

26  
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

**POSTĘPY**

PL ISSN  
0032-5422

**WOCZERNIA**

# Advances in Biochemistry

TOM 44, NR 3, 1998

Rodzina genów stresu . . . . .	179
Molekularne podłoże CGD . . . . .	193
Sygnaly w komórce roślinnej . . . . .	201
Antygen CD45 . . . . .	208
Immunomodulatory a cytokiny . . . . .	216
Zrekombinowany wirus vaccinia . . . . .	220
Syntaza tymidylanowa . . . . .	228
Aneksyny jako kanały jonowe . . . . .	237
Proteoglikany agregujące z kw. hialuronowym . . . . .	245
Apoptoza . . . . .	252
SGA w rodzinie <i>Solanaceae</i> . . . . .	254
Endosomy a sygnał insulinowy . . . . .	263
Sprawozdanie . . . . .	266
Recenzja . . . . .	267
Informacje . . . . .	269

# One Call. One Source. A World of Biomedical Products.

**ICN Pharmaceuticals, Inc.** powstała w 1960 roku. Główna siedziba firmy znajduje się w Costa Mesa, Kalifornia, USA. Jeden z jej działów to

**ICN Biomedicals.** Istnieje 20 przedstawicielstw na wszystkich kontynentach, w tym utworzone na początku tego roku przedstawicielstwo w Polsce.

**ICN Biomedicals** w swojej ofercie posiada szeroki wachlarz odczynników biomedycznych, które podzielono według następujących dziedzin:



## Cell Biology

Media hodowlane i bakteriologiczne, surowice, antybiotyki, cytokiny i czynniki wzrostu oraz zestawy do ich oznaczania, a także linie komórkowe.



## Immunobiologicals

Odczynniki Cappel™, przeciwciała monoklonalne i poliklonalne, wysokiej czystości antygeny, produkty do immunoblotingu, immunoprecypitacji, RIA, EIA, ELISA, odczynniki do badania nowotworów i onkogenów.



## Molecular Biology & Radiochemicals

Odczynniki do izolacji, oczyszczania i analizy kwasów nukleinowych, odczynniki do reakcji PCR, enzymy restrykcyjne, zestawy do chemiluminescencji i bioluminescencji, odczynniki do elektroforezy.



## Neuroscience

Adenozydy, agonistyczne i antagonistyczne czynniki adrenergiczne, cholinergiczne, dopaminergiczne, aminy biogenne i zestawy ELISA do ich oznaczania, inhibitory enzymów, modulatory kanałów jonowych, przeciwciała i czynniki do badania sygnału transdukcji.



Projekt: Piotr Filipiak dla Tauber-promotion, tel./fax: (0 22) 39 00 06

Adres: ICN POLFA Rzeszów S.A. – Biuro Marketingu i Sprzedaży  
**Biomedical Research Products**  
ul. Konduktorska 4/7, 00-775 Warszawa  
Tel. (48 22) 646 51 78; Fax: (48 22) 651 20 35  
Tel. kom. 0 602 49 61 05  
E-mail: [dsryffa@polfa.com.pl](mailto:dsryffa@polfa.com.pl)



**WYDAWCA**

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna  
Mińska 65  
03-828 Warszawa

**REDAKCJA**

Editorial Board  
REDAKTOR NACZELNY  
Editor in chief  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 831-24-03  
REDAKTORZY  
Editors  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
tel. 659-70-72 w. 3234  
LILIANA KONARSKA  
tel. 659-85-71 w. 352  
bezp. 658-20-99  
wtorki 15—18  
ANNA SZAKIEL  
tel. 823-20-46  
IWONA FIJAŁKOWSKA  
tel. 659-70-72 w. 1123  
JOLANTA GRZYBOWSKA  
tel. 810-50-71/9 w. 138  
HANNA LASKOWSKA  
pon. i czw. 14-16  
tel. 659-85-71 w. 441

**RECENZENCI ZESZYTU**

Referees of this issue  
GRZEGORZ BARTOSZ  
(Łódź)  
MARIA BOGUTA  
(Warszawa)  
GRAŻYNA DOBROWOLSKA  
(Warszawa)  
NADZIEJA DRELA  
(Warszawa)  
JERZY DUSZYŃSKI  
(Warszawa)  
ANNA FILIPEK  
(Warszawa)  
ANDRZEJ GINDZIENSKI  
(Białystok)  
STANISŁAW LEWAK  
(Warszawa)  
BOHDAN LIBEREK  
(Gdańsk)  
ZOFIA POREMBSKA  
(Warszawa)  
EWA SIKORA  
(Warszawa)  
KRYSZYNA SZEWCZYK  
(Gdańsk)  
KRZYSZTOF ZWIERZ  
(Białystok)

**ADRES REDAKCJI**

Address  
REDAKCJA KWARTALNIKA  
„POSTĘPY BIOCHEMII”  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa  
tel. (22) 659-85-71 w. 441  
poniedziałki, czwartki 14<sup>00</sup>-16<sup>00</sup>  
fax (22) 822-53-42  
e-mail: postępy@nencki.gov.pl

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

**SPIS TREŚCI  
CONTENTS****Rodzina genów stresu *hsp70* ssaków**

Mammalian *hsp70* stress gene family  
KATARZYNA LISOWSKA, ZBIGNIEW KRAWCZYK . . . . . 179

**Molekularne podłoże przewlekłej choroby ziarniniakowej**

Molecular basis of chronic granulomatous disease  
CEZARY ŻEKANOWSKI, HANNA SKOPCZYŃSKA . . . . . 193

**Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej**

Plant cell signalling; plasma membrane receptors  
JOLANTA BARAŃSKA . . . . . 201

**CD45, antygen z aktywnością fosfatazową, budowa, działanie i rola w aktywacji limfocytów T**

The CD45 antygen with phosphatase activity; structure and function in the T-cell activation  
IWO BOHR, JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA . . . . . 208

**Wpływ immunomodulatorów typu MDP na sekrecję i aktywność cytokin**

Influence of immunomodulators of the type MDP on secretion and activity of cytokines  
KRYSZYNA DZIERZBICKA, MAGDALENA GOZDOWSKA, ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK . . . . . 216

**Wirus vaccinia i jego zastosowanie w biologii molekularnej oraz immunologii**

Vaccinia virus and its application in molecular biology and immunology  
DARIUSZ KMIECIAK . . . . . 220

**Regulacja ekspresji genu syntazy tymidylanowej**

Regulation of thymidylate synthase gene expression  
MAGDALENA DĄBROWSKA . . . . . 228

**W jaki sposób aneksyny, rozpuszczalne białka wiążące wapń, tworzą w błonie kanały jonowe?**

How annexins, soluble calcium-binding proteins, may form ion channels in the membrane?  
JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA, SŁAWOMIR PIKUŁA . . . 237

**Proteoglikany agregujące z kwasem hialuronowym**

Hyaluronan aggregating proteoglycans  
RAFAŁ BOBIŃSKI, KRYSZYNA OLCZYK, EWA KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA . . . . . 245

<b>Apoptoza: nukleaza, kaspazy, cytochrom c</b>	
Apoptosis: nuclease, caspases, cytochrome c	
PIOTR WIDŁAK . . . . .	252
<b>Glikoalkaloidy steroidowe rodziny <i>Solanaceae</i></b>	
Steroidal Glycoalkaloids (SGA) in <i>Solanaceae</i>	
JAN ZIMOWSKI . . . . .	254
<b>Nowe w biochemii: udział endosomu w transmisji syg- nału insulinowego</b>	
Role of the endosome in insulin signaling	
MARTA BOBESZKO, JOLANTA BARAŃSKA . . . . .	263
<b>Sprawozdanie</b>	
Report . . . . .	266
<b>Recenzja książki</b>	
Review of a book . . . . .	267
<b>Informacje</b>	
Information . . . . .	269

**W. Mejbaum-Katzenellenbogen's Molecular Biology Seminars**

**6. Liposomes and Related Structures**

*Wrocław/Szklarska Poręba, Poland, June 10-12, 1999*

Info: Prof. Arkadiusz Kozubek

University of Wrocław, Inst. Biochemistry and Molecular Biology,

Department Lipids and Liposomes,

ul. Przybyszewskiego 63/77,

PL-51-148 Wrocław, Poland

Fax (48) +71 3252-930

E-mail: [kozubek@angband.microb.uni.wroc.pl](mailto:kozubek@angband.microb.uni.wroc.pl)

WWW: [http://angband.microb.uni.wroc.pl/biochem/sem\\_99.htm](http://angband.microb.uni.wroc.pl/biochem/sem_99.htm)

Rodzina genów stresu *hsp70* ssakówMammalian *hsp70* stress gene familyKATARZYNA LISOWSKA<sup>1</sup>,  
ZDZISŁAW KRAWCZYK<sup>2</sup>

## Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Konserwatyzm ewolucyjny genów białek szoku termicznego rodziny *hsp70*
- III. Struktura białek rodziny HSP70
- IV. Oddziaływania białek HSP70 z białkami pomocniczymi
- V. Przegląd właściwości genów i białek rodziny *hsp70* ssaków
  - V-1. Geny *hsp70i*
  - V-2. Gen *hsc70*
  - V-3. Gen *grp78*
  - V-4. Gen *pbp74/mot(2)/mthsp75*
  - V-5. Gen *hst70/hsp70.2/HSPA2*
  - V-6. Gen *hsc70t*
  - V-7. Inne
- VI. Uwagi końcowe

## Contents:

- I. Introduction
- II. Evolutionary stability of the *hsp70* genes/proteins
- III. Structure of the HSP70 proteins
- IV. Interaction of HSP70 with helper proteins
- V. General properties of the mammalian *hsp70* genes and their proteins
  - V-1. *hsp70i* genes
  - V-2. *hsc70* gene
  - V-3. *grp78* gene
  - V-4. *pbp74/mot1(2)/mthsp75* gene
  - V-5. *hst70/hsp70.2/HSPA2* gene
  - V-6. *hsc70t* gene
  - V-7. Others
- VI. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** aa — aminokwasy; kDa — tys. Daltonów; koniec C — koniec karboksylowy białka; koniec N — koniec aminowy białka; kpz — tys. par zasad; MHC — (ang. *major histocompatibility complex*), główny kompleks zgodności tkankowej; nt — nukleotydy; pz — para zasad; UTR — fragment jednostki transkrypcji nieulegający translacji.

## I. Wstęp

Nazwa białka szoku termicznego (ang. *heat shock proteins*, HSP) została pierwotnie nadana kilku białkom syntezowanym wybiórczo i z dużą wydajnością w komórkach muszki owocowej w temperaturze od kilku do kilkunastu stopni wyższej (szok termiczny) od fizjologicznej [1]. Reakcja komórek na szok termiczny przejawiająca się syntezą podobnego zestawu białek HSP jak w przypadku muszki owocowej jest zjawiskiem uniwersalnym. Obserwuje się ją zarówno u organizmów mezofilnych jak i takich, które żyją w gorą-

cych źródłach bądź zasiedlają wody lodowcowe, jeśli temperatura środowiska wzrośnie powyżej temperatury fizjologicznej dla danego gatunku.

Szok termiczny jest tylko jednym z wielu bodźców (tzw. czynników stresujących lub stresorów) aktywujących geny *hsp* [2]. Innych czynników stresujących, zarówno fizycznych jak i chemicznych, egzogennych jak i endogennych poznano tak wiele, że zaprzestano ich katalogowania. Właściwością wielu stresorów jest pośrednie lub bezpośrednie uszkodzenie natywnej struktury białek komórkowych; potwierdzeniem powyższego jest fakt, że doświadczalnie wywołana akumulacja zdenaturowanych białek istotnie indukuje ekspresję wielu genów *hsp* [3, 4].

Nazwa geny szoku termicznego używana jest na ogół w dwóch znaczeniach. W znaczeniu węższym odnosi się do genów, których transkrypcja indukowana jest przez bodźce stresujące (w tym szok termiczny) poprzez oddziaływanie czynnika transkrypcji HSF (ang. *heat shock factor*) z sekwencją regulatorową HSE (ang. *heat shock element*) (przegląd w: [5]). Stosowana w znaczeniu szerszym, nazwa ta obejmuje zarówno geny indukowalne termicznie jak i geny pokrewne (geny *hsc*, ang. *heat shock cognate*), które kodują białka o sekwencji aa zbliżonej do sekwencji niektórych białek HSP. Geny pokrewne są transkrybowane w tem-

<sup>1</sup> Dr, <sup>2</sup> doc. dr hab., Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie 44-100 Gliwice, ul. Wybrzeże AK 15  
e-mail: Katarzyna Lisowska — kasial@onkol.instonko.gliwice.pl; Zdzisław Krawczyk — krawczyk@onkol.instonko.gliwice.pl

peraturze fizjologicznej, a ich ekspresja nie zmienia się pod wpływem szoku termicznego. Niektóre z genów *hsp* mogą być jednak silnie pobudzane przez wiele bodźców innych niż szok termiczny [2], także Rozdział V. Ze względu na różnorodność bodźców indukujących ekspresję genów *hsp* i genów pokrewnych, coraz częściej określa się je łączną nazwą genów stresu komórkowego.

**Tabela 1.**

Proponowane nazewnictwo genów/białek *hsp70* człowieka utworzone w oparciu o nazwy *loci* poszczególnych genów (wg [9], zmodyfikowane]. HS oznacza aktywację genu pod wpływem hipertermii. Nazwę *locus*, genu i białka *STCH* utworzono zgodnie z zasadami przyjętymi w [9].

symbol <i>locus</i>	lokalizacja genu	piśmiennictwo	dotychczas spotykane nazwy genu	lokalizacja białka	HS	proponowana nazwa (białko/gen)
HSP1A	6p21.3	10, 11	<i>HSP70.1</i> , <i>HSP70.2</i> , <i>HSP72</i> , <i>HSP70</i>	cytopl./ jądro	tak	HSP70-1 <i>HSP70-1a</i>
HSPA1B	6p21.3	11	<i>HSP70.2</i>	cytopl./ jądro	tak	HSP70-1 <i>HSP70-1b</i>
HSPA1L	6p21.3	11	<i>HSP70-Hpm</i>	?	—	HSP70-1L <i>HSP70-1l</i>
HSPA2A	14q22	12	<i>HSP70</i>	?	tak	HSP70-2A <i>HSP70-2a</i>
HSPA2B	14q24.1	13	<i>HSPA2</i>	?	—	HSP70-2B <i>HSP70-2b</i>
HSPA4	5q31.1	14	<i>HSP70RY</i>	?	—	HSP70-4 <i>HSP70-4</i>
<i>HSPA5</i>	9q34	15, 16	<i>BiP</i> , <i>GRP78</i>	ER	—	HSP70-5 <i>HSP70-5</i>
HSPA6	1q	17, 18	<i>HSP70.6</i> <i>HSP70B'</i>	?	tak	HSP70-6 <i>HSP70-6</i>
HSPA7	1q	18, 19	<i>HSP70.7</i> <i>HSP70B</i>	?	tak	HSP70-7 <i>HSP70-7</i>
HSPA8	11q24	20, 21	<i>HSC70</i> , <i>HSC73</i>	cytopl. jądro	—	HSP70-8 <i>HSP70-8</i>
HSPA9	?	22, 23	<i>GRP75</i> , <i>PBP74</i>	mitoch.	—	HSP70-9 <i>HSP70-9</i>
HSPA10	21q11.1	24	<i>STCH</i>	ER(?)	—	HSP70-10 <i>HSP70-10</i>

U ssaków wyróżnia się na ogół pięć głównych klas genów stresu: *hsp100*, *hsp90*, *hsp70*, *hsp60* i *hsp25/27* [6], z których najliczniejszą jest rodzina *hsp70* [7, 8]. W genomach ssaków wykryto dotychczas po 10-12 genów *hsp70*, które spełniają kryterium wzajemnego podobieństwa sekwencji kodującej białko, lecz mogą różnić się mechanizmem regulacji ekspresji. Jedynie kilka genów tej rodziny to geny indukowalne termicznie a większość to tzw. geny pokrewne (Tab. 1, 2).

W celu uporządkowania nazewnictwa ludzkich genów *hsp70* zaproponowano, aby ich nazwy tworzyć w odniesieniu do nazw zajmowanych przez nie *loci*

(Tab. 1 [9]). Ponieważ proponowane nazewnictwo nie jest jeszcze zaakceptowane, w dalszej części pracy używane będą tradycyjne nazwy genów *hsp70*. Najczęściej spotykane w piśmiennictwie nazwy odpowiadających sobie (ortologicznych) genów rodziny *hsp70* człowieka, myszy i szczura przedstawiono w tabeli 2. Według dość powszechnie przyjętej konwencji nazwy genów zapisuje się kursywą małymi literami: *hsp*

(dużymi w przypadku genów ludzkich: *HSP*), zaś nazwy białek — dużymi literami: *HSP*. Wyróżnikiem białka szoku termicznego jest jego przybliżona względna masa cząsteczkowa (wyrażona w kDa), przykładowo — *HSP70*. Geny indukowalne termicznie wyróżnia się często literą „i” (ang. *inducible*), np. *hsp70i* (*HSP70i*).

Białka *HSP70* zaliczane są do tzw. białek opiekuńczych (ang. *chaperon proteins*), ułatwiających innym białkom komórkowym przyjmowanie prawidłowej struktury wyższego rzędu [40, 41, także Rozdział V]. Wyspecjalizowane rodzaje białek *HSP70* pełnią funkcje opiekuńcze na terenie różnych organelli oraz na

**Tabela 2.**

Odpowiadające sobie (ortologiczne) geny rodziny *hsp70* człowieka, szczura i myszy (wg [8], zmodyfikowane).

geny <i>HSP70</i> człowieka	piśmien- nictwo	geny <i>hsp70</i> szczura	piśmien- nictwo	geny <i>hsp70</i> myszy	piśmien- nictwo
<i>HSP70.1b</i> ( <i>HSP70-2</i> )	11	<i>hsp70.1</i>	25, 26, 27, 28	<i>hsp70.1</i>	33
<i>HSP70.1a</i> ( <i>HSP70-1</i> )	10	<i>hsp70.2</i>	27	<i>hsp70.3</i>	34
<i>HSP70.1l</i> ( <i>HSP70-Hom</i> )	11	<i>hsp70.3</i>	27	<i>hsc70t</i>	35
<i>HSP70.2b</i> ( <i>HSPA2</i> )	13	<i>hst70</i>	29	<i>hsp70.2</i>	36
<i>HSP70.5</i> ( <i>GRP78</i> )	15	<i>grp78</i>	30	<i>grp78</i>	37
<i>HSP70.8</i> ( <i>HSC70</i> )	20	<i>hsc70</i> ( <i>hsc73</i> )	31	<i>hsc70</i>	38
<i>HSPA9</i> ( <i>PBP74; MtHSP75</i> )	23, 22	<i>grp75</i>	32	<i>mot-1, mot-2,</i> <i>php74</i>	22, 39

powierzchni błon organellarnych współpracując z białkami HSP innych klas i/lub z tzw. białkami pomocniczymi (rozdział IV).

