”). Niestety, nie tylko nie zlikwidowano błędu, jak popełnił przed około trzydziestu laty jakiś urzędnik centrali, ale utworzono jeszcze dwa nowe **dziwolągi**: odrębną komisję dla biochemii z nauk biologicznych i odrębną dla biochemii z nauk chemicznych. Sapienti sat!

Cieszyć się będę, jeżeli uzna Pani Redaktor list ten za godny opublikowania na łamach *Postępów Biochemii*, a jeszcze bardziej — jeśli uzna Pani, że daje on asumpt do utworzenia w *Postęпах Biochemii* stałej rubryki dla dyskusowania poglądów członków naszego Towarzystwa na aktualne i spodziewane transformacje w obszarze nauk biologicznych.

Proszę przyjąć wyrazy mego głębokiego poważania i serdeczne pozdrowienia

Prof. dr med. Kazimierz Zakrzewski

Szanowni Czytelnicy
Zapraszamy do dyskusji

Redaktorzy

XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Kraków, 17-20.09.1996

W dniach od 17 do 20 września 1996 roku obradował w Krakowie XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W Zjeździe wzięło udział około 800 osób z kraju i z zagranicy. Dzięki ofiarności NSZZ Solidarność Akademii Medycznej w Łodzi i Fundacji UJ-Janineum sfinansowano udział w Zjeździe czterem z dziewięciu zaproszonych osób polskiego pochodzenia z Ukrainy i Litwy.

Organizatorzy przygotowali dla uczestników Zjazdu 3 komunikaty informujące na bieżąco o zaawansowaniu prac organizacyjnych. Ponadto wydano „Program” Zjazdu (liczący 46 stron) i „Streszczenia” referatów, liczące 336 stron (w tym 573 pozycje streszczeń wykładów plenarnych i komunikatów).

Obrady Zjazdu odbywały się w Centrum Kongresowym Akademii Rolniczej, w budynku Wydziału Leśnego przy ul. 29-Listopada w dniach 18-20 września. Wykłady prowadzone były po polsku. Jedynie referaty w sesji „Proteinazy i ich inhibitory” wygłoszone zostały po angielsku, ze względu na udział wykładowców z zagranicy.

Ceremonia otwarcia Zjazdu odbyła się 17 września o godzinie 18.00 w Teatrze im. Juliusza Słowackiego. Gości serdecznie powitał Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego dr hab. Piotr Laidler i Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego, biochemik-profesor Aleksander Koj.

Profesor Liliana Konarska, Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, w barwny sposób omówiła biochemiczne wydarzenia, które miały miejsce w minionym roku, a następnie przeszła do uroczystości wręczenia nagród laureatom konkursów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Nagrodę im. Antoniego Dmochowskiego otrzymała pani profesor Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz za podręcznik „Cytobiochemia”, a pan profesor Grzegorz Bartosz otrzymał wyróżnienie za książkę „Druga twarz tlenu” (oboje laureaci z Uniwersytetu Łódzkiego). Nagrodę im. prof. Jakuba Parnasa w konkursie na najlepszą pracę doświadczalną otrzymali: dr Alicja Wawrzynów i prof. Maciej Żylicz z Uniwersytetu Gdańskiego za pracę: „Divergent effects of native and denaturated protein substrates”. Nagrodę im. prof. Bolesława Skarżyńskiego za publikację „Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów kinaz cyklinozależnych” otrzymała pani profesor Barbara Grzelakowska-Sztabert z Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Miłym akcentem uroczystości otwarcia Zjazdu było wręczenie Profesorom: Zygmuntowi Machoyowi, Włodzimierzowi Ostrowskiemu, Kazimierzowi Zakrzewskiemu i Mariuszowi Zydowo dyplomów Honorowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Inauguracyjny wykład pt.: „Wieści za świata RNA”, otwierający naukową część Zjazdu, wygłosił profesor Witold Filipowicz z Bazylei.

Ceremonię otwarcia Zjazdu zakończył pełen ekspresji występ artystów z krakowskiej „Piwnicy pod Baranami” z udziałem Jacka Wójcickiego, a w foyer teatru uczestnicy Zjazdu witali się tradycyjną lampką wina!

W programie naukowym Zjazdu znalazło się 11 sesji tematycznych, których tytuły wraz z nazwiskami przewodniczących podano poniżej:

1. Biotechnologia w medycynie i rolnictwie – Z. Żak, F. Dubert, Kraków.
2. Biochemia i środowisko – M. Gumińska, Kraków.
3. Biochemia kliniczna – J. Naskalski, Z. Szafran, Kraków.
4. Zależność struktury i funkcji białek oraz kwasów nukleinowych – Z. Wasylewski, Kraków.
5. Genetyka molekularna człowieka – H. Rokita, Kraków.
6. Posttranslacyjne modyfikacje białek – G. Palamarczyk, Warszawa.
7. Proteinazy i ich inhibitory – A. Dubin, J. Potempa, Kraków.
8. Rodniki tlenowe i ich znaczenie w biologii i medycynie – T. Stelmaszyńska-Zgliczyńska, T. Sarna, Kraków.
9. Sympozjum Glikokonjugatów – J. Kościelak, Warszawa.