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie złożoności rodziny genów *hsp70* ssaków oraz podanie podstawowych informacji o strukturze i zróżnicowanej ekspresji genów tej rodziny. Większość informacji dotyczy genów rodziny *hsp70* człowieka, myszy i szczura. Ze względu na znaczną ilość prac oryginalnych dotyczących omawianych zagadnień cytowane będą jedynie wybrane prace źródłowe i przeglądowe.

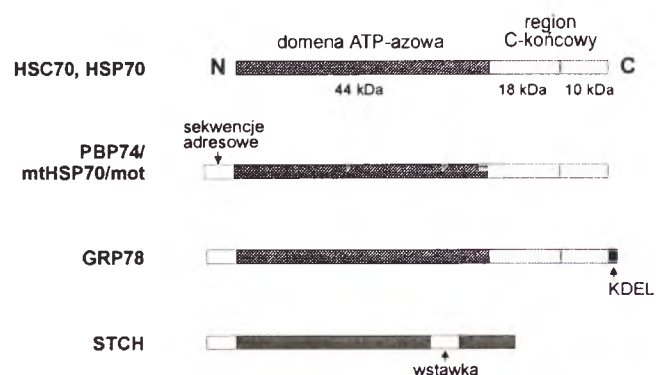
## II. Konserwatywność ewolucyjna genów/białek szoku termicznego rodziny *hsp70*

Białka rodziny HSP70 wyróżniają się spośród białek HSP innych klas największą stabilnością ewolucyjną i największym międzygatunkowym podobieństwem. Białka HSP70 najbardziej odległych ewolucyjnie organizmów wykazują nie mniej niż 42% homologii. Jest to najwyższa wartość jaką otrzymano porównując różne konserwatywne białka, co wskazuje, że HSP70 są prawdopodobnie najsilniej zachowawczymi ewolucyjnie spośród znanych białek występujących u wszystkich współczesnych gatunków [42].

Na podstawie porównania sekwencji aminokwasowej wszystkich znanych białek HSP70 zaproponowano model ewolucji tego białka i kodującego je genu [42]. Wyjściową formą białka HSP70 był, jak się sądzi, peptyd o długości około 9-15 aminokwasów. Prawdopodobnie gen kodujący ten pierwotny peptyd został wielokrotnie powielony, czego odbiciem jest obecność powtarzającego się dziewięćaminokwasowego motywu w części N-końcowej współczesnego białka HSP70. Następnie w wyniku duplikacji powstała dwupłatowa domena ATP-azowa typowa dla białek

rodziny HSP70 (rozdział III). Kolejnym etapem ewolucji genu *hsp70* było przyłączenie sekwencji DNA kodujących region C końca białka HSP70 i zróżnicowanie regionu promotora. Współczesne białka HSP70 mają podobny ogólny plan budowy u wszystkich gatunków (rozdział III, Ryc. 1).

Geny eukariontów tworzące współczesną rodzinę *hsp70* powstały z wyjściowego genu na drodze wielokrotnych duplikacji i dalszego zróżnicowania sekwencji kodującej i regionu promotora. Komórka eukariotyczna uzyskała dodatkowe geny *hsp70* poprzez zjawisko endosymbiozy, które doprowadziło do powstania



Ryc. 1. Schemat ilustrowujący strukturę białek rodziny HSP70 (cytowania w tekście). Budowa białka HSC70, będąc najlepiej poznana, służy jako model do przedstawiania struktury innych białek rodziny HSP70. Największe podobieństwo struktury białek HSP70 występuje w regionie domeny ATP-azowej. Region C końca obejmuje domenę (18 kDa) odpowiedzialną za oddziaływanie z substratem i domenę wielkości 10 kDa, której przypisywane są właściwości regulacyjne. Obszar domeny ATP-azowej oznaczono kolorem ciemnoszarym, zaś sekwencje regionu C-końcowego — jasnoszarym; białe prostokąty oznaczają sekwencje dodatkowe o charakterze sygnałów adresowych lub heterogennej insercji, czarnym kolorem oznaczono sekwencje odpowiedzialną za zatrzymywanie białka GRP78 wewnątrz ER.

mitochondriów i plastydów [43-45]. W rodzinie *hsp70* eukariontów można wyodrębnić co najmniej cztery różniące się od siebie podgrupy genów *hsp70*, które kodują białka o odrębnej lokalizacji komórkowej: cytoplazmatyczne, retikularne, plastydowe i mitochondrialne [43]. Białka HSP70 danej podgrupy są bardziej podobne do swoich odpowiedników innego gatunku niż do białek z innej podgrupy tego samego gatunku. Podobieństwo sekwencji aa pomiędzy odpowiadającymi sobie białkami rodziny HSP70 różnych gatunków ssaków wynosi około 95%.

### III. Struktura białek rodziny HSP70

Dotychczas najlepiej poznano strukturę białka HSC70, scharakteryzowanego pierwotnie jako czynnik ułatwiający dysocjację cząsteczek klatryny z powierzchni pęcherzyków opłaszczonych (ang. *uncoating ATP-ase*) [46, 47]. Ze względu na znaczne podobieństwo sekwencji aa białek HSP70 traktuje się białko HSC70 jako cząsteczkę modelową do omawiania budowy pozostałych białek rodziny.

W cząsteczce HSC70 wyróżnia się dwie podstawowe domeny: silnie konserwatywną ewolucyjnie domenę N-końcową, z którą związana jest aktywność ATP-azy, oraz znacznie mniej konserwatywną domenę odpowiedzialną za oddziaływania z substratami peptydowymi (schemat na rycinie 1). Na podstawie analizy rentgenograficznej kryształu domeny ATP-azowej bydłowego białka HSC70 ustalono, że składa się ona z dwóch „ramion” (ang. *lobes*) o podobnej wielkości [48]. Podstawa obu ramion tworzy miejsce przyłączenia cząsteczki ATP. Ten rejon oraz sekwencje aa, które występują na powierzchni domeny w miejscach kontaktu z sekwencjami końca karboksylowego są najsilniej konserwowanymi ewolucyjnie elementami struktury wszystkich białek HSP70. Domena ATP-azowa HSC70 wykazuje uderzające podobieństwo struktury przestrzennej do cząsteczki aktywny oraz domeny ATP-azowej heksokinazy [49] i kinazy glicerolowej (cyt. za: [50]), pomimo braku znaczącego podobieństwa sekwencji aa wymienionych białek.

Fragment cząsteczki HSC70, o długości 148 aa (18 kDa), przylegający do domeny ATP-azowej stanowi domenę wiążącą substrat peptydowy [51]. Początkowo postulowano, że region ten ma taki sam typ budowy jak białka MHC II [52], jednak nowsze dane otrzymane za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego wykazują, że domena ma unikalną topologię — tworzą ją dwie antyrównoległe struktury typu pofałdowanej kartki (ang.  $\beta$ -sheet) złożone z czterech łańcuchów aminokwasowych każda oraz pojedyncza  $\alpha$ -helisa [53].

Istotnym elementem strukturalno-funkcyjnym białek HSP są ostatnie 4 aminokwasy (EEVD) końca C. W przypadku białka HSC70 motyw EEVD zapewnia kontakt pomiędzy domenami N- i C-końcowymi, prawidłową strukturę przestrzenną białka oraz regulu-

je aktywność ATP-azową. Delecja bądź mutacja tej sekwencji upośledza oddziaływanie HSC70 z białkami pomocniczymi [54]. Motyw EEVD nie ma natomiast znaczenia dla procesu łączenia się białka HSP70 z substratem peptydowym.

Białka rodziny HSP70 wykazują wzór struktury podobny do opisanego wyżej białka HSC70; różnice dotyczą występowania sekwencji o charakterze sygnału adresowego lub i sygnału retencji oraz obecności insercji i delecji pewnych fragmentów. Porównanie struktury białek rodziny HSP70 przedstawiono schematycznie na rycinie 1.

### IV. Oddziaływania białek HSP70 z białkami pomocniczymi

Białka rodziny HSP70 zaliczane są do nadrodziny fosfotransferaz. Funkcja opiekuńcza białek HSP70 wydaje się nieodłącznie związana z aktywnością ATP-azową [przegląd w: [55]. Niektóre elementy mechanizmu opiekuńczej aktywności białek HSP70 zostały poznane poprzez badania wpływu prokariotycznego białka HSP70(DnaK) i eukariotycznego białka HSC70 na proces renaturacji białek wskaźnikowych *in vitro* [56, 57]. DnaK i HSC70 nie zapobiegają denaturacji białek w podwyższonej temperaturze, ograniczają natomiast nieswoistą agregację uszkodzonych białek oraz ułatwiają ich renaturację. Wydajna renaturacja wymaga obecności zarówno ATP jak i tzw. białek pomocniczych. U prokariota białkami pomocniczymi są DnaJ i GrpE, zaś w komórkach eukariotycznych odpowiednikiem bakteryjnego białka DnaJ jest białko HSP40 [przegląd w: [58]. Eukariotyczny odpowiednik białka GrpE znaleziono najpierw w mitochondriach drożdży [przegląd w: [59]. Niedawno stwierdzono, że ludzkie białko BAG-1, które poprzez oddziaływania z białkami Bcl-1, Raf-1 oraz niektórymi receptorami czynników wzrostowych hamuje proces apoptozy, jest funkcjonalnym odpowiednikiem białka GrpE [60].

W komórkach ssaków wykryto białko pomocnicze p48(Hip) (ang. HSC70 *interacting protein*) [57] oddziałujące z HSC70 i HSP70i oraz z białkiem pomocniczym HSP40. Białko Hip wykazuje także samoistną aktywność opiekuńczą: *in vitro*, w obecności ATP, zapobiega ono prawie całkowicie niespecyficznnej agregacji białka wskaźnikowego [przegląd w: [6]. Ostatnio wykryto dwa kolejne białka pomocnicze. Pierwsze to białko p60/Hop (ang. HSP70/HSP90 *organizing protein*) współdziałające z HSC70 i HSP90 m.in. w procesie aktywacji receptora progesteronu [62].

Drugie, to białko p16, identyczne z białkiem Nm23, należące do rodziny kinaz dwufosforanów nukleozydów [63]. p16 moduluje aktywność białka HSC70 utrzymując je w formie monomerycznej i ułatwiając dysocjację substratów peptydowych. p16 pełni prawdopodobnie funkcję antagonistyczną w stosunku do HSP40(DnaJ), które w obecności ATP katalizuje oligomeryzację HSC70 [cyt. za: [64].



Wydaje się, że zróżnicowanie funkcji opiekuńczych białek rodziny HSP70 tylko w niewielkim stopniu wynika ze zróżnicowania ich struktury i jest raczej skutkiem oddziaływań z odmiennymi białkami pomocniczymi [dyskusja w: [62, 65]. Należy zaznaczyć, że dane na temat oddziaływań z białkami pomocniczymi pochodzą prawie wyłącznie z badań nad białkiem HSC70.

## V. Przegląd właściwości genów i białek rodziny HSP70 ssaków

Poniżej omówiono właściwości genów *hsp70* człowieka, myszy i szczura. Ze względu na silne międzygatunkowe podobieństwo białek HSP70 [8] można oczekiwać, że przedstawione dane odnoszą się także do genów *hsp70* innych ssaków.

### V-1. Geny *hsp70i*

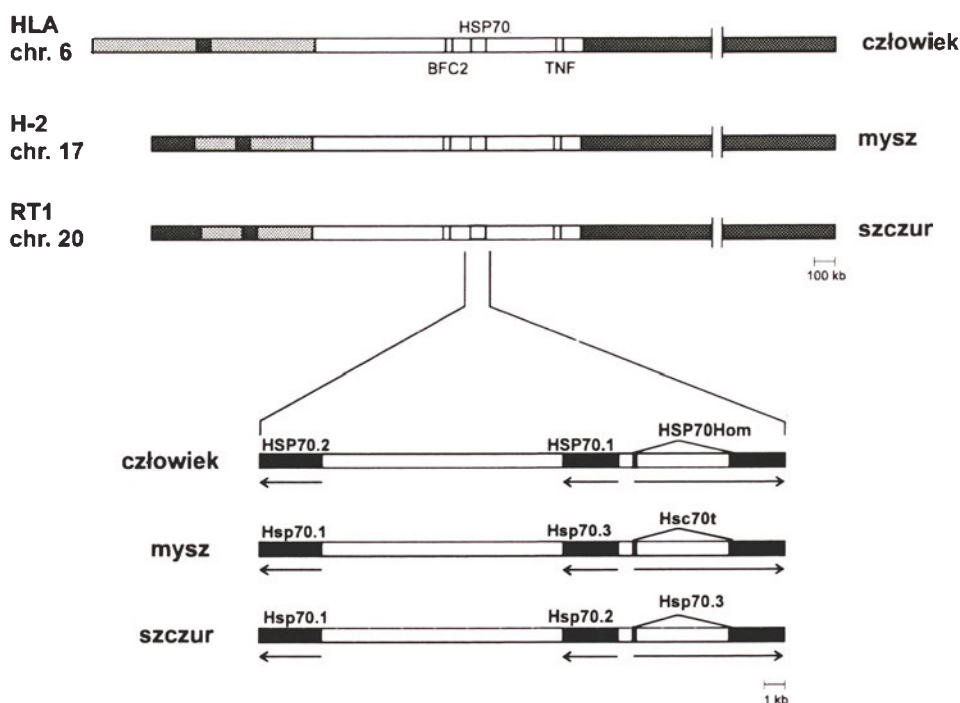
W genomie człowieka znajduje się prawdopodobnie 5, a w genomach szczura i myszy po 2 geny *hsp70i* (Tab. 2). Geny *hsp70i* gryzoni oraz odpowiadające im dwa geny *hsp70i* człowieka ułożone są tandemowo i znajdują się w kompleksie genów MHC klasy III (Ryc. 2). Oba geny *hsp70i* z regionu MHC III mają niemal identyczną sekwencję nukleotydową i kodują identyczne białko. Powstały one prawdopodobnie w wyniku duplikacji wyjściowego genu *hsp70*, która nastąpiła przed rozejściem się linii ewolucyjnych ssaków i gryzoni, czyli co najmniej 70 mln lat temu. Prawdopodobnie inna para genów *hsp70i* człowieka, zlokalizowana na chromosomie 1, także powstała wskutek duplikacji. Geny *hsp70i* nie zawierają intronów.

W komórkach hodowanych *in vitro* w temperaturze fizjologicznej geny *hsp70i* myszy i szczura są zazwyczaj transkrybowane z niewielką wydajnością i ich trans-

krypty można wykryć jedynie metodami bardziej czułymi niż hybrydyzacja RNA-DNA. Znaczną aktywność genów *hsp70i* obserwowano natomiast w komórkach niektórych przeszczepialnych nowotworów tych gryzoni [np. [66, 67]. Ekspresja genów *hsp70i in vitro* jest bardzo silnie stymulowana przez rozmaite czynniki stresujące [2], jednak w komórkach niektórych linii, wskutek metylacji DNA, indukowalna ekspresja jednego lub obu genów *hsp70i* może być zahamowana [68].

*In vivo*, w prawidłowych warunkach fizjologicznych, w większości narządów myszy i szczura stopień ekspresji genów *hsp70i* jest nieznaczny. U szczura wykryto jednak konstytutywną ekspresję genów *hsp70i* w mięśniach szkieletowych, jelicie grubym, płucach i siatkówce oka [69-72]. Stopień indukowanej ekspresji genów *hsp70i* może być zróżnicowany narządowo. Np. u szczura, pod wpływem hipertermii, geny *hsp70i* najsilniej aktywowane są w wątrobie, zaś najsłabiej w mózgu [25, 73]. U myszy naświetlanych promieniami  $\gamma$  aktywność genów *hsp70i* silnie wzrasta w płucach i śledzionie, ale nie w wątrobie czy w mózgu [74]. U szczurów pod wpływem stresu fizjologicznego geny *hsp70i* uaktywniają się wybiórczo w korze nadnerczy i w śródbłonku aorty [75, 76] oraz, w mniejszym stopniu, w korze mózgowej i żołądku [77].

Stopień ekspresji genów *hsp70i* może być także zróżnicowany komórkowo w obrębie danego narządu. Np. w nadnerczach szczurów poddanych hipertermii geny *hsp70i* aktywowane są jedynie w komórkach warstwy korowej [78]. Także u szczura, pod wpływem hipertermii, białka HSP70i akumulują się w komórkach glejowych mózgu i śródbłonku naczyń krwionośnych wszystkich struktur mózgu, natomiast w neuronach kory mózgowej i zwojach podstawy mózgu ekspresja genów *hsp70i* jest nieznaczna [79]. Problem zróżnicowanej narządowo i komórkowo ekspresji ge-



**Ryc. 2.** Lokalizacja genów z rodziny *hsp70* w kompleksie MHC. Kolorem ciemnoszarym oznaczono geny kompleksu MHC I, jasnoszarym — MHC II, białym MHC III. BFC2 — gen kompleksu dopełniacza C2, TNF — geny czynników nekrozy nowotworów. Strzałki pokazują kierunek transkrypcji. Dwa indukowalne geny *hsp70* ułożone są tandemowo, zaś gen *hsp70i/hsp70.3/HSP70-Hom*, ulegający specyficznej aktywacji w spermatydach jest ułożony w odwrotnej orientacji (wg [8], zmodyfikowane).

nów *hsp70i* — zwłaszcza w przypadku mózgu — jest dość złożony i nie będzie tu szerzej omawiany.

U człowieka (naczelnych), przeciwnie niż u gryzoni, geny *hsp70i* zlokalizowane w obrębie kompleksu MHC są aktywne w warunkach fizjologicznych zarówno *in vitro* [80] jak i *in vivo* [81-83]. Można sądzić, że podobnie jak u gryzoni, indukowalna ekspresja genów *hsp70i* człowieka wykazuje zróżnicowanie narządowe i komórkowe, jednak problem ten nie był dotychczas systematycznie badany. Silne pobudzenie ekspresji genów *hsp70i* może być związane z niektórymi stanami patologicznymi. Np. w znacznym odsetku różnych typów nowotworów u ludzi obserwuje się konstytutywną syntezę białka HSP70i [np. 84-86]. Sugeruje się, że poziom ekspresji genu *hsp70i* może być użytecznym markerem prognostycznym w niektórych typach nowotworów [86].

W komórkach prawidłowych, w których geny *hsp70i* są aktywne w temperaturze fizjologicznej, białko HSP70i znajduje się głównie w cytoplazmie, natomiast w komórkach nowotworowych może pojawiać się także w jądrze komórkowym i na powierzchni komórki [87, 88]. W komórkach poddanych szokowi termicznemu białko HSP70i przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego gromadząc się wybiórczo w jąderku [89, 90].

Regulacja ekspresji genów *hsp70i* jest procesem złożonym i będzie omówiona szerzej w odrębnej pracy przeglądowej (K r a w c z y k i L i s o w s k a, w przygotowaniu). Na poziomie transkrypcji podstawowy mechanizm regulacji jest wspólny dla indukowalnych genów *hsp* wszystkich rodzin. Obejmuje on powstanie funkcjonalnego kompleksu pomiędzy czynnikiem transkrypcji HSF i sekwencją regulacyjną DNA nazywaną HSE (przeгляд w: [5]). Na stopień ekspresji genów *hsp70i* może mieć jednak wpływ także struktura chromatyny w regionie promotora [91, 92], środowisko zewnątrzkomórkowe (*in vivo versus in vitro* [93]), czynniki inaktywujące HSF (np. flawonoid kwercytryna) [94] oraz inne niż HSF czynniki transkrypcji. Np. białko p53 [95] i jedna z podjednostek autoantygeny Ku [96] są represorami genu *hsp70i*, natomiast niektóre zmutowane formy białka p53 [97] czy białko MYB [98] są jego aktywatorami.

Funkcja białek HSP70i nie jest w pełni poznana, są one jednak, niewątpliwie, ważnym elementem systemu cytoprotekcji. Obecność białka HSP70i w komórkach transfekowanych genem *hsp70i* pod kontrolą konstytutywnego promotora zwiększa odporność tych komórek na działanie wielu szkodliwych czynników, takich jak szok oksydacyjny [99-101], szok termiczny [102-104] czy działanie niektórych cytostatyków [105]. U myszy transgenicznych z konstytutywną ekspresją białka HSP70i po eksperymentalnie wywołanym zawale obserwuje się przyspieszony powrót parametrów pracy serca do normy i zmniejszenie zakresu uszkodzenia mięśnia sercowego [106, 107].

Cytoprotekcyjny efekt wywierany przez nadekspre-

sję genu *hsp70i* nie zawsze jest pożądany. Konstytutywna ekspresja białka HSP70i w komórkach nowotworowych może hamować proces apoptozy [108, 109], ułatwiać proliferację komórek mimo uszkodzeń DNA [110] oraz sprzyjać powstawaniu odporności na cytostatyki [105] i cytolizę indukowaną przez TNF i monocyty, co zwiększa potencjał onkogenny komórek nowotworowych [111].

## V-2. Gen *hsc70*

U człowieka [20], myszy [38] i szczura [31] gen *hsc70* występuje w jednej kopii. Geny *hsc70* wymienionych gatunków zawierają osiem intronów. W intronach 5, 6 i 8 znajdują się sekwencje kodujące funkcjonalny U14 RNA, jeden z licznej grupy niskocząsteczkowych RNA (snoRNA) biorących udział w dojrzewaniu rRNA [112, 113].

HSC70 syntetyzowane jest konstytutywnie we wszystkich rodzajach komórek a jego stężenie jest zróżnicowane narządowo, przy czym największe stężenie HSC70 występuje w strukturach centralnego układu nerwowego (do 2% całkowitego białka [114]). Ani szok termiczny ani większość stresorów indukujących ekspresję genów *hsp70i* nie zmieniają istotnie poziomu ekspresji genu *hsc70*. Aktywność genu wzrasta natomiast w proliferujących komórkach, co prawdopodobnie wiąże się z nasileniem procesów wymagających funkcji opiekuńczej i transportującej białka HSC70. Przykładami mogą być: regeneracja wątroby szczura [115], faza proliferacyjna cyklu menstruacyjnego endometrium [116] oraz preimplantacyjna faza rozwoju zarodkowego myszy [117]. Mechanizm regulacji transkrypcji genu *hsc70* nie był jednak dotychczas przedmiotem intensywnych badań.

Białko HSC70 zlokalizowane jest głównie w cytoplazmie, gdzie występuje w formie monomerycznej i oligomerycznej [118]. Prawdopodobnie monomer jest aktywną formą opiekuńczą HSC70, natomiast oligomeryzacja jest sposobem przechowywania białka [119]. Szok termiczny powoduje przemieszczanie się części puli białka HSC70 (podobnie jak białka HSP70i) do jądra i jąderka [120, 121]. Translokacja HSC70 do jądra może okazać się bardziej czułym niż indukcja genów *hsp70i* wskaźnikiem (biomarkerem) ekspozycji komórek na działanie stresorów. Przejściową, jądrową lokalizację HSC70 przy równoczesnym braku indukcji genów *hsp70i* obserwowano m.in. *in vivo* w hepatocytach szczura po częściowej hepatektomii [122] lub po podaniu tioacetamidu [Z b o r e k i w s p., dane niepublikowane], w niektórych typach neuronów mózgu królika poddanego hipertermii [123] oraz *in vitro* w komórkach owodni człowieka pod wpływem nadtlenu wodoru [124].

HSC70 znajduje się także w lizosomach [125], w jednej z dwu odrębnych populacji tej organelli [126] oraz wykrywane bywa na błonie plazmatycznej [88]. Wydaje się, że białko HSC70 obecne na powierzchni

komórek nowotworowych może być sygnałem rozpoznawanym przez pewne klasy cytotoksycznych limfocytów T [127, 128].

HSC70 jest wielofunkcyjnym białkiem o właściwościach opiekuńczych i transportujących. Wyrazem funkcji opiekuńczej jest m.in. opłaszczanie przez cząsteczki białka HSC70 nowosyntezowanych polipeptydów, co chroni je przed degradacją, zapobiega nieswoistym interakcjom z innymi białkami i nieprawidłowemu fałdowaniu się cząsteczki przed ukończeniem biosyntezy. W przypadku białek złożonych HSC70 ułatwia polimeryzację podjednostek, przyjmowanie prawidłowej trzecio- i czwartorzędowej konformacji oraz ułatwia formowanie się wieloskładnikowych kompleksów białkowych. Wreszcie, HSC70 ułatwia rozfałdowywanie polipeptydów i utrzymywanie ich w rozfałdowanej konformacji (ang. *translocation competent conformation*) umożliwiając ich przejście przez błony organellarne. Funkcje opiekuńcze białka HSC70 i innych białek HSP przedyskutowane zostały wyczerpująco w pracach: [40, 41] i nie będą tu szerzej omawiane. Pierwszą z wykrytych i dotychczas najlepiej poznaną funkcją białka HSC70 związaną z transportem jest oddysocjowanie klatryny z pęcherzyków opłaszczonych [46, 47]. HSC70 bierze także udział w transporcie białek do lizosomów [129], jądra komórkowego [130, 131], mitochondrium [132] i siateczki śródplazmatycznej [133, 134]. Prawdopodobny jest także udział HSC70 w przygotowaniu, transporcie i prezentacji antygenicznych polipeptydów [135, 136].

Podczas aktywności opiekuńczej i transportującej białko HSC70 oddziałuje z krótkim, rozfałdowanym fragmentem peptydu substratowego. Badania z użyciem syntetycznych peptydów wykazują, że minimalna długość peptydu gwarantująca silne wiązanie z HSC70 to 7 reszt aminokwasowych. Najsilniej wiązane są peptydy zawierające w swojej sekwencji KK, KR lub RR, a podstawowy motyw strukturalny peptydu to naprzemienne występowanie hydrofobowych lub aromatycznych reszt aminokwasowych w pozycjach 2, 4 i 6 [137, 138].

HSC70 asocjuje także z natywnymi białkami komórkowymi. Oprócz wspomnianego wcześniej kompleksu z klatryną, wykryto kompleksy HSC70 z apoproteiną B100 [134], HSF [139], z niektórymi zmutowanymi formami białka p53 [140-142], z białkiem Rb [143] czy elementami cytoszkieletu [144, 145]. Znaczenie tych oddziaływań nie jest jasne.

Białko HSC70 rozpoznaje sekwencje heptamerowe aminokwasów ze zróżnicowanym powinowactwem [138], co w szczególnych przypadkach może prowadzić do stanów patologicznych. Przykładem może być chroniczne zapalenie stawów związane z ekspresją niektórych alleli genu HLA-DRB1. Warianty peptydów DR, których obecność jest wiązana z podatnością na chorobę zawierają wspólny motyw sekwencji aminokwasowej (QKRAA, QRRAA lub RRRAA) i jedynie te peptydy tworzą kompleks z HSC70. Motyw

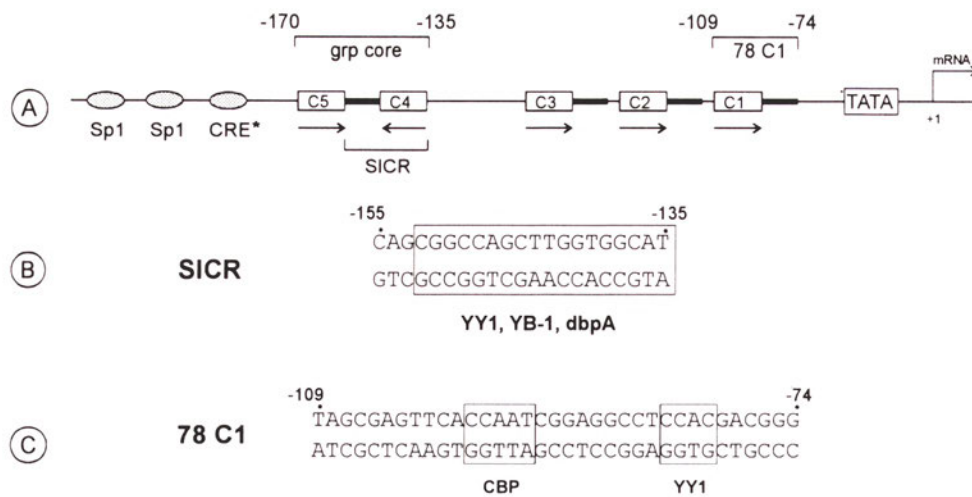
rozpoznawany przez HSC70 znajduje się w regionie białka DR zaangażowanym w prezentację antygenicznych peptydów limfocytom T [146]. Specyficzne rozpoznawanie określonych wariantów peptydowych przez HSC70 występuje także w odniesieniu do białek MHC I. Epitopy związane ze swoistościami Bw4/Bw6 (szczególnie Bw4a) zlokalizowane w konserwatywnym regionie  $\alpha$ -helisy I białka MHC I hamują różnicowanie prekursorowych komórek T w dojrzałe cytotoksyczne limfocyty T. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że peptyd o sekwencji odpowiadającej epitopowi Bw4a tworzy kompleksy z białkami HSC70 oraz HSP70 [147].

HSC70 ma właściwości immunofilne i tworzy trwały kompleks z immuno-supresyjnym związkiem 15-deokyspergualiną (DSG) [148]. Ponieważ w warunkach stresu DSG hamuje translokację białek HSC70 i HSP70 do jądra komórkowego, sądzi się, że immunosupresyjne działanie DSG może wynikać częściowo z blokowania opiekuńczych funkcji niektórych białek stresu [149].

### V-3. Gen *grp78*

U człowieka [15], myszy [37] i szczura [30] gen *grp78* jest genem unikalnym, zawiera 7 intronów i koduje syntezowane konstytutywnie białko siateczki śródplazmatycznej wiążące wapń. Białko GRP78 syntezowane jest jako cząsteczka prekursorowa zawierająca na końcu N peptyd adresowy o długości 16-18 aminokwasów warunkujący transport cząsteczki do światła ER; peptyd ten jest odszczepiany podczas przechodzenia białka przez błonę retikulum. Koniec karboksylowy białka zawiera sygnał retencji — sekwencję KDEL odpowiedzialną za zatrzymywanie cząsteczki GRP78 wewnątrz ER. Ekspresja genu *grp78* nie zmienia się pod wpływem hipertermii, wzrasta zaś pod wpływem takich stresorów jak głód glukozowy, inhibitory glikozylacji białek, uwalnianie jonów wapnia z ER przez jonofory wapniowe, stan niedotlenienia, obniżenie pH i inne. Podstawowe właściwości białka GRP78 i wzór ekspresji genu zostały podsumowane we wcześniejszych pracach przeglądowych [150, 151]; poniżej zostaną podane jedynie najistotniejsze, nowsze dane.

Białko GRP78 zostało pierwotnie opisane jako BiP (ang. *immunoglobulin heavy chain binding protein*) — białko tworzące przejściowy kompleks z ciężkim łańcuchem immunoglobulin, rozpadający się po przyłączeniu łańcucha lekkiego [30] i zostało uznane za główne białko opiekuńcze ER [151]. Obecnie dane doświadczalne wskazują, że BiP zaangażowany jest w procesie kształtowania prawidłowej struktury białek sekrecyjnych (osłania reaktywne domeny, ułatwia przyjęcie wyższej konformacji i oligomeryzację podjednostek), w procesie zapobiegania sekrecji białek o nieprawidłowej strukturze oraz w translokacji białek przez błony organelli. Ukształtowanie się prawidłowej



**Ryc. 3.** A. Struktura promotora genu *grp78* (cytowania w tekście). Sp1 i CRE\* oznaczają odpowiednio sekwencję DNA rozpoznawaną przez czynnik transkrypcji Sp1 i sekwencję DNA podobną do rozpoznawanej przez czynnik transkrypcji CREB. C1-C5 oznaczają sekwencje typu CAAT (ang. *CAAT-like*), strzałki oznaczają ich orientację. Pogrubioną linią oznaczono położenie sekwencji bogatych w pary GC. *grp core* i 78 C1 oznaczają konserwatywne ewolucyjnie elementy promotora *grp78* (szczegóły w tekście). SICR (ang. *stress induced change region*) — fragment promotora o kluczowym znaczeniu dla indukowanej ekspresji genu. B. Sekwencja DNA regionu SICR. Ramką objęto sekwencję, w obszarze której wiązane są czynniki transkrypcji YY1 (uniwersalny ludzki czynnik transkrypcji) oraz YB-1 i dbpA (białka typu Y-box/CSD, ang. *cold shock domain*). C. Sekwencja DNA regionu 78 C1 z zaznaczeniem miejsc wiążących czynniki transkrypcji CBP (ang. *CAAT binding protein*) i YY1.

struktury białek sekrecyjnych tylko częściowo zależy od oddziaływań z GRP78. Np. po translokacji z cytoplazmy do ER rozfałdowane polipeptydy łańcuchów ciężkich immunoglobulin tworzą kompleks z GRP78, ale dysocjują z kompleksu przed zakończeniem procesu formowania się ich ostatecznej struktury [152].

Nie wszystkie białka sekrecyjne wymagają udziału GRP78 w procesie dojrzewania, jak również GRP78 nie jest jedynym białkiem opiekuńczym ER [153]. Wydaje się, że GRP78 wspólnie z GRP95, kalretikulina, kalneksyna i innymi, niezdefiniowanymi jeszcze białkami tworzy sieć (macierz) białek opiekuńczych współuczestniczących w kontrolowaniu struktury i sekrecji białek z ER [154, 155]. W niektórych typach komórek, np. w niedojrzałych limfocytach T, system retencji białek retikularnych jest odmienny od systemu funkcjonującego w komórkach zróżnicowanych, co sprawia, że wiele białek ER, w tym GRP78, wykrywa się na powierzchni komórki [156].

Cząsteczki białek, które nie zostały prawidłowo ukształtowane tworzą stabilny kompleks z GRP78 i są kierowane na drogę proteolizy. Mechanizm degradacji tych białek nie jest w pełni poznany. Według nowszych danych w degradacji białek ER uczestniczą proteasomy [4], a białka ER przeznaczone do degradacji transportowane są z ER do cytoplazmy (przegląd w: [157]).

Znaczny postęp osiągnięto w charakteryzowaniu struktury promotora i mechanizmu zarówno konstytutywnej jak i indukowanej ekspresji genu *grp78*. Promotor szczurzego genu *grp78* zawiera dwie sekwencje potencjalnie rozpoznawane przez czynnik transkrypcji Sp1, sekwencję zbliżoną do CRE (ang. *cAMP responsive element*) oraz 5 tzw. sekwencji C (ang. *CAAT-like*). Fragment promotora obejmujący sek-

wencje C5 i C4 określany jest jako fragment rdzeniowy (ang. „*grp core*”) bowiem występuje powszechnie w promotorach genów *grp* (od drożdży po ssaki). Dystalna część tego regionu warunkuje konstytutywną ekspresję genu [158, 159]. Proksymalne sekwencje regionu „*grp core*” tzw. SICR (ang. *stress induced change region*), warunkują aktywację genu w warunkach stresu, gdy zwiększa się ilość nieprawidłowych białek wewnątrz ER. Centralna 12-nukleotydowa sekwencja tego regionu różni się jedynie w jednej pozycji od sekwencji występującej w promotorze rybosomalnego genu rpl30, wiążącej czynnik transkrypcji YY1. Wykazano, że w warunkach stresu ludzki czynnik YY1 oddziałuje z obydwoma niciami DNA w regionie SICR i aktywuje transkrypcję genu *grp78* [159, 160]. Represorami genu *grp78* są natomiast białka typu Y-box (ang. *Y-box protein*) — dbpA i dbpB (YB-1). Łączą się one z dolną nicią DNA w regionie SICR uniemożliwiając przyłączenie się czynnika YY1 i powodują zahamowanie transkrypcji [16].

Z sekwencją C1 oddziałują białka CBP (ang. *CAAT binding proteins*) oraz YY1 a siła wiązania białka CBP znacznie wzrasta pod wpływem obniżenia stężenia wapnia w komórce [162, 163]. Silne związanie białka CBP z sekwencją C1 umożliwia wydajny kontakt czynników transkrypcyjnych zajmujących bardziej odległe pozycje z kompleksem czynników inicjacyjnych związanych z sekwencją TATA [162].

Silne pobudzenie aktywności genu *grp78* w warunkach niedoboru wapnia, tlenu i w obniżonym pH powoduje, że gen ten ulega silnej ekspresji w litych guzach nowotworowych [164]. Obserwacja ta stała się bodźcem do konstruowania wektorów, zawierających element SICR promotora genu *grp78*, potencjalnie przydatnych w terapii genowej nowotworów [165].

#### V-4. Gen *pbp74/mot1(2)/mthsp75*

W ostatnich latach opublikowano kilka prac opisujących pod różnymi nazwami prawdopodobnie ten sam, pojedynczy gen, kodujący białko GRP75. Białko to zostało pierwotnie wykryte w matriks mitochondriów i przypisuje mu się funkcje opiekuńcze w stosunku do białek importowanych lub syntezowanych w tej organelli [166].