10. Nauczanie biochemii – J. Frendo, Kraków.

11. Doniesienia różne – P. Laidler, T. Kędryna, A. Lityńska, Kraków.

Atrakcyjna treść i ciekawy, nieszablonowy sposób prezentacji wzbudzały olbrzymie zainteresowanie słuchaczy, o czym świadczyła wysoka frekwencja na wszystkich wykładach.

Podczas Zjazdu rozstrzygnięto kolejne edycje Konkursów: o nagrodę im. prof. Włodzimierza Mozołowskiego za najlepszą pracę przedstawioną na Zjeździe przez biochemika do 30 roku życia oraz o nagrodę im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth za najlepszą prezentację przedstawioną przez autora-studenta, który w momencie przysyłania streszczenia nie posiada dyplomu ukończenia studiów.

Komisji konkursowej o nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego przewodniczył prof. Andrzej Klein (Kraków). Komisja przyznała nagrodę pani dr Ewie Missol z Zakładu Biologii Nowotworów w Gliwicach za pracę: „Wykorzystanie liposomów kationitowych do wprowadzenia *in vivo* samobójczego genu dezaminazy cytozyny z *E. coli*”. Ponadto w konkursie tym wyróżniono: dr Alicję Węgrzyn z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Pracowni Biologii Molekularnej afiliowanej przy Uniwersytecie Gdańskim za pracę: „Mechanizm rozpadu kompleksu replikacyjnego bakteriofaga – po szoku termicznym” (współautorami opracowania są Grzegorz Węgrzyn i Karol Taylor) oraz mgr Mariusza R. Więckowskiego (współautor Lech Wojtczak) z Zakładu Biochemii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie za prezentację pracy „Rola nośników mitochondrialnych w rozprzęgającym działaniu kwasów tłuszczowych”.

Komisji konkursowej o nagrodę im. Janiny Opieńskiej-Blauth przewodniczył profesor Tomasz Borkowski (Lublin). Komisja przyznała nagrodę studentowi medycyny Maciejowi Wiznerowiczowi z Zakładu Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej w Poznaniu za opracowanie merytoryczne i metodyczne tematu: „Konstrukcja dwucistronowych wektorów retrowirusowych dla celów terapii genowej nowotworów u ludzi”. Wyróżnienie w tym konkursie otrzymał Borys Wróbel z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego za dwie prezentacje: „Amplifikacja plazmidów w komórkach *Escherichia coli* w warunkach niedoboru aminokwasów” i „Degradacja DNA w podwyższonej temperaturze po amplifikacji plazmidów w głodzonych komórkach *Escherichia coli*”.

Informacje o Zjeździe zamieściła lokalna gazeta „Dziennik Polski” a w dziesiątym numerze miesięcznika „Nauka i Przyszłość”, wydawanego przez Polską Akademię Nauk w Warszawie, ukazała się krótka notka w stałej rubryce pt.: „Z życia nauki”. Ponadto radio Kraków podało wiadomości o Zjeździe w codziennym serwisie informacyjnym, a telewizja Kraków, Telewizja Wisła, Radio Mariackie i Polska Agencja Prasowa przeprowadziły rozmowy z uczestnikami Zjazdu, prof. prof.: W. Filipowiczem, A. Mackiewiczem i J. Lubińskim oraz dr hab. P. Laidlerem.

Organizatorzy starali się dostarczyć uczestnikom XXXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego także innych – poza intelektualnymi – przeżyć. W programie: zwiedzanie Krakowa, wycieczka do Wieliczki, Ojcowa i Pieskowej Skály, koncert organowy w Kościele Mariackim oraz spektakl w Teatrze Starym. Imprezą dodatkową było również, pełne ciepła i serdeczności spotkanie towarzyskie stwarzające możliwość pełniejszej integracji naszej społeczności biochemicznej.

W przygotowaniu Zjazdu pomocy finansowej udzieliły firmy: Boehringer Mannheim, KZF Polfa SA Kraków, Bank PKO SA Kraków. PPSiD Polmos Kraków, MPK Kraków.

Piotr Laidler

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.

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

XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Katowice, 9-12 września 1997

XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd Katowickiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego informuje, że w dniach **9-12 września 1997 roku w Katowicach** odbędzie się **XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**.

Komitet Organizacyjny ma zaszczyt i przyjemność zaprosić wszystkich Członków Towarzystwa i Osoby zainteresowane Biochemią do udziału w Zjeździe.