W przypadku człowieka z biblioteki cDNA z komórek HeLa wyizolowano gen nazwany *MtHSP75* [23] a z biblioteki cDNA z komórek białaczki limfoblastycznej wywodzącej się z komórek B wyizolowano gen nazwany *PBP74* [22]. Geny te mają identyczną sekwencję nukleotydową w regionie kodującym, a także w nieulegających translacji regionach 5' i 3' UTR. Mimo to, białko *MtHSP75* wykrywa się immunohistochemicznie w komórkach HeLa wyłącznie w mitochondrium [23], natomiast białko *PBP74* (ang. *peptide binding protein*) wewnątrz pęcherzyków endosomalnych i na powierzchni limfocytów B i makrofagów, lecz nie w mitochondriach [22].

W przypadku myszy, z różnych bibliotek cDNA wyizolowano cztery niemal identyczne sekwencje. Są to — gen nazwany *CSA* (ang. *C3H strain specific antigen*) pochodzący z biblioteki cDNA z nerki [167], gen *pbp74* (odpowiednik ludzkiego genu *PBP74*) z biblioteki cDNA z komórek białaczki [22], gen nazwany *mot-1* (mortalina-1) z biblioteki cDNA z fibroblastów embrionalnych (szczep myszy CD1-ICR) [39] i gen nazwany *mot-2* (mortalina-2) z biblioteki cDNA z komórek NIH 3T3 [168]. Geny *mot-1* i *mot-2* zmapowano następnie w różnych *loci*; niektóre szczepy myszy posiadają obydwa geny *mot* (CD1-ICR, Balb/c), zaś inne tylko *mot-2* (Swiss, C57BL/6) lub tylko *mot-1* (C3H, He). Gen *mot-2* koduje białko p66<sup>mot-2</sup> o dwóch aminokwasach zmienionych w stosunku do białka p66<sup>mot-1</sup>: V618M i R624G. Podobnie jak u człowieka, wymienione mysie geny mają niemal identyczną sekwencję nukleotydową regionu kodującego (np. gen *pbp74* różni się od genu *mot-1* dwoma spośród 2156 nukleotydów) i regionów 5' i 3' UTR. Dane co do wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek nie są zgodne; białko wykrywano immunohistochemicznie w cytosolu (p66<sup>mot-1</sup> równomiernie rozproszone w cytoplazmie; p66<sup>mot-2</sup> skoncentrowane w przestrzeni okołojądrowej), w mitochondrium (*CSA*) bądź w pęcherzykach endosomalnych (*PBP74*).

Geny, których cechy strukturalne wskazują, że kodują białko GRP75 wyizolowano także z biblioteki cDNA szczura (gen *grp75/mthsp75* [32]). Sekwencja aminokwasowa mysiego białka *pbp74* (*mot-1/2*) i szurzego białka GRP 75 różni się jedynie w sześciu pozycjach, prawdopodobnie zatem są to różnice międzygatunkowe. Na poziomie sekwencji nukleotydowej podobieństwo cDNA genów: *grp75* chomika, *pbp74* myszy, *pbp74* człowieka oraz mysich genów *mot1/2* wynosi ponad 98%, przy czym większość zmian

ma charakter konserwatywny (ang. *conservative replacements*). Nie ma na razie danych czy u innych gatunków mogą — tak jak w przypadku niektórych szczepów myszy — występować dwa geny *grp75/mot*.

Prawdopodobnie wszystkie wymienione geny mają 16 intronów [167, 169], nie są aktywowane pod wpływem hipertermii, natomiast ich ekspresja wzrasta pod wpływem jonoforów wapniowych.

Białka kodowane przez wymienione geny *grp75/mot/pbp74/CSA/mthsp75* syntezowane są jako cząsteczki prekursorowe, z ich końca N odszczepiany jest 46 aa peptyd adresowy. Obecność peptydu adresowego warunkuje transport białka do wnętrza mitochondrium, co wskazuje, że najprawdopodobniej wymienione geny kodują białko tożsame z GRP75. Wykrywanie tego białka poza mitochondrium może być artefaktem, bądź — co jest bardziej prawdopodobne — może odzwierciedlać zależne od nieznanych jeszcze czynników, wewnątrzkomórkowe przemieszczanie się białka. Prawdopodobnie białko to, w zależności od typu komórek, może pełnić odmienne funkcje. Sądzi się m.in., że *in vivo*, w komórkach prezentujących antygen białka *PBP74* biorą udział w przygotowywaniu antygenicznych peptydów do prezentacji w kontekście białek MHC II lub i opiekują się białkami MHC II [136].

Na modelu mysich fibroblastów wykazano, że białko p66<sup>mot-1</sup> ma właściwości antyproliferacyjne. Białko to występuje w cytoplazmie, a jego stężenie wzrasta w starzejących się komórkach. Mikroiniekcja przeciwciała przeciwko białku p66<sup>mot-1</sup> do starzejących się fibroblastów linii NZB powoduje przejściową aktywację proliferacyjną komórek, natomiast transfekcja cDNA *mot-1* do unieśmiertnionych linii komórkowych, np. NIH3T3 przyspiesza starzenie się i obumieranie komórek [168]. Fuzja komórki unieśmiertnionej z pierwotną również wykazuje dominujący charakter fenotypu antyproliferacyjnego. Prawdopodobnie istnieje także korelacja pomiędzy częstością przekształcania się komórek mysich w linie nieśmiertelne a genotypem [*mot-1* (+) *versus mot-1* (-)] szczepu, z którego komórki te pochodzą [169].

Antyproliferacyjne właściwości białka p66<sup>mot-1</sup> potwierdza także wynik analizy stężenia tego białka i jego mRNA w narządach szczura. Białko p66<sup>mot-1</sup> wykrywa się we wszystkich badanych narządach, jednak jego poziom jest znacznie wyższy w komórkach o ograniczonej proliferacji (mózg, serce, mięśnie szkieletowe). Przeciwnie, zwiększona ekspresja mortaliny, połączona z lokalizacją okołojądrową białka (ekspresja genu *mot-2* lub alternatywne składanie mRNA genu *mot-1*) związana jest z nasileniem proliferacji komórek. Taki wzór ekspresji mortaliny obserwuje się m.in. w nowotworach mózgu [170]. Ze względu na lokalizację ludzkiego genu mortaliny/*grp75* na chromosomie 5, w regionie 5q31.1, który często ulega delecji w białkach szpikowych sądzi się, że może to być potencjalny gen supresorowy [170].

## V-5. Gen *hst70/hsp70.2/HSPA2*

Gen *hst70* szczura [29] i jego mysz odpowiednik gen *hsp70.2* [36] zostały pierwotnie scharakteryzowane jako geny swoiste dla spermatogenezy, bowiem ich transkrypty wykrywano wyłącznie w jądrach dojrziałych płciowo gryzoni [36, 171, 172]. Transkrypcja tych genów rozpoczyna się w spermatocytach osiągając maksimum w stadium pachytenu [172]. Transkrypty genów *hst70/hsp70.2* są obecne także w spermatydach, nie wiadomo jednak czy geny te są aktywne w komórkach postmejotycznych. Geny *hst70* i *hsp70.2* kodują niemal identyczne białko (99% podobieństwa sekwencji aa) nazywane odpowiednio rP70 [174] i P70 [174]. Funkcja białka nie jest dokładnie poznana wiadomo jednak, że jest ono niezbędne w procesie spermatogenezy, ponieważ samce myszy pozbawione genu *hsp70.2* (ang. *knock-out*) są nieplodne [175]. Kompleks synaptonemalny u samców *hsp70.2*<sup>-/-</sup> rozwija się prawidłowo do późnych stadiów pachytenu, następnie ulega jednak fragmentacji. Ponieważ białko P70 wykryto w asocjacji z kompleksem synaptonemalnym być może jest ono niezbędne w procesie łączenia się chromosomów homologicznych lub bierze udział w dysocjacji kompleksu synaptonemalnego [176]. Białka P70 nie wykrywa się w kompleksie synaptonemalnym w oocytach a samice *hsp70.2*<sup>-/-</sup> są płodne [175].

Mechanizm regulacji transkrypcji genów *hst70* i *hsp70.2* poznany jest tylko częściowo. Próby zlokalizowania końca 5' jednostki transkrypcji obu genów doprowadziły do różnych wyników, co może wynikać z istnienia co najmniej dwóch silnych miejsc inicjacji transkrypcji oddalonych od siebie o około 260pz [177, 178]. Badania z wykorzystaniem myszy transgenicznymi wykazały, że najistotniejsze elementy regulacyjne „cis” warunkujące wysoce swoistą ekspresję genu *hst70* w jądrach zawarte są w 254 nt. fragmencie DNA zlokalizowanym pomiędzy wymienionymi wyżej miejscami inicjacji transkrypcji [177]. Jednym z czynników transkrypcji genu *hst70/hsp70.2* jest prawdopodobnie białko HSF2 (ang. *heat shock factor 2*). Białko to występuje w spermatocytach w znacznie wyższym stężeniu niż w innych komórkach, a ponadto w spermatocytach znajduje się w postaci aktywnej, związanej z sekwencjami promotora genu *hsp70.2* [179].

Ostatnio wykazano, że ekspresja genów *hsp70.2* i *hst70* nie jest ograniczona do komórek spermatogonicznych. Transkrypty wymienionych genów wykryto w niemal wszystkich badanych narządach szczura i myszy, jednak stopień ekspresji jest co najmniej o 2 rzędy wielkości niższy niż w jądrach. Jedynym narządem, w którym gen *hst70* podlega całkowitej represji jest wątroba [178, 180]. Osobliwością ekspresji genu *hsp70.2* w narządach innych niż jądra jest obecność transkryptów pochodzących z nici niekodującej [181]. W przypadku mózgu obserwowano dodatkowo regionalne zróżnicowanie poziomu transkryptów pochodzących z obu nici [182]; w hipokampie

wykrywano głównie transkrypty nici kodującej (2.7 kz), natomiast w pozostałych obszarach przeważają transkrypty nici niekodującej (2.8 kz). Znaczenie transkrypcji z nici niekodującej genów *hsp70.2/hst70* nie jest znane.

Słabiej niż geny *hst70* i *hsp70.2* scharakteryzowany jest ich ludzki odpowiednik, gen *HSPA2* [13]. Sekwencja aa białka kodowanego przez gen *HSPA2* jest w 98% podobna do sekwencji aa białek P70. Najbardziej istotną strukturalną różnicą pomiędzy genami gryzoni i człowieka jest obecność dodatkowych 6 aminokwasów w pobliżu końca C białka *HSPA2*. Mimo znacznego podobieństwa sekwencji DNA w domniemanym regionie promotora genów *hsp70.2*, *hst70* i *HSPA2* tylko gen ludzki transkrybowany jest wydajnie we wszystkich narządach, zachowując jednak najwyższy poziom ekspresji w jądrach i najniższy w wątrobie. Ponieważ ekspresja genów *hst70/hsp70.2/HSPA2* nie jest ograniczona do komórek spermatogonicznych być może białka kodowane przez te geny pełnią bardziej uniwersalną funkcję.

## V-6. Gen *hsc70t*

Gen *hsc70t* myszy [35] transkrybowany jest we wczesnych spermatydach. Ortologiczne geny człowieka i szczura to odpowiednio: *HSP70-Hom* [11] i *hsp70.3* [27]. U wszystkich trzech gatunków gen ten zlokalizowany jest wewnątrz regionu MHC III głównego kompleksu zgodności tkankowej w sąsiedztwie dwóch indukowalnych genów *hsp70i* (w odwróconej w stosunku do nich orientacji (Ryc. 2)).

Geny *hsc70t*, *HSP70-Hom* i *hst70* zawierają intron o wielkości około 4 kpz. zlokalizowany w niekodującej części 5' jednostki transkrypcji [183, dane niepublikowane]. Sprawia to, że miejsca inicjacji transkrypcji genu *hsc70t* i sąsiedniego genu *hsp70.3* oddalone są jedynie o około 600 pz. (Ryc. 2). Badania mechanizmu regulacji ekspresji genu *hsc70t* są we wstępnej fazie. Dotychczas wykazano, że wewnątrz sekwencji kodującej indukowalnego termicznie genu *hsp70.3* znajdują się sekwencje DNA blokujące ekspresję (ang. „*silencer sequences*”) genu *hsc70t* w komórkach somatycznych [183]. Funkcja białka HSC70T nie jest znana, jest jednak prawdopodobnie ograniczona do procesu spermiogenezy, ponieważ dotychczas nie wykazano istotnej ekspresji genu *hsc70t/hsp70.3/HSP70-Hom* w innych komórkach oprócz wczesnych spermatyd.

## V-7. Inne

Oprócz opisanych wyżej genów, których wzajemne podobieństwo sekwencji nukleotydów wynosi co najmniej 70% do rodziny *hsp70* zaliczane mogą być także geny kodujące białka wykazujące bardziej odległe podobieństwo strukturalne z głównymi białkami *hsp70*.

Gen *stch*. Gen *STCH* człowieka jest genem unikal-

nym i koduje białko występujące prawdopodobnie wewnątrz ER, wykazujące aktywność ATP-azy niezależną od stymulacji peptydem [184]. Białko STCH o masie około 60 kDa, ma na końcu N hydrofobową sekwencję aa o cechach sekwencji sygnałowej. Białko zachowuje jedynie częściowo ogólny plan budowy typowy dla HSP70, nie ma ono bowiem domeny wiążącej peptyd. Domena ATP-azowa ma strukturę typową dla białek HSP70, lecz zawiera heterogenną wstawkę o długości 50 aa. Białko STCH wykazuje odpowiednio 33% i 43% podobieństwa do domeny ATP-azowej białek HSP70 i GRP78. Funkcja białka nie jest znana. Nie są również znane mechanizmy regulujące aktywność ATP-azową białka STCH. Gen *STCH* jest aktywny we wszystkich typach komórek ludzkich przy czym obserwuje się dwa transkrypty (4,4 i 2,4 tys. nt.); ekspresja genu zwiększa się pod wpływem niedoboru wapnia lecz nie pod wpływem hipertermii. Odpowiadające genowi *STCH* geny szczura i myszy nie zostały sklonowane.

Gen *hsp70RY*. cDNA genu *HSP70RY* został sklonowany z ludzkiej linii komórkowej wyprowadzonej z limfocytów B pacjenta z niedoborem leukocytarnych białek przylegania (ang. *leukocyte adhesion molecules deficiency*) transformowanej wirusem Epsteina-Barr (ang. *EBV*) [14]. Na podstawie sekwencji nukleotydowej cDNA przewiduje się, że białko *HSP70RY* składa się z 701 aminokwasów, posiada typową domenę ATP-azową, domenę C-końcową wiążącą peptyd oraz cztery potencjalne miejsca N-glikozylacji. Gen koduje transkrypt o długości 3,0 tys. nt. syntetyzowany konstytutywnie we wszystkich badanych liniach komórek ludzkich [14, 185]. Gen *HSP70RY* człowieka wykazuje jedynie około 33-34% podobieństwa sekwencji nukleotydowej do genów *HSP70*, *HSC70* i *GRP78* [185], wykazuje on natomiast znacznie większe podobieństwo do pewnej grupy sekwencji nukleotydowych znajdujących wewnątrz genów kodujących chemiczne białka *HSP110* [186] oraz *GRP170* [187], mysie białko *HSP105 $\alpha$*  [188] czy receptor spermy z jaja jeżowca [189]. Szczególnie wysokie podobieństwo sekwencji nukleotydowej/amino-kwasowej występuje w obrębie domeny ATP-azowej (prawdopodobnie niefunkcjonalnej) tych białek. Podobieństwo białek *HSP105 $\alpha$*  i *HSP70RY* do receptora spermy z jaja jeżowca wynosi odpowiednio: 72 i 50%. Ponadto, w sekwencji białek *HSP70RY* i receptora spermy z jaja jeżowca obserwuje się drugi region o znacznej homologii, co sugeruje, że białka te należą do odrębnej rodziny białek. Powyższe obserwacje wskazują, że gen *HSP70RY* jest ewolucyjnie bardziej odległy od typowych genów rodziny *hsp70*. Funkcja białka *HSP70RY* nie jest znana.

Gen *HS24/p52*. Gen sklonowano jako cDNA z linii komórkowej *HS24* wyprowadzonej z ludzkiego raka płuc [190]. Prawdopodobnie podobny gen występuje w genomie myszy. Gen koduje białko składające się z 474 aa, przy czym jedynie sekwencja pierwszych 404

aa jest podobna do białek rodziny *HSP70*. Ostatnie 70 aa końca C jest sekwencją unikalną. Gen zawiera co najmniej 5 intronów; ekspresję genu wykryto w wielu liniach komórkowych. Pozostałe właściwości wymienionego genu są słabo scharakteryzowane.

Gen *CBP-140*. Gen sklonowany jako cDNA z komórek F9 raka zarodkowego myszy. Gen koduje białko o wielkości 140 kDa rezydujące w ER i mające właściwość wiązania wapnia. Sekwencja około 200 aa końca N białka wykazuje częściowe podobieństwo (53%) do sekwencji aa końca N ludzkiego białka *HSP70B'* [191].

Prawdopodobnie genów podobnego typu jak wymienione powyżej, a więc wykazujących ogólne niewielkie podobieństwo do głównych genów *hsp70* lub wykazujące podobieństwo jedynie w pewnym fragmencie części kodującej może być więcej. Przypuszczenie takie jest uzasadnione, bowiem w genomach ssaków wykryto wiele regionów zawierających sekwencje DNA o znacznym stopniu podobieństwa do genów *hsp70* [192].

## VI. Uwagi końcowe

Właściwości genów i białek stresu a w szczególności należących do rodziny *hsp70* są przedmiotem coraz bardziej intensywnych badań. Wynika to z coraz pełniejszego rozumienia roli tych białek w kontrolowaniu różnych procesów komórkowych oraz ich funkcji cytoprotekcyjnej. Szczególnie interesujący jest udział niektórych białek *HSP70* w modyfikowaniu odpowiedzi immunologicznej oraz ich prawdopodobny związek z wieloma stanami patologicznymi [88, 193, 194]. Jako białka opiekuńcze, których istotą działania jest tworzenie kompleksów z peptydami substratowymi, stanowią one przedmiot zainteresowania badaczy zajmujących się konstruowaniem szczepionek przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych [195, 196]. Ponadto zdolność niektórych genów rodziny *hsp70* do silnej ekspresji pod wpływem szkodliwych czynników środowiskowych implikuje potencjalne wykorzystanie białek *HSP70* jako biomarkerów skażeń środowiska [197].

## Podziękowania

Niektóre badania własne autorów cytowane w niniejszej pracy przeglądowej były finansowane z grantu KBN 6 P207 06405 p04 oraz grantu Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej — BIMOL 76/9.

Artykuł otrzymano 16 marca 1998 r.

Zaakceptowano do druku 27 kwietnia 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Ashburner M, Bonner JJ (1979) *Cell* 17: 241-253
2. Morimoto RI (1994) *Science* 259: 1409-1410
3. Ananthan J, Goldberg A, Voellmy R (1986) *Science* 232: 522-524

4. Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK (1997) *J Biol Chem* **272**: 9086-9092
5. Wu C (1995) *Ann Rev Cell Dev Biol* **11**: 441-469
6. Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu S, Morange (1992) *Experientia* **48**: 629-634
7. Krawczyk Z (1991) *Post Biochem* **37**: 62-69
8. Günther E, Walter L (1994) *Experientia* **50**: 987-1001
9. Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL (1996) *Cell Stress & Chaperones* **1**: 23-28
10. Wu BJ, Hunt C, Morimoto RI (1985) *Mol Cell Biol* **5**: 330-341
11. Milner CM, Campbell RD (1990) *Immunogenetics* **32**: 242-251
12. Roux AF, Nguyen VTT, Squire JA, Cox DW (1994) *Hum Mol Genet* **3**: 1819-1822
13. Bonnycastle LLC, Yu Ch-E, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, Patterson D, Schellenberg GD (1994) *Genomics* **23**: 85-93
14. Fathallah DM, Cherif D, Dellagi K, Arnaout MA (1993) *J Immunol* **151**: 810-813
15. Ting J, Lee AS (1988) *DNA* **7**: 275-286
16. Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN (1994) *Genomics* **20**: 281-284
17. Voellmy R, Ahmed A, Schiller P, Bromley P, Rungger D (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4949-4953
18. Leung TK, Rajendran M, Monfries C, Hall C, Lim L (1990) *Biochem J* **267**: 125-132
19. Leung TK, Hall C, Rajendran M, Spurr NK, Lim L (1992) *Genomics* **12**: 74-79
20. Dworniczak B, Mirault M-E (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 5181-5197
21. Tavaría M, Gabriele T, Anderson RL, Mirault ME, Baker E, Sutherland G, Kola I (1995) *Genomics* **29**: 266-268
22. Domanico SZ, DeNagel DC, Dahlseid JN, Greene AE, Mullivor RA (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 3598-3610
23. Bhattacharaya T, Karnezis AN, Murphy SP, Hoang T, Freeman BC, Philips B, Morimoto RI (1994) *J Biol Chem* **269**: 1705-1710
24. Bordsky G, Otterson GA, Parry BB, Hart I, Patterson D, Kaye FJ (1995) *Genomics* **30**: 627-628
25. Lisowska K, Krawczyk Z, Widlak W, Wolniczek P, Wisniewski J (1994) *Biochim Biophys Acta* **1219**: 64-72
26. Longo FM, Wang S, Narasimhan P, Zhang JS, Chen J, Massa SM, Sharp FR (1993) *J Neurosci Res* **36**: 325-335
27. Walter L, Rauh F, Günther E (1994) *Immunogenetics* **40**: 325-330
28. Mestrlil R, Chi S-H, Sayen MR, Dillman WH (1994) *Biochem J* **298**: 561-569
29. Wisniewski J, Kordula T, Krawczyk Z (1990) *Biochim Biophys Acta* **1048**: 93-99
30. Munro S, Pelham HRB (1986) *Cell* **46**: 291-300
31. Sorger PK, Pelham HRB (1987) *EMBO J* **6**: 993-998
32. Massa SM, Longo FM, Zuo J, Wang S, Chen J, Sharp FR (1995) *J Neurosci Res* **40**: 807-819
33. Hunt C, Calderwood S (1990) *Gene* **8**: 199-204
34. Perry MD, Aujame L, Shtang S, Moran LA (1994) *Gene* **146**: 273-278
35. Matsumoto M, Fujimoto H (1990) *Biochim Biophys Res Comm* **166**: 43-49
36. Zakeri ZF, Wolgemuth DJ, Hunt CR (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 2925-2932
37. Haas IG, Meo T (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2250-2254
38. Giebel LB, Dworniczak BP, Bautz EK F (1988) *Dev Biol* **125**: 200-207
39. Wadhwa R, Kaul SC, Ikawa Y, Sugimoto Y (1993) *J Biol Chem* **268**: 6615-6621
40. Hartl FU (1996) *Nature (Lond)* **381**: 571-580
41. Rassow J, von Ahlsen O, Bomer U, Pfanner N (1997) *Trends Cell Biol* **7**: 129-133
42. Guptha RS, Golding GB (1993) *J Mol Evol* **37**: 573-582
43. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA (1993) *J Mol Evol* **38**: 1-17
44. Guptha RS, Aitken K, Falah M, Singh B (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2895-2899
45. Viale AM, Arakaki AK (1994) *FEBS Letters* **341**: 146-151
46. Ungewickell E (1985) *EMBO J* **4**: 3385-3391
47. Chappell TG, Welch WJ, Schlossman DM, Palter KB, Schlesinger MJ, Rothman JE (1986) *Cell* **45**: 3-13.
48. Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB (1990) *Nature (Lond)* **346**: 623-628
49. Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5041-5045
50. Holmes KC, Sander C, Valencia A (1993) *Trends Cell Biol* **3**: 53-59
51. Wang T-F, Chang J, Wang C (1993) *J Biol Chem* **268**: 26049-26051
52. Rippmann F, Taylor WR, Rothbard JB, Green NM (1991) *EMBO J* **10**: 1053-1059
53. Morshauer RC, Wang H, Flynn GC, Zuiderweg ERP (1995) *Biochemistry* **34**: 6261-6266
54. Freeman BC, Myers MP, Schumacher R, Morimoto RI (1995) *EMBO J* **14**: 2281-2295
55. Miernyk JA (1997) *Trends Plant Sci* **2**: 180-187
56. Szabo A, Langer T, Schröder H, Flanagan J, Bakau B, Hartl F-U (1994) *Proc. Natl Acad Sci USA* **91**: 10345-10349
57. Höhfeld J, Minami Y, Hartl F-U (1995) *Cell* **83**: 589-598
58. Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG (1993) *Mol Biol Cell* **4**: 555-563
59. Bolliger L, Deloche O, Glick BS, Georgopoulos C, Jenou P, Kronidou N, Horst M, Morishima N, Seltz G (1994) *EMBO J* **13**: 1998-2006
60. Höhfeld J, Jentsch S (1997) *EMBO J* **16**: 6209-6216
61. Ziegelhoffer T, Johnson JL, Craig EA (1996) *Current Biology* **6**: 272-275
62. Frydman J, Höhfeld J (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 87-92
63. Leung S-M, Hightower LE (1997) *J Biol Chem* **272**: 2607-2614
64. Hightower LE, Hendershot LM (1997) *Cell Stress Chaperones* **2**: 1-11
65. Rassow J, Voos J, Pfanner N (1995) *Trends Cell Biol* **5**: 207-212
66. Schiaffonati L, Bardella L, Cairo G, Rappocciolo E, Tacchini L, Bernelli-Zazzera A (1987) *Tumori* **73**: 559-563
67. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C (1992) *Int J Cancer* **51**: 613-619
68. Gorzowski JJ, Eckerley CA, Halgren RG, Mangurten AB (1995) *J Biol Chem* **270**: 26940-26949
69. Locke M, Noble EG, Atkinson BG (1991) *Am J Physiol* **261**: C774-C779
70. Beck SC, Paidas C, Mooney ML, Deitch EA, De Maio A (1995) *Shock* **3**: 398-402
71. Wong GC, Bonakdar M, Kleinman MT, Bhalla DK (1994) *Inhal Toxicol* **6**: 501-514
72. Tytell M, Barbe MF, Brown IR (1994) *J Neurosci Res* **38**: 19-31
73. Flanagan SW, Ryan AJ, Gisolfi CV, Moseley PL (1995) *Am J Physiol* **168**: 28-32
74. Melkonyan HS, Ushakova TE, Umansky SR (1994) *Int J Radiat Biol* **68**: 277-280
75. Blake MJ, Udelsman R, Feuler GJ, Norton DD, Holbrook NJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9873-9877
76. Udelsman R, Blake RJ, Stagg CA, Li DG, Putney DJ, Holbrook NJ (1993) *J Clin Invest* **91**: 465-473
77. Fukudo S, Abe K, Hongo M, Utsumi A, Itoyama Y (1995) *Brain Res* **675**: 98-102
78. Shimizu N, Komoto M, Ueta Y, Konishi T, Abe T, Gotoh S, Suzuki K, Nakamura T, Higashi K (1997) *Biochim Biophys Res Com* **233**: 550-554
79. Li Y, Chopp M, Yoshida, Levine SR (1995) *Acta Neuropathol Berl* **84**: 94-99
80. Welch WJ (1990) *W: Stress Proteins in Biology and Medicine*. Ed. RI Morimoto, A Tissieres, C Georgopoulos. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 223-278
81. Trautinger FT, Trautinger I, Kindas-Mugge I, Metzke D, Luger TA (1993) *J Invest Dermatol* **101**: 334-338
82. Bonay M, Soler P, Riquet M, Battesti JP, Hance



- A.J. Tazi A (1994) *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**: 453-461
83. Li D, Gordon CB, Stagg CA, Udelsman R (1996) *Shock* **5**: 320-323
84. Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet JG, Soussi T, Polla BS (1994) *Eur J Cancer* **30A**: 1884-1891
85. Nanbu K, Konishi I, Komatsu T, Mandai M, Yamamoto S, Kuroda H, Koshijama M, Mori T (1996) *Cancer* **77**: 330-338
86. Conroy SE, Latchman DS (1996) *Br J Cancer* **74**: 717-721
87. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Miller F, Meier T, Wilmanns W, Issels RG (1995) *Int J Cancer* **61**: 272-279
88. Multhoff G, Hightower LE (1996) *Cell Stress Chaperones* (1996) **1**: 167-176
89. Welch WJ, Feramisco JR (1984) *J Biol Chem* **259**: 4501-4510
90. Lewis MJ, Pelham HRB (1985) *EMBO J* **4**: 3137-3143
91. Thompson EM, Christians E, Stinnakre M-G, Renard J-P (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 4694-4703.
92. Mathur SK, Sistonen L, Brown IR, Murphy SP, Sarge KD, Morimoto RI (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8695-8699
93. Davidson S, Hoj P, Gabriele T, Anderson RL (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 1071-1078
94. Nagai N, Nakai A, Nagata K (1995) *Biochim Biophys Res Commun* **208**: 1099-1105
95. Agoff SN, Hou J, Linzer DI, Wu B (1993) *Science* **259**: 84-87
96. Li GC, Yang S-H, Kim D, Nussenzweig A, Ouyang H, Wei J, Burgman P, Li L (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4512-4516
97. Tsutsumi-Ishii Y, Tadokoro K, Hanaoka F, Tsuchida N (1995) *Cell Growth Differ* **6**: 1-8
98. Kamano H, Burk B, Noben-Trauth K, Klempnauer KH (1997) *Oncogene* **11**: 2575-2582
99. Jäättelä M, Wissing D (1993) *J Exp Med* **177**: 231-236
100. Williams RS, Thomas JA, Fina M, German Z, Benjamin IJ (1993) *J Clin Invest* **92**: 503-508
101. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jäättelä M, Schwartz T (1995) *J Clin Invest* **95**: 926-933
102. Li GC, Li L, Liu RY, Rehman M, Lee WFM (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2036-2040
103. Heads RJ, Latchman DS, Jellon DM (1994) *J Mol Cell Cardiol* **26**: 695-699
104. Sato K, Saito H, Matsuki N (1996) *Brain Res* **740**: 117-123
105. Siutz G, Karlseder J, Tempfer C, Orel L, Holzer G, Simon MM (1996) *Br J Cancer* **74**: 172-177
106. Marber MS, Mestrlil R, Chi S-H, Sayen R, Yellon DM, Dillmann WH (1995) *J Clin Invest* **95**: 1446-1456
107. Hutter JJ, Mestrlil R, Tam EK W, Sievers RE, Dillmann WH, Wolfe CL (1996) *Circulation* **94**: 1408-1411
108. Samali A, Cotter TG (1996) *Exp Cell Res* **223**: 163-170
109. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin Vi, Sherman MY (1997) *J Biol Chem* **272**: 18033-18037
110. Karlseder J, Wissing D, Holzer G, Orel L, Sliutz G, Auer H, Jäättelä M, Simon MM (1996) *Biochim Biophys Res Commun* **220**: 153-159
111. Jäättelä M (1995) *Int J Cancer* **60**: 689-693
112. Liu J, Maxwell ES (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 6565-6571
113. Barbhaiya H, Leverette RD, Liu J, Maxwell ES (1994) *Eur J Biochem* **226**: 765-765
114. Aquino DA, Klipfel AA, Brosnan CF, Norton WT (1993) *J Neurochem* **61**: 1340-1348
115. Krawczyk Z, Wiśniewski J, Mackiewicz M, Biesiada E, Choraży M (1989) *Biochim Biophys Acta* **1009**: 237-243
116. Tabibzadeh S, Kong QF, Satyaswaroop PG, Babaknia A (1996) *Hum Repord* **11**: 633-640
117. Loones MT, Rallu M, Mezger V, Morange M (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**: 179-190
118. Benaroudj N, Batelier G, Triniolles F, Ladjimi M (1995) *Biochemistry* **34**: 15282-15290
119. Gao B, Eisenberg E, Greene L (1996) *J Biol Chem* **271**: 16792-16797
120. Brown CR, Martin RL, Hansen WJ, Beckmann RP, Welch WJ (1993) *J Cell Biol* **120**: 1101-1112
121. Lamian V, Small GM, Feldherr CM (1996) *Exp Cell Res* **228**: 84-91
122. Andoh H, Itoh H, Tashima Y, Koyama K (1994) *Int Hepat Comm* **2**: 191-196
123. Manzerra P, Brown IR (1966) *Exp Cell Res* **229**: 35-47
124. Abe T, Konishi T, Hirano T, Kasai H, Shimizu Z, Kashimura M, Higashi K (1995) *Biochim Biophys Res Commun* **206**: 548-55
125. Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF (1997) *J Cell Biol* **137**: 825-834
126. Cuervo AM, Dice JF, Knecht E (1997) *J Biol Chem* **272**: 5606-5615
127. Tamura Y, Tsuboi N, Sato N, Kikuchi K (1993) *J Immunol* **151**: 5516-5524
128. Takashima S, Sato N, Kishi A, Tamura Y, Hirai I, Torigoe E, Yagihashi A, Takahashi S, Sagae S, Kudo R, Kikuchi K (1996) *J Immunol* **157**: 3391-3395
129. Terlecky SR (1994) *Experientia* **50**: 1021-1025
130. Imamoto Y, Matsuoka Y, Kurihara T, Kohno K, Miyagi M, Sakiyama F, Okada Y, Tsunasawa S, Yoneda Y (1992) *J Cell Biol* **119**: 1047-1061
131. Shi T, Thomas JO (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 2186-2192
132. Terada K, Ohtsuka K, Imamoto N, Yoneda Y, Mori M (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 3708-3713
133. Zimmerman R, Sagstetter M, Lewis M, Pelham HRB (1988) *EMBO J* **7**: 2875-2880
134. Zhou M, Wu X, Huang L-S, Ginsberg HN (1995) *Biol Chem* **270**: 25220-25224
135. Schirmbeck R, Reimann J (1994) *Eur J Immunol* **24**: 1478-1486
136. Pierce SK (1994) *Experientia* **50**: 1026-1030
137. Fourie AM, Sambrook JF, Gething MJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 30470-30478
138. Takenaka IM, Leung SM, McAndrews SJ, Brown JP, Hightower LE (1995) *J Biol Chem* **270**: 19839-19844
139. Baler R, Zou J, Voellmy R (1996) *Cell Stress Chaperones* **1**: 33-39
140. Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A, Oren M (1986) *Nature* (Lond) **320**: 182-185
141. Iwaya K, Tsuda H, Fujita S, Suzuki M, Hirohashi S (1995) *Lab Invest* **72**: 707-714
142. Fourie AM, Hupp R, Lane DP, Sang BC, Barbosa MS, Sambrook JF, Gething MJ (1997) *J Biol Chem* **272**: 19471-19479
143. Inoue A, Torigoe T, Sogahata K, Kamiguchi K, Takahashi S, Sawada Y, Saijo M, Taya Y, Ishii S i wsp. (1995) *J Biol Chem* **270**: 22571-22576
144. Liao J, Lowther LA, Ghorri N, Omary MB (1995) *J Biol Chem* **270**: 915-922
145. Liang P, MacRae TH (1997) *J Cell Sci* **110**: 1431-1440
146. Auger I, Escola JM, Gorvel JP, Roudier J (1996) *Nature Med* **3**: 306-310
147. Nöbner E, Goldberg JE, Naftzager C, Lyu S-H, Clayberger C, Crensky AM (1996) *J Exp Med* **183**: 339-348
148. Nadler SG, Tepper MA, Chacter B, Mazzucco CE (1992) *Science* **258**: 484-486
149. Nadler SG, Eversole AC, Tepper MA, Cleveland JS (1995) *Ther Drug Monit* **17**: 700-703
150. Krawczyk Z (1991) *Post Biochem* **37**: 70-75
151. Haas IG (1994) *Experientia* **50**: 1012-1020
152. Hendershot L, Wei J, Gaut J, Melnick J, Aviel S, Argon Y (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5269-5274
153. Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ (1997) *J Biol Chem* **272**: 4327-4334
154. Tatu U, Helenius A (1997) *J Cell Biol* **136**: 555-565
155. Kuznieciov G, Chen LB, Nigam SK (1997) *J Biol Chem* **272**: 3057-3063
156. Wiest DL, Bhandoola A, Punt J, Kreibich G, McKean D, Singer A (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:

- 1884-1889
157. Brodsky JL, McCracken AA (1997) *Trends Cell Biol* **7**: 151-156
158. Alexandre S, Nakaki T, Vanhamme L, Lee AS (1991) *Mol Endocrinol* **5**: 1862-1872
159. Li W W, Sistonen L, Morimoto RI, Lee AS (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 5533-5546
160. Li W W, Hsiung Y, Wong V, Galvin K, Zhou Y, Shi Y, Lee AS (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 61-68
161. Li W W, Hsiung Y, Zhou Y, Roy B, Lee AS (1977) *Mol Cell Biol* **17**: 54-60
162. Roy B, Lee AS (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2263-2274
163. Roy B, Li W W, Lee AS (1996) *J Biol Chem* **271**: 28995-29002
164. Cai J W, Henderson B W, Shen J W, Subject JR (1993) *J Cell Physiol* **154**: 229-237
165. Gazit G, Kane S E, Nichols P, Lee AS (1995) *Cancer Res* **55**: 1660-1663
166. Mizzen L A, Kabling A K, Welch W J (1991) *Cell Regul* **2**: 165-173
167. Michikawa Y, Baba T, Arai Y, Sakakura T, Tanaka M, Kusakabe M (1993) *Biochim Biophys Res Comm* **196**: 223-232
168. Wadhwa R, Kaul S C, Sugimoto Y, Mitsui Y (1993) *J Biol Chem* **268**: 22239-22242
169. Wadhwa R, Akiyama S, Sugihara T, Reddel R, Mitsui Y, Kaul S C (1996) *Exp Cell Res* **226**: 381-386
170. Kaul S C, Matsui M, Takano S, Mitsui Y, Wadhwa R (1997) *Exp Cell Res* **232**: 56-63
171. Krawczyk Z, Szymik N, Wisniewski J (1987) *Mol Biol Rep* **12**: 35-41
172. Krawczyk Z, Mali P, Parvinen M (1988) *J Cell Biol* **107**: 1317-1323
173. Raab L S, Polakoski K L, Hancock L W, Hamilton D W (1994) *Mol Reprod Develop* **40**: 186-195
174. Allen R L, O'Brien D A, Eddy E M (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 828-832
175. Dix D J, Allen J W, Collins B W, Mori C, Nakamura, Poorman-Allen P, Goulding E H, Eddy E M (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3264-3268
176. Allen J W, Dix D J, Collins B W, Merrick B A, He C, Selkirk J K, Poorman-Allen P, Dresser M E, Eddy E M (1996) *Chromosoma* **104**: 414-421
177. Widlak W, Markkula M, Krawczyk Z, Kananen K, Huhtaniemi I (1995) *Biochim Biophys Acta* **1264**: 191-200
178. Dix D J, Rosario-Herrle M, Gotoh H, Mori C, Goulding E H, Barret C, Eddy E M (1996) *Dev Biol* **174**: 310-321
179. Sarge K D, Park-Sarge O K, Kirby J D, Mayo K E, Morimoto R I (1994) *Biol Reprod* **50**: 1334-1343
180. Scieglińska D, Widlak W, Rusin M, Markkula M, Krawczyk Z (1997) *Cell Biol Int* **21**: w druku
181. Murashov A K, Wolgemuth D J (1996) *Mol Reprod Develop* **43**: 17-24
182. Murashov A K, Wolgemuth D J (1996) *Mol Brain Res* **37**: 85-95
183. Shimokawa T, Fujimoto H (1996) *Biochim Biophys Res Comm* **221**: 843-848
184. Otterson G A, Flynn G C, Kratzke R A, Coxon A, Johnston P G, Kaye F J (1994) *EMBO J* **13**: 281-286
185. Dyer K D, Rosenberg H F (1994) *Biochim Biophys Res Comm* **203**: 577-581
186. Lee-Yoon D, Easton D, Murawski M, Burd R, Subject JR (1995) *J Biol Chem* **270**: 15725-15733
187. Chen X, Easton D, Oh H-J i wsp. (1995) *FEBS Letters* **380**: 68-72
188. Yasuda K, Nakai A, Hatayama T, Nagata K (1995) *Biol Chem* **270**: 29718-29723
189. Mauk R, Jaworski D, Kamei N, Glabe C G (1997) *Dev Biol* **184**: 31-37
190. Schulte A M, Fischer S, Sachse G E, Hafner S, Stelek S, Gasse H G (1997) *DNA Cell Biol* **16**: 257-268
191. Naved A F, Ozawa M, Yu S, Miyauchi T, Muramatsu H, Muramatsu T (1995) *Cell Struct Funct* **20**: 133-141
192. Wiśniewski J, Krawczyk Z (1998) *Mol Biol Rep* **13**: 21-28
193. Favatier F, Bornman L, Hightower L E, Günther E, Polla B S (1997) *Cell Stress Chaperon* **2**: 141-156
194. Jindal S (1996) *TIB Tech* **14**: 17-20
195. Heike M, Noll B, Meyer zum Buschenfelde K-H (1996) *J Leukocyte Biol* **60**: 153-158
196. Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava P K (1997) *Science* **278**: 117-120
197. dePomerai D (1996) *Human Exp Toxicol* **15**: 279-285

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

**Obecny adres:**

**Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
Tel. bezpośredni 658 20 99  
Tel. przez centralę 659 85 71 w. 352  
Fax 822 53 42  
e-mail ptbioch@nencki.gov.pl**

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

# Molekularne podłoże przewlekłej choroby ziarniniakowej

## Molecular basis of chronic granulomatous disease

CEZARY ŻEKANOWSKI<sup>1</sup>,  
HANNA SKOPCZYŃSKA<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Fagocyty i wybuch oddechowy
- II. Molekularne podłoże zabijania bakterii
- III. Regulacja układu oksydazy zależnej od NADPH
- IV. Przewlekła choroba ziarniniakowa powodowana jest uszkodzeniami różnych składników układu oksydazy NADPH
- V. Wpływ aktywności oksydazy NADPH na funkcje fagocytów
- VI. Diagnostyka CGD
- VII. Nadzieje: somatyczna terapia genowa

### Contents:

- I. Phagocytes and respiratory burst
- II. Molecular basis of fagocyte killing activity
- III. Regulation of NADPH oxidase activity
- IV. CGD is caused by defects of various parts of the oxidase
- V. NADPH oxidase and phagocytes functions
- VI. Biochemical and molecular diagnosis of CGD
- VII. Promises: somatic gene therapy

**Wykaz stosowanych skrótów:** CGD — chronic granulomatous disease, przewlekła choroba ziarniniakowa; RFT — reaktywne formy tlenu; p22<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> — błonowe podjednostki cytochromu b<sub>558</sub>; p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p21<sup>rac</sup>, Rac1, Rac2, Rap1A — cytoplazmatyczne składniki kompleksu oksydazy zależnej od NADPH; rhoGDI — GDP (*dissociation inhibitor protein*), czynnik hamujący dysocjację GDP; GAP — (*GTPase activating protein*), białko aktywujące GTPazę; GEF — (*guanine nucleotide exchange factor*), czynnik wymiany nukleotydów guaninowych; LMWG — (*low molecular weight GTP binding protein*), niskocząsteczkowe białko wiążące GTP; GDS — GDP (*dissociation stimulator*), czynnik stymulujący dysocjację GDP; CYBB, CYBA — geny kodujące większą i mniejszą podjednostkę cytochromu b<sub>558</sub>; NCF1, NCF2 — geny kodujące p47<sup>phox</sup> i p67<sup>phox</sup>; NOS — syntaza tlenu azotu; NBT — (*nitro-blue tetrazolium*), błękit tetrazoliowy; PMA — (*phorbol myristate acetate*), tetradekanolooctan forbolu. SH3, SH2 — (*src homology region 3/2*), domena 2/3 homologii src.

### I. Fagocyty i wybuch oddechowy

Pierwszą linię obrony organizmu ludzkiego przed mikroorganizmami stanowią komórki fagocytujące: neutrofile, eozynofile, monocyty i makrofagi. Jak wskazuje ich potoczna nazwa (fagocyty), są one zdolne do pochłaniania i trawienia różnych cząstek. Proces ten jest najbardziej wydajny i specyficzny wobec mikroorganizmów, rozpoznanych przez układ immunologiczny. Cel wyznaczają przeciwciała, oplaszczając obce cząstki, które następnie przy udziale dopełniacza łączą się z receptorami fagocytów. Aby pochłonięte

bakterie nie namnażały się wewnątrz komórek żernych, muszą zostać zabite. Jednym z istotnych elementów tego procesu jest tzw. wybuch oddechowy (ang. *respiratory burst*) podczas, którego powstają reaktywne formy tlenu (RFT) [1].

Badania wybuchu oddechowego doprowadziły do odkrycia molekularnych podstaw przewlekłej choroby ziarniniakowej (ang. *chronic granulomatous disease* — CGD), zwanej też ziarnicą septyczną. Fagocyty chorych na tę stosunkowo rzadką (1:250.000), uwarunkowaną genetycznie chorobę, mają upośledzoną zdolność zabijania patogenów. U podstaw choroby leży uszkodzenie oksydazy zależnej od NADPH (EC 1.6.99.1), enzymu niezbędnego do wytwarzania RFT [2-4].

U chorych z CGD mikroorganizmy, które przetrwały we wnętrzu fagocytów, przedostają się wraz z nimi do układu limfatycznego i zostają przeniesione do odległych miejsc w organizmie. Stąd, w ciągu pierwszych lat życia chorych, obserwuje się stany zapalne szyjnych i pachwinowych węzłów chłonnych. Często są ropnie wątroby, płuc i skóry. Pojawiają się nawracające zapalenia jamy ustnej, dziąseł, płuc, dróg moczowych i przewodu pokarmowego [5, 6]. Tworzenie się zianiniaków może prowadzić do dysfunkcji mechanicznej narządów zawierających światło, a więc układu oddechowego, pokarmowego i moczowego [7].

Zakażenia u chorych z CGD powodują bakterie występujące pospolicie w otoczeniu człowieka: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Nocardia spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.* i *Aerobacter spp.* Najpoważniejsze i często śmiertelne komplikacje powodują infekcje grzybicze płuc, wątroby i kości, wywołane przez *Aspergillus fumigatus* [5, 6]. Wiele z wymienio-

<sup>1</sup> Dr. Zakład Genetyki Instytutu Matki i Dziecka, ul. Kasprzaka 17A, 01-211 Warszawa; e-mail: insmatki@warman.com.pl; <sup>2</sup> lek. med., Klinika Immunologii Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa; e-mail: immuno@czd.waw.pl.

nych mikroorganizmów wykazuje aktywność katalazy, co zmniejsza możliwość ich zabijania, przez wytwarzany przez nie same wewnątrz wakuol fagocytarnych  $H_2O_2$ .

Rokowanie w CGD nie jest dobre. Większość chorych umiera w drugiej lub trzeciej dekadzie życia. Długość życia chorych zwiększyła się po wprowadzeniu w latach 70-tych profilaktyki antybiotykowej zakażeń bakteryjnych, a w następnym dziesięcioleciu profilaktyki przeciwgrzybiczej [5, 8].

## II. Molekularne podłoże zabijania drobnoustrojów przez fagocyty

Oksydaza zależna od NADPH jest wieloskładnikowym enzymem, zlokalizowanym w błonie plazmatycznej fagocytów. Oksydaza uczestniczy w transporcie elektronów poprzez błonę, tworząc po jej zewnętrznej stronie, we wnętrzu fagosomów, anionorodnik ponadtlenkowy:



Mikroorganizmy pochłonięte przez fagocyty zabijane są przez anionorodnik ponadtlenkowy oraz jego pochodne: nadtlenuk wodoru, podchloryn, rodnik hydroksylowy i inne. Nadtlenuk wodoru tworzy się spontanicznie, bądź z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej, w reakcji  $2*O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . Następnie, w reakcji Habera-Weissa  $H_2O_2$  reaguje z  $*O_2^-$  dając rodnik hydroksylowy i jon hydroksylowy. Z większą wydajnością  $OH^*$  powstaje w reakcji Fentona, w obecności jonów  $Fe^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ . Rodnik hydroksylowy jest jednym z najbardziej toksycznych, choć stosunkowo krótkotrwałych, produktów fagocytów.

Zasadniczym, błonowym składnikiem oksydazy jest cytochrom  $b_{558}$ , zdolny do bezpośredniej redukcji tlenu cząsteczkowego. Przenoszeniu elektronów z wewnątrzkomórkowej puli NADPH na cząsteczki tlenu towarzyszy usuwanie protonów, poprzez aktywowany przez arachidonian kanał błonowy. Jego aktywność zapobiega powstawaniu niefizjologicznej różnicy potencjału po obu stronach błony [9].

Cytochrom  $b_{558}$ , składa się z podjednostki mniejszej ( $p22^{phox}$ ) oraz silnie glikozylowanej, większej ( $gp91^{phox}$ ). Podjednostka większa obejmuje dwie charakterystyczne domeny. Jedną z nich jest wysoce hydrofobowy fragment N-końcowy, z pięcioma helikalnymi strukturami transmembranowymi, tworzącymi kanał wewnątrz błonowy [10]. W części cytoplazmatycznej tej domeny znajduje się pięć potencjalnych miejsc glikozylacji [11, 12]. Drugą domenę tworzy część C-końcowa białka, która przykrywa kanał błonowy i tworzy zagłębienie na NADPH oraz FAD. Ta część  $gp91^{phox}$  wykazuje aktywność dehydrogenazy flawinowej. Z FAD elektrony przekazywane są na dwa pierścienie hemowe, ulokowane w odcinku wewnątrz błonowym domeny N-końcowej [13]. Możliwe, że funkcjonuje również alternatywna droga przekazywania elektro-

nów z NADPH na układ hemowy poprzez jedną lub więcej dehydrogenaz zależnych od FAD. Zasadniczy plan budowy C-końcowej części  $gp91^{phox}$  wspólny jest wielu reduktazom ferrodoksyna/NADP [14].

W budowie domeny transmembranowej uczestniczy również część N końca podjednostki  $p22^{phox}$ , zawierająca hydrofobowe struktury helikalne [15].

NADPH wytwarzany jest w zużywającym tlen cyklu pentozowo-fosforanowym, którego aktywność wzrasta znacznie w czasie fagocytozy, powodując zwiększone zapotrzebowanie fagocytów na tlen.

## III. Regulacja układu oksydazy zależnej od NADPH

Regulacja aktywności oksydazy jest wielostopniowa i skomplikowana, co stanowi zabezpieczenie przed przypadkowym uwalnianiem szkodliwych rodników i jonów. Dzięki temu reaktywne formy tlenu powstają w krótki czas po endocytozie, we wnętrzu fagosomów. Stosunkowo niewielkie ilości RFT uwalniane są na zewnątrz fagocytów.

W nie pobudzonych fagocytach oksydaza jest nieaktywna, a jej składniki znajdują się w różnych miejscach komórki. Aktywacja enzymu powodowana jest najczęściej przyłączeniem do błony komórkowej opłaszczzonego przeciwciałami mikroorganizmu. Znane są także specyficzne sygnały wyzwalaające jej aktywność np.: leukotrieny, fragment C5 dopełniacza, estry forbolu, fluorki czy chemotaktyczny peptyd tworzący koniec N niektórych białek bakteryjnych.

Aktywacja fagocytów prowadzi do powstania kompleksu oksydazy i wymaga obecności kilku czynników cytoplazmatycznych (Ryc. 1). Niektóre z nich przyłączają się do cytoplazmatycznych fragmentów cytochromu  $b_{558}$ . Najważniejsze z nich to białka:  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  i  $p40^{phox}$ . Zawierają one charakterystyczne domeny SH3 (*src homology region 3, domena 3 homologii src*), umożliwiające przyłączenie do bogatych w prolinę fragmentów innych polipeptydów (np. do siebie nawzajem oraz  $p22^{phox}$ ). Białka zawierające motywy SH3 i podobne do nich motywy SH2 (domena 2 homologii *src*), uczestniczą w przekazywaniu sygnałów w komórce, „kierując” białka je zawierające do kinaz tyrozynowych [16, 17].

W komórkach z nieaktywną oksydazą białka  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  i  $p40^{phox}$  są ze sobą związane i tworzą w cytoplazmie kompleks o masie 240-300 kD [18]. W czasie aktywacji fagocytów  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  ulegają fosforylacji i wraz z  $p40^{phox}$  transportowane są do odcinka błony komórkowej tworzącego wakuolę fagocytarną. Fosforylacja  $^{378}Ser$  białka  $p47^{phox}$  uwalnia  $p67^{phox}$  oraz odsłania domenę SH3, umożliwiając ich oddziaływanie z podjednostką mniejszą oksydazy.  $p67^{phox}$  pozostaje związane z  $p47^{phox}$  poprzez  $p40^{phox}$ , które z kolei jest zakotwiczone w cytoszkieletu komórki. Białko  $p67^{phox}$  wiąże aktywny czynnik Rac-GTP ( $^{58}Lys$ ), a także przyłącza się do rejonu C-końcowego

podjednostki większej cytochromu  $b_{558}$  [19].

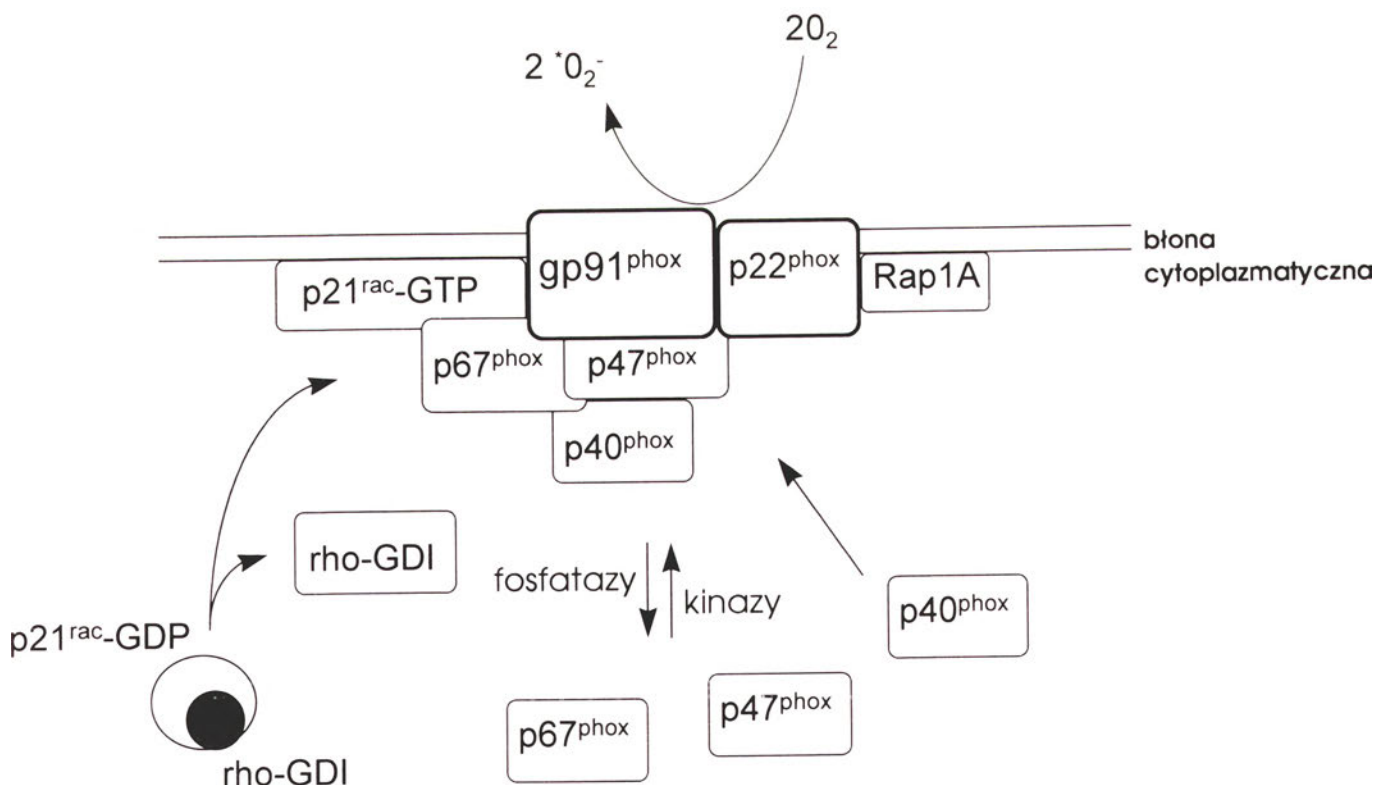
Białka  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  ułatwiają prawdopodobnie transport elektronów do centrum flawinowego i dalej, do pierścieni hemowych [20]. Natomiast  $p40^{phox}$  w układach *in vitro* hamuje aktywność oksydazy, współzawodnicząc z  $p67^{phox}$  o bogatą w proliny sekwencję w obrębie  $p47^{phox}$  [21].