Mamy nadzieję, że liczne uczestnictwo stworzy możliwość szerokiej wymiany doświadczeń i nawiązania nowych kontaktów.

Obrady Zjazdu odbywać się będą na terenie Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach-Ligocie ul. Medyków 18-14.

Przewidujemy zakwaterowanie Uczestników Zjazdu w pobliskich domach akademickich i hotelach w centrum Katowic.

Uroczystość otwarcia Zjazdu z wykładem plenarnym Prof. dr hab. Aleksandra Koja pt. „Rola cytokin w indukcji i hamowania stanu zapalnego” odbędzie się **9 września 1997** o godz. 18⁰⁰ w Górnośląskim Centrum Kultury w Katowicach, Plac Sejmu Śląskiego 2.

Serdecznie zapraszamy.

Program Naukowy Zjazdu

1. Struktura i funkcja genu i genomu
2. Patobiochemia tkanki łącznej
3. Problemy biochemiczne w biologii i medycynie środowiskowej
4. Biotechnologia
5. Rodniki tlenowe i antyoksydanty
6. Postępy biochemii klinicznej
7. Biochemia wysiłku fizycznego
8. Doniesienia różne
9. Sesja firmowa

Prezentacja wyników przewidziana jest w formie:

1. referatów wygłaszanych przez zaproszonych Wykładowców
2. plakatów prezentowanych przez pozostałych Uczestników. Indywidualne streszczenia doniesień w postaci wydrukowanej oraz zapisanej na pojedynczych dyskietkach będą przyjmowane w nieprzekraczalnym terminie do 15 kwietnia 1997 roku. Szczegółowe instrukcje dotyczące przygotowania streszczeń zostaną podane w komunikacie nr 2 i rozesłane osobom, które prześlą zgłoszenia wstępne.

Komitet Naukowo-Organizacyjny

L. Badura, J. Chmielowski, M. Chorąży, M. Drózd, R. Grabowska-Bochenek, B. Klapcińska, Z. Krawczyk, E. Kucharz, S. Łabużek, K. Olczyk, J. Rzeszowska-Wolny, S. Szala, R. Tarnowski, M. Wardas, L. Węglarz, T. Wilczok, I. Zak.

Kontakt z Organizatorami

Polskie Towarzystwo Biochemiczne Oddział Katowicki Komitet Organizacyjny XXXIII Zjazdu PTBioch. Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Śląskiej Akademii Medycznej 40-752 Katowice, ul. Medyków 18

tel./fax (032) 152 50 54,

tel. 152 70 81 + 4 wew. 1467, 1462, 1459

e-mail: <biochemik @ infomed.slam.katowice.pl

Dr hab. Iwona Żak-Przewodnicząca

Dr Rozalia Grabowska-Bochenek — Sekretarz

Wystawy i sesje firmowe

W trakcie Zjazdu zaproszone przez Organizatorów Firmy prezentować będą sprzęt laboratoryjny, aparaturę i odczynniki.

Imprezy towarzyszące

Organizatorzy przewidują możliwość zwiedzania Zamku Pszczyńskiego oraz Sztolni Czarnego Pstrąga w Tarnowskich Górach. Ponadto planujemy

zorganizowanie całonocnej (13.X.97) wycieczki na Babią Górę lub w Beskid Śląski i Żywiecki. Zachęcamy także do udziału w koncercie, spektaklu teatralnym oraz spotkaniu towarzyskim.

NOWE WYDAWNICTWA PTBIOCH.:

- 1) „HORMONY GLIKOPROTEINOWE — Struktura, biosynteza i funkcja ich oligosacharydów”
Monografia biochemiczna nr 41
autor Iwona Żak i Marian Drózdź
rok wydania 1996
cena 5,- zł
- 2) „WŁODZIMIERZ MOZOŁOWSKI 1895—1975 w 100-lecie urodzin”
Wydawca Oddział Gdański PTBioch. r. 1995
pod red. Wiesława Makarewicza praca zbiorowa
cena 25,- zł



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”.

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1997 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne napi-**

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

**Prenumerata krajowa dla instytucji:
60. zł**

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

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

Pokwitowanie dla wpłacającego	Odcinek dla posiadacza rachunku	Odcinek dla poczty lub banku
zł.....	zł.....	zł.....
słownie.....	słownie.....	słownie.....
wpłacający.....	wpłacający.....	wpłacający.....
.....
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek	na rachunek	na rachunek
Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-2720-3-69	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-2720-3-69	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa. Al. Jerozolimski 37 00 44-1225-2720-3-69
stempel	stempel	stempel
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Pobrano opłatę zł. </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Pobrano opłatę zł. </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Pobrano opł zł. </div>
..... podpis przyjmującego podpis przyjmującego podpis przyjmującego

Wskazówki dla autorów

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

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

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i 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 stworzonych 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 odwrócie). 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 przesłać na adres:

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