Kolejny składnik układu — białko  $p21^{rac}$  należy do rodziny małych białek wiążących GTP (ang. *low molecular weight GTP binding protein* — LMWG, niskocząsteczkowe białka wiążące GTP). Najbardziej znanymi przedstawicielami tej rodziny są onkogeny *ras*. Inne białka tej grupy uczestniczą w wielu istotnych funkcjach komórkowych: przekazywaniu sygnałów od receptorów błonowych, organizacji cytoszkieletu, w wewnątrzkomórkowym transporcie wakuoli oraz egzocytozie. Charakterystyczną cechą białek LMWG jest aktywność GTPazy oraz powolna, spontaniczna wymiana związanego GDP na GTP. Przyjmuje się, że cykliczne zmiany formy wiążącej GDP w formę wiążącą GTP, stanowią rodzaj „molekularnego przełącznika” wpływającego poprzez zmianę konformacji na aktywność związanych z nimi białek. Większość białek LMWG ulega potranslacyjnym modyfikacjom, istotnym dla poprawnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej.

Badania *in vitro* wskazują, że  $p21^{rac}$  jest niezbędne do

aktywacji oksydazy. Aktywność tego małego białka reguluje z kolei GTP i GDP: pierwszy wyłączając, drugi włączając jego aktywność. Istnieją dwie formy białka  $p21^{rac}$ . Rac1 i Rac2. Pierwsza wiąże się z  $p67^{phox}$ , wpływając na zmianę jego konformacji i być może aktywując specyficzną wobec niego kinazę [22]. Rac1 jest ponadto niezbędny do przemieszczania się zarówno  $p67^{phox}$ , jak  $p47^{phox}$ , *in vivo*. Rac2 łączy się natomiast z  $p47^{phox}$  [23]. W obrębie białka Rac1 zidentyfikowano dwie domeny: efektorową (reszty 26-45), odpowiedzialną za przyłączenie do  $p67^{phox}$  oraz tzw. wstawkę (reszty 124-135), wiążącą białka cytoplazmatyczne, a także cytochrom  $b_{558}$  [24]. Do aktywności zarówno Rac1, jak Rac2, niezbędna jest obecność cytochromu  $b_{558}$  w błonie komórkowej [25]. Na duże znaczenie czynnika Rac wskazuje fakt istnienia przynajmniej jednego przypadku CGD, wywołanej delecją aminokwasu w białku  $p67^{phox}$ , w miejscu wiążącym  $p21^{rac}$  [26].

Przypuszcza się, że w aktywacji oksydazy uczestniczą co najmniej dwie kinazy białkowe, ponieważ zarówno  $p47^{phox}$ , jak  $p67^{phox}$  ulegają fosforylacji. W fosforylacji  $p47^{phox}$  uczestniczy prawdopodobnie kinaza białkowa C. Drugą jest cytoplazmatyczna kinaza aktywowana przez kwas fosfatydowy [27, 28]. Badania *in vitro* wykazały, że do fosforylacji  $p47^{phox}$  konieczna jest obecność w błonie podjednostki mniejszej



Ryc. 1. Zasada aktywacji oksydazy NADPH.

Oksydaza znajduje się w błonie otaczającej wakuole fagocytarne. Część katalityczna cytochromu  $b_{558}$  składa się z dwu podjednostek ( $p22^{phox}$  oraz  $gp91^{phox}$ ) i dokonuje transportu elektronów poprzez błonę. W rezultacie, wewnątrz wakuoli powstaje  $*O_2^-$  i jego pochodne. Gdy oksydaza jest nieaktywna, białka  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  i  $p40^{phox}$  znajdują się w cytoplazmie i są ze sobą połączone za pomocą złącz (domena SH3: region bogaty w proliny). Drugi kompleks cytoplazmatyczny tworzą białka  $p21^{rac}$  (Rac1 i Rac2) oraz rho-GDI. W czasie aktywacji fagocytów rozdzielaniu ulegają białka  $p21^{rac}$  i rho-GDI, czemu towarzyszy wymiana GDP związanego z  $p21^{rac}$  na GTP. Powstaje aktywna forma  $p21^{rac}$ -GTP. Jednocześnie podjednostki  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  są fosforylowane, a następnie wraz z  $p40^{phox}$  i  $p21^{rac}$ -GTP przyłączają się do cytochromu  $b_{558}$  od strony cytoplazmatycznej, tworząc aktywny kompleks oksydazy NADPH. Przejście oksydazy w stan nieaktywny następuje prawdopodobnie w wyniku hydrolizy GTP związanego z  $p21^{rac}$  lub fosforylacji i oddysocjowaniu od oksydazy NADPH białka Rap 1A.

oksydazy, do której przyłącza się jedynie ufosforylowana w pozycji Ser<sup>379</sup> forma p47<sup>phox</sup> [29]. Dopiero wtedy do kompleksu obu białek przyłącza się p67<sup>phox</sup>.

Jedno z miejsc przyłączania czynników cytoplazmatycznych do cząsteczki cytochromu położone jest w obrębie domeny C-końcowej podjednostki p21<sup>rac</sup>. Inne, położone jest w pobliżu miejsca wiązania nukleotydów guaninowych, w podjednostce większej. Aktywacja powoduje najprawdopodobniej taką zmianę konformacji gp91<sup>phox</sup>, że możliwy staje się dostęp NADPH do FAD.

Aktywacji podlega również umiejscowienie w cytoplazmie białko p21<sup>rac</sup>. W formie nieczynnej związane jest z białkiem rhoGDI (ang. *GDP dissociation inhibitor protein rho*, czynnik hamowania dysocjacji GDP), uniemożliwiającym odłączenie GDP od p21<sup>rac</sup>. Oba białka związane są łącznikiem, tworzonym przez lipidowy ogon p21<sup>rac</sup> i hydrofobowy fragment rhoGDI [30]. W rezultacie odłączenia GDI, do miejsca zwolnionego przez cząsteczkę GDP, przyłącza się GTP. Oddysocjonowanie obu białek może być wynikiem oddziaływania lipidów (np. wspomnianych kwasów arachidonowego, fosfatydowego oraz fosfoinozytoli) z hydrofobowym łącznikiem. Kwasy tłuszczowe uwalniane są m.in. z błon cytoplazmatycznych pod działaniem lipazy, w czasie aktywacji granulocytów i trombocytów. Powrót do stanu nieaktywnego, wymaga obecności białka GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factor*, czynnik wymiany nukleotydów guaninowych), i jest przyspieszane przez białko GAP (ang. *GTPase activating protein*, białko aktywujące GTPazę) [31] Ryc. 2).

Z cytochromem b<sub>558</sub> związane jest jeszcze jedno małe białko wiążące GTP: Rap1A. W neutrofilach Rap1A ulega fosforylacji przy udziale kinazy A, zależnej od cAMP. Fosforylacja uniemożliwia oddziaływanie Rap1A z cytochromem i prawdopodobnie prowadzi do deaktywacji oksydazy [32, 33].

Oksydaza NADPH aktywowana jest prawie wyłącznie w błonach wakuol fagocytarnych. Niewiele wi-

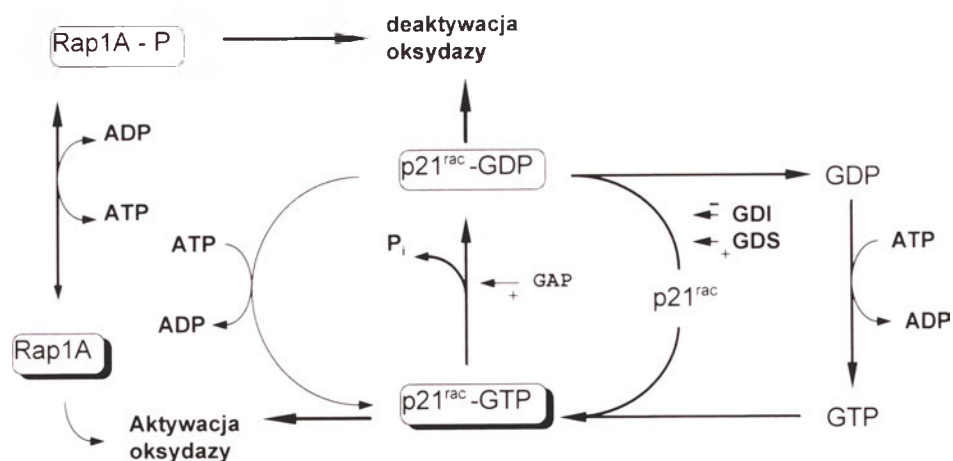
domo, jakie czynniki są odpowiedzialne za tak dokładną lokalizację. Bardzo możliwe, że w procesie tym uczestniczy cytoszkielet, który umożliwia powstawanie wakuol. Wiadomo, że aktywne białko p21<sup>rac</sup> powoduje znaczną przebudowę cytoszkieletu położonego pod błoną komórkową [34]. Również zewnętrzne aktywatory oksydazy, takie jak czy estry forbolu, powodują zmiany w organizacji części podbłonowej cytoszkieletu [35].

Oprócz dokładnej lokalizacji i obecności enzymów ochronnych (np. dysmutazy ponadtlenkowej), dodatkowym zabezpieczeniem komórek fagocytujących przed toksycznym wpływem reaktywnych form tlenu jest S-tiolacja. Proces ten polega na odwracalnym tworzeniu mostków siarczkowych między niskocząsteczkowymi tiolami a grupami -SH białek cytoplazmatycznych. S-tiolacja stymulowana jest przez te same czynniki, co wybuch oddechowy i nie występuje u chorych z CGD. W hodowlach monocytów i limfocytów osób chorych, proces ten można jednak wywołać podając nadtlenek wodoru. W S-tiolacji uczestniczy prawdopodobnie oksydoreduktaza glutation:tioredoksyna [36].

Składniki oksydazy ulegają ekspresji również w komórkach niefagocytarnych. Przypuszcza się, że podobnie jak w komórkach roślinnych mogą one uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów komórkowych [37].

#### IV. Przewlekła choroba ziarniniakowa powodowana jest uszkodzeniami różnych składników układu oksydazy NADPH

Okolo 75% wszystkich przypadków przewlekłej choroby ziarniniakowej, stanowi jej postać dziedziczna w sposób recesywny, sprzężony z chromosomem X [38, 39]. Gen *CYBB* odpowiedzialny za tę formę choroby koduje większą podjednostkę cytochromu b<sub>558</sub>. W różnych populacjach europejskich ta forma



Ryc. 2. Schemat regulacji aktywności p21<sup>rac</sup> i Rap 1A.

Aktywacja białka p21<sup>rac</sup> polega na zastąpieniu związanego z nim GDP na GTP. Proces ten hamowany jest przez GDI oraz stymulowany przez GDS. Związanie GTP przeprowadza p21<sup>rac</sup> w postać aktywną, potrzebną w składaniu aktywnego kompleksu oksydazy. Hydrolyza GTP do GDP, stymulowana przez białko GAP, powoduje inaktywację p21<sup>rac</sup>.

Deaktywacja oksydazy NADPH może również zależeć od fosforylacji Rap1A. Białko to, w formie ufosforylowanej nie wiąże się z oksydazą NADPH.

CGD występuje z częstością od 1:160000 (Dania) do 1:450000 (Szwecja) żywych urodzeń [40]. U kobiet, nosicielek jednej kopii zmutowanego genu kodującego gp91<sup>phox</sup>, powstawać mogą ubytki skórne, przypominające liszaj rumieniowaty przewlekły [41]. Spowodowane jest to zjawiskiem losowej inaktywacji jednego z dwu chromosomów X w komórkach żeńskich. Zdarza się, że statystycznie znacząca przewaga inaktywacji chromosomu X niosącego normalną kopię genu, zwiększa ryzyko wystąpienia zakażeń. Przebieg choroby jest jednak wielokrotnie łagodniejszy niż w przypadku pełnoobjawowej CGD.

Dotychczas u ponad stu chorych zidentyfikowano różne mutacje w genie *CYBB* [42]. Większość z nich prowadzi do braku obu podjednostek. Jednocześnie z badań *in vitro* wiadomo, że uszkodzenie genu kodującego jedną z podjednostek cytochromu b<sub>558</sub>, pociąga za sobą wytwarzanie jedynie śladowych ilości drugiej podjednostki. Przypuszcza się więc, że podobnie jak w przypadku innych oligomerycznych białek błonowych, stabilna jest jedynie pełna cząsteczka [43]. Do wzajemnego oddziaływania podjednostek dochodzi zapewne już podczas translacji [44].

Zidentyfikowano również mutacje prowadzące do powstania nieaktywnego cytochromu b<sub>558</sub>. Mutacje te są zlokalizowane przede wszystkim w sekwencji kodującej miejsce wiązania NADPH i hemu oraz miejsce przyłączania p47<sup>phox</sup> i p67<sup>phox</sup>. Tego typu analiza zależności aktywności enzymu od rodzaju i położenia mutacji jest bardzo pomocna w określaniu funkcjonalnej architektury białka.

Około 25% przypadków CGD stanowi jej postać autosomalna recesywna, powodowana mutacjami genów: *NCF1* (p47<sup>phox</sup>), *NCF2* (p67<sup>phox</sup>) i *CYBA* (p22<sup>phox</sup>). Geny te położone są odpowiednio: w chromosomie 7 (q11.23), 1 (q25) i 16 (q24). W tej grupie najczęstsza mutacja dotyczy genu kodującego podjednostkę p47<sup>phox</sup> i występuje z częstością ok. 1:2000 osób w populacji kaukaskiej (co odpowiada jednemu przypadkowi choroby na 2-4 mln żywych urodzeń) [45].

Zidentyfikowane dotychczas mutacje w genie *NCF2* zlokalizowane są przede wszystkim w obrębie fragmentów kodujących domeny SH3. N-końcowy fragment p67<sup>phox</sup>, pozbawiony obu domen SH3 może uczestniczyć *in vitro* w aktywacji oksydazy. Obecność domeny SH3 jest jednak niezbędna do przemieszczania się białka p67<sup>phox</sup> do błony oraz do oddziaływań z kompleksem oksydazy *in vivo* [46].

Nie są dotychczas znane dziedziczne defekty białka p40<sup>phox</sup> ani pozostałych składników układu oksydazy zależnej od NADPH.

## V. Wpływ aktywności oksydazy NADPH na funkcje fagocytów

Mikroorganizmy pochłonięte przez fagocyty zabijane są m.in. przez produkt aktywności oksydazy NADPH oraz jego pochodne: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i OH\*. Związki te

różnią się trwałością i skutecznością zabijania patogenów *in vivo*. Anionorodnik nadtlenkowy, a w jeszcze większym stopniu nadtlenek wodoru, dobrze pokonują błony cytoplazmatyczne. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest ponadto stosunkowo stabilny. Niektóre mikroorganizmy zabijane są już przy stężeniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rzędu mikromoli, inne są całkowicie odporne, a nawet same produkują duże ilości nadtlenku wodoru.

W odróżnieniu od H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rodnik hydroksylowy nie przedostaje się do wnętrza komórek i działa lokalnie. Reaktywność OH\* jest jednak dużo wyższa, a co ważniejsze nie są znane enzymy lub białka neutralizujące jego obecność. Rodnik hydroksylowy powoduje degradację lipidów, zmieniając m.in. przepuszczalność błony komórkowej, uszkadza kwasy nukleinowe. Inaktywuje również wiele enzymów, białek przenośnikowych i strukturalnych (m.in. kolagen).

Nadtlenek wodoru, anionorodnik nadtlenkowy oraz jego protonowana forma (\*O<sub>2</sub>H) stosunkowo łatwo przenikają przez błony biologiczne i pełnią rolę „dalekich zabójców”. W niektórych miejscach działania mogą być przekształcone w silniej działające związki.

Nadtlenek wodoru staje się substratem kolejnego obronnego enzymu — mieloperoksydazy, wytwarzającej jon podchlorawy (OCI<sup>-</sup>). Enzym ten występuje w bardzo dużych ilościach w granulocytach (ok. 5% suchej masy). Jon podchlorawy zaburza funkcjonowanie błony komórkowej bakterii, reaguje z bakteryjną syntazą ATP, a także z pierwszo- i drugorzędowymi aminami, tworząc dużo bardziej trwałe i toksyczne chloraminy (np. z putrescyną, spermidyną czy tauryną). Jony podchlorawe pełnią ponadto rolę aktywatora licznych proteaz (np. elastazy, kolagenazy), a jednocześnie inhibitora antyproteaz. W ten sposób uruchamiają kolejny element obrony organizmu.

Wydaje się, że do zabijania bakterii wykorzystywany jest również tlenek azotu i jego pochodne, wytwarzane przez makrofagi i neutrofile. NO tworzony jest przez syntezę tlenku azotu (NOS) z argininy i tlenu. Doświadczenia *in vitro* wskazują, że NO uczestniczy w zabijaniu eukariotycznych pasożytów cytoplazmatycznych (np. świdrowców) [47]. W reakcji NO z reaktywnymi formami tlenu powstaje wiele, aktywnych fizjologicznie, związków. Najważniejszy z nich to nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>) oraz NO<sub>2</sub> i \*OH. Również sam NO może blokować niektóre przemiany metaboliczne: glikolizę, syntezę DNA oraz łańcuch oddechowy [48].

Należy podkreślić, że neutrofile chorych z CGD zabijają, choć z mniejszą wydajnością, bakterie. Przyjmuje się więc, że w braku oksydazy, rolę pierwszej linii obrony przejmują granule cytoplazmatyczne. U osób zdrowych granule cytoplazmatyczne łączą się z wakuolami fagocytarnymi już po wybuchu oddechowym i uwalniają do wnętrza wakuoli liczne enzymy trawienne. Wybuch oddechowy oprócz niszczenia bakterii reaktywnymi formami tlenu stwarza wewnątrz wakuoli warunki do działania enzymów trawiennych, pod-

wyższając pH do wartości ok. 8.0. Wnętrze spoczynkowych granul jest natomiast kwasowe (pH ok. 5), utrzymując enzymy w stanie nieaktywnym. Oba procesy działają więc synergistycznie, choć aktywacja enzymów litycznych nie jest bezwzględnie zależna od wybuchu oddechowego [49].

Zabijanie bakterii jest zbyt ważne dla całości organizmu, by realizowane było przez jeden mechanizm. Zabójcza aktywność fagocytów jest zatem wynikiem połączonego działania wielu różnych czynników. Oprócz RFT, jonów podchlorynowych, chloramin i podwyższonego pH, w niszczeniu mikroorganizmów uczestniczy wiele komórkowych peptydów przeciwbakteryjnych (defensyn), katepsyna G oraz liczne enzymy granul cytoplazmatycznych [50]. Względna i zróżnicowana oporność bakterii na „nieoksydacyjne” mechanizmy zabijania wpływa zapewne na charakterystyczny obraz zakażeń u chorych z CGD [51].

Niedawno stworzono zwierzęce modele przewlekłej choroby ziarniniakowej. Jednym z nich są transgeniczne myszy, z uszkodzonym genem kodującym białko p47<sup>phox</sup> oraz podjednostkę większą oksydazy [52, 53]. Myszy z uszkodzonym genem *Cybb* są stosunkowo odporne na infekcje bakteryjne, ale nie grzybicze. Natomiast myszy z uszkodzonym genem kodującym białko p47<sup>phox</sup> charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na zakażenia i tworzą ziarniniaki tak, jak ma to miejsce u ludzi. Można więc przypuszczać, że powstające w wyniku wybuchu oddechowego RFT stanowią bardzo ważny, ale nie jedyny i nie uniwersalny dla wszystkich ssaków sposób zabijania niepożądanych mikroorganizmów. Modele mysie CGD stawiają nadzieję na wyjaśnienie molekularnych i biochemicznych szczegółów zjawiska wybuchu oddechowego.

Wybuch oddechowy zwiększa również odczyn zapalny. Aktywowane fagocyty wytwarzają czynnik chemotaktyczny, przywołujący nowe komórki żerne. Jednocześnie powstające RFT aktywują piąty składnik układu dopełniacza, stymulują agregację płytek krwi oraz aktywują liczne proteazy. Wszystkie te elementy są istotne przy usuwaniu resztek zamierających z naturalnych przyczyn komórek organizmu. Dlatego modele zwierzęce CGD okażą się zapewne ważne w poznawaniu patofizjologii przewlekłych chorób zapalnych, np. stawów czy naczyń [54].

## VI. Diagnostyka CGD

Najprostszym testem diagnostycznym CGD jest test NBT, polegający na redukcji przez anionorodnik ponadtlenkowy żółtego, rozpuszczalnego w wodzie barwnika tetrazoliowego (*nitroblue tetrazolium*, NBT) do ciemnoniebieskiego, nierozpuszczalnego formazanu [55]. Oznaczenie łatwo wykonać obserwując neutrofile przylegające w naturalny sposób do szklanego podłoża. Aktywacja komórek następuje poprzez podanie estru forbolu (np. PMA) [56]. W tych warun-

kach jedynie normalne komórki zabarwiają się na niebiesko. Po jasnoniebieskim zabarwieniu komórek w teście NBT rozpoznać można chorych z nietypowymi postaciami, charakteryzujących się śladową produkcją \*O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a także kobiety, nosicielki postaci CGD sprzężonej z chromosomem X. U kobiet tych obserwuje się bardzo charakterystyczny obraz mozaiki niebieskich i niezabarwionych komórek, powodowany losowością zjawiska inaktywacji jednego z chromosomów X.

Test NBT jest dostatecznie czuły dla wykrycia większości przypadków CGD. Jednak negatywny wynik testu NBT nie zawsze pozwala na wykluczenie CGD. Na przykład u chorych o nietypowym przebiegu choroby, powodowanej mutacjami zmniejszającymi jedynie aktywność oksydazy, produkcja RFT zachodzi z wydajnością rzędu 1-10 procent [57]. Chorzy są wtedy diagnozowani w różnym wieku, nawet w czwartej dekadzie życia. Konieczne są zatem dokładniejsze badania biochemiczne lub molekularne, zarówno u dzieci, jak u starszych chorych z nie wyjaśnionymi, nawracającymi i ropnymi zakażeniami. Wczesna diagnoza jest istotna ze względu na znaczenie prowadzenia profilaktyki antybiotykowej już od okresu dzieciństwa. Istotna jest również w poradnictwie genetycznym rodzin ryzyka CGD.

W ciągu ostatnich lat opracowano bardzo czułe testy, oparte na pomiarach luminescencji związków reagujących z nadtlenkami, powstającymi z podstawowego produktu reakcji oksydazy [58]. Spośród tych metod najbardziej czuła okazała się cytometria przepływowa z wykorzystaniem dihydrorodaminy 123 [59-61]. W przypadku nieobecności cytochromu b<sub>558</sub> trudno jednak określić, której podjednostki brakuje, ponieważ brak jednej, pociąga za sobą niestabilność drugiej.

W diagnostyce różnicowej postaci CGD ważny jest wywiad rodzinny. Jednak nie zawsze można ustalić sposób dziedziczenia choroby w konkretnej rodzinie. Diagnoza polega wtedy na ustaleniu brakującego składnika układu oksydazy zależnej od NADPH. Postać choroby można określić np. techniką Western blotting. U probanda ze zdiagnozowaną postacią CGD możliwe jest poszukiwanie mutacji w genie kodującym konkretną podjednostkę oksydazy [62].

## VII. Nadzieje: terapia genowa

W chwili obecnej leczenie CGD jest objawowe i polega na antybiotykoterapii zakażeń oraz punkcjach i drenażu ropni. Przy braku poprawy chorym przetacza się masę leukocytarną [5, 6]. W leczeniu zwraca się uwagę przede wszystkim na profilaktykę zakażeń bakteryjnych i grzybiczych, polegającą na przewlekłym stosowaniu antybiotyków oraz ludzkiego rekombinowanego interferonu  $\gamma$  [5, 63]. Wskazaniem do przeszczepu szpiku kostnego jest postać choroby o klinicznie ciężkim przebiegu od urodzenia, o ile w rodzi-



nie chorego znaleziono dawcę całkowicie zgodnego w zakresie antygenów tkankowych [64, 65].

Duże nadzieje wiąże się z terapią genową *ex vivo*. Zasada tej metody polega na pobraniu komórek macierzystych szpiku od chorego i wprowadzeniu do nich prawidłowej wersji genu oksydazy NADPH np. w wektorze retrowirusowym [66]. Zmienione komórki wprowadzane są na powrót do organizmu. Doświadczenia takie przeprowadzono m.in. z wykorzystaniem istniejących modeli mysich. W przypadku myszy z uszkodzonym genem kodującym p47<sup>phox</sup> terapia *ex vivo* przywróciła odporność na zakażenia oraz zwiększyła przeżywalność [67]. Również u myszy z uszkodzonym genem *Cybb* ten typ terapii genowej przywrócił odporność na zakażenie *A. fumigatus* przez co najmniej 35 tygodni [68]. Wydaje się, że dla częściowej ochrony przed zakażeniami wystarczy stransformowanie niewielkiej procentowo populacji fagocytów. Problemem ograniczającym skuteczność terapii genowej u ludzi jest przede wszystkim niska wydajność oraz konieczność wielokrotnego wprowadzania „leczniczego” DNA.

Wydajność transformacji w metodzie *ex vivo* można zwiększyć stosując wektor niosący oprócz genu oksydazy gen nadający oporność na cytostatyki. W czasie hodowli transformowanych komórek w pożywce selekcyjnej, liczba transformantów produkujących funkcjonalną oksydazę znacznie wzrasta [69]. Być może osiągalne jest przeniesienie podobnej presji selekcyjnej do organizmu chorego, poddawanego terapii genowej.

Nie wiadomo dokładnie jaki poziom aktywności oksydazy w fagocytach jest konieczny dla skutecznej ochrony organizmu człowieka. Wykazano np., że aktywność enzymu rzędu 12% wynikająca z obecności u chorego mutacji Y244C w genie *CYBB*, nie wystarcza do wydajnego zabijania *Staphylococcus aureus in vitro* [70]. Natomiast wprowadzenie nieuszkodzonej kopii genów *CYBB* oraz *NCF2* do izolowanych z krwi obwodowej komórek macierzystych (CD34+) lub nieoczyszczonych leukocytów chorych z CGD, przywracało około 25% aktywności oksydazy NADPH i zdolność do zabijania bakterii *in vitro*.

Dotychczasowe wyniki sugerują optymistycznie, że nawet niewielki poziom ekspresji wprowadzonego genu lub wysoka ekspresja jedynie w części populacji komórek, wystarczą do uzyskania aktywności oksydazy, chroniącej skutecznie przed zakażeniami [71, 72]. Być może dobrym rozwiązaniem okaże się „przejsiowa terapia genowa” CGD, stosowana pomocniczo w leczeniu zagrażających życiu infekcji. Polegałaby ona na wprowadzeniu co pewien czas do organizmu chorego monocytów stransformowanych bezpiecznym wektorem (np. adenowirusowym) z genem oksydazy zależnej od NADPH [73].

Artykuł otrzymano 19 lutego 1998 r.

Zaakceptowano do druku 22 czerwca 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Bartosz G (1995) Druga twarz tlenu. Wyd. Naukowe PWN
2. Dinauer MC (1993) *Critical Rev Clin Lab Sci* **30**: 329-369
3. Curnutte JT (1993) *Clin Immunol Immunopathol* **67** (3 Pt2): S2-S13
4. Segal AW (1996) *Mol Med Today* **2**: 129-136
5. Mouy R, Fischer A, Vilmer E, Seger R, Griscelli C (1989) *J Pediatr* **114**: 555-558
6. Gallin JI, Malech HL (1990) *JAMA* **263**: 1533-1537
7. Chin TW, Steihm ER, Falloon J, Gallin JI (1987) *J Pediatr* **111**: 349-355
8. Mouy R, Veber F, Blanche S, Donadieu J, Brauner R, Levrion JS, Griscelli C, Fisher A (1994) *J Pediatr* **125**: 998-1003
9. Jones OT (1994) *Bioessays* **16**: 919-923
10. Henderson LM, Thomas S, Bantig G, Chapell JB (1997) *Biochem J* **325**: 701-705
11. Wallach TM, Segal AW (1997) *Biochem J* **321**: 583-585
12. Imajoh-Ohmi J, Tokita K, Ochiai H, Nakamura M, Kanegasaki S (1992) *J Biol Chem* **267**: 180-184
13. Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H, Scrace G (1992) *Biochem J* **284**: 781-788
14. Sumimoto H, Sakamoto N, Nozaki H, Hinakami S (1992) *Biochem Bioph Res Commun* **186**: 1368-1375
15. Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jasaitis AJ, Orkin SH (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3319-3323
16. Birge RB, Knudsen BS, Besser D, Hanafusa H (1996) *Genes Cells* **1**: 595-613
17. Weng Z, Thomas SM, Rickles RJ, Taylor JA, Brauer AW, Seidel-Dugan C, Michael MW, Dreyfuss G, Brugge JS (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 4509-4521
18. Iyer SS, Pearson DW, Nauseef WM, Clark RA (1994) *J Biol Chem* **269**: 22405-22411
19. Leusen JH, Fluiter K, Hilarius PH, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG (1995) *J Biol Chem* **270**: 11216-11221
20. Cross AR, Curnutte JT (1995) *J Biol Chem* **270**: 6543-6548
21. Sathyamoorthy M, de Mendez I, Adams AC, Leto TL (1997) *J Biol Chem* **272**: 9141-9146
22. Prigmore E, Ahmed S, Best A, Kozma R, Hauser E, Segal AW, Lim L (1995) *J Biol Chem* **270**: 10717-10722
23. Dusi S, Donini M, Rossi F (1995) *Biochem J* **308**: 991-999
24. Nisimoto Y, Freeman JLR, Motalebi SC, Lambeth JD (1997) *J Biol Chem* **272**: 18834-18841
25. Wientjes FB, Segal AW, Hartwig JH (1997) *J Leukoc Biol* **61**: 303-312
26. Leusen JH, de Klein A, Hilarius PM, Ahlin A, Palmblad J, Smith CI, Verhoeven AJ, Roos D (1996) *J Exp Med* **184**: 1243-1249
27. Wientjes FB, Segal AW (1995) *Semin Cell Biol* **6**: 357-365
28. Waite KA, Wallin R, Qualliotine MD, McPhail LC (1997) *J Biol Chem* **272**: 15569-15578
29. Lomax KJ, Leto TL, Nuno H, Gallin JI, Malech HL (1989) *Science* **245**: 409-412
30. Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW (1994) *Biochem J* **298** (Pt 3): 585-591
31. Leto TL, Adams AG, de Mendez J (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10650-10654
32. Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ, Linner JG (1992) *Blood* **79**: 1563-1573
33. Bokoch GM, Quillam LA, Bohl BP, Jesaitis AJ, Quinn MT (1991) *Science* **254**: 1794-1796
34. Lohia A, Samuelson J (1996) *J Biol Chem* **271**: 205-208
35. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) *Cell* **70**: 401-410
36. Sers T, Ravichandran V, Moriguchi T, Rokutan K, Thomas JA, Johnston RB (1996) *J Immunol* **156**: 1973-1980
37. Wojtaszek P (1997) *Biochem J* **322**: 681-692

38. Jackson SH, Gallin JI, Holland SM (1995) *J Exp Med* **182**: 751-758
39. Smith RM, Curnutte JT (1991) *Blood* **77**: 673-682
40. Ahlin A, de Boer M, Ross D, Leusen J, Smith CI, Sundin U, Rabbani H, Palmblad J, Elinder G (1995) *Acta Paediatr* **84**: 1386-1395
41. Gallin JI, Buescher ES, Seligmann BE, Nath J, Gaither T, Katz P (1983) *Ann Intern Med* **99**: 657
42. Roos D, de Boer H, Kuribayashi F, Heischel C, Weening RS, Segal SW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H (1996) *Blood* **87**: 1663-1681
43. Kishimoto TK, Hollander N, Roberts TH, Anderson DC, Springer TA (1987) *Cell* **50**: 193-202
44. Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D (1996) *J Lab Clin Med* **128**: 461-476
45. Pallister CJ, Hancock JT (1995) *British J Biomed Sci* **52**: 149-156
46. de Mendez I, Garrett MC, Adams AG, Leto TL (1994) *J Biol Chem* **269**: 16326-16332
47. Odell EW, Segal AW (1988) *Biochem Biophys Acta* **971**: 266-274
48. Xia Y, Zweier JL (1997) *Proc Acad Sci USA* **94**: 6954-6958
49. Segal AW, Geisow M, Garcia R, Harper A, Miller R (1981) *Nature (Lond)* **290**: 406-409
50. Wei XQ (1995) *Nature (Lond)* **375**: 408-411
51. Odell E, Segal A (1991) *J Med Microbiol* **34**: 129-135
52. Jackson SH, Gallin JI, Holland SM (1995) *J Exp Med* **182**: 751-758
53. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Fishermann J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinanuer MS (1995) *Nat Genet* **9**: 202-209
54. Morgenstern DE (1997) *J Exp Med* **185**: 207-218
55. Bachner RL, Nathan DG (1968) *N Engl J Med* **278**: 972-978
56. Meerhof LJ, Roos D (1986) *J Leuk Biol* **39**: 699-710
57. Liese JG, Jendrossek V, Jansson A, Petropu-  
lov T, Kloss S, Gahr M, Belohradsky BH (1996) *Lancet* **347**: 220-223
58. Mayo L, Curnutte J (1990) *Meth Enzymol* **186**: 567-575
59. Atkinson TP, Bonitatibus GH, Berkow RL (1997) *J Pediatr* **130**: 488-491
60. Emmendorffer A, Nakamura M, Rothe G, Spiekermann K, Lohmann-Matthes HL, Roesler J (1994) *Cytometry* **18**: 147-155
61. Roesler J, Hecht H, Freihorst J, Lohmann ML, Emmendorffer A (1991) *Eur J Pediatr* **150**: 161-165
62. Skopczyńska H, Roos D, Rabbani H, Bernatowska E (1997) *Ped Pol*, LXXII **2**: 119-128
63. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group (1991) *N Engl J Med* **324**: 509
64. Seger RA (1996) ESID — European concerted action (Biomed I) *Newsletter* **5**: 19
65. Calvino MC, Maldonado MS, Otheo E, Munoz A, Coulso JM, Burgaleta C (1996) *Eur J Pediatr* **155**: 877-879
66. Porter CD, Parker MH, Levinsky RC, Collins MK, Kinnon C (1993) *Blood* **82**: 2196-2202
67. Merdiney 3rd M, Jackson SH, Spratt SK, Li F, Malech HL (1997) *Blood*: 2268-2275
68. Bjorgvinsdottir H, Ding C, Pech N, Gifford MA, Li LL, Dinanuer MC (1997) *Blood* **89**: 41-48
69. Sokoloe RA, Sekhsaria S, Sugimoto Y, Whiting-Theobald N, Linton GF, Li F, Gottesman HM, Malech HL (1996) *Blood* **87**: 42-50
70. Bu-Ghanim HN, Segal SW, Keep NH, Casimir CM (1995) *Blood* **86**: 3575-3582
71. Porter CD, Parker HM, Collins HK, Levinsky RJ, Kinnon C (1996) *Blood* **87**: 3722-3730
72. Weil WM, Linton GF, Whiting-Theobald N, Vowells SJ, Li F, Malech HL (1997) *Blood* **89**: 1754-1761
73. Schneider SD, Rusconi S, Seger RA, Mossle JP (1997) *Gene Ther* **4**: 524-532

**Acta  
Biochimica  
Polonica**

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

# Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej

## Plant cell signalling; plasma membrane receptors

JOLANTA BARAŃSKA\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Receptory komórek roślinnych
  - II-1. Analogia z transbłonowymi receptorami komórek zwierzęcych
  - II-2. Receptory sprzężone z białkiem G
    - II-2.1. Działanie auksyn
    - II-2.2. Działanie światła
  - II-3. Receptory zawierające kinazy białkowe
    - II-3.1. Receptoro-podobne kinazy serynowo treoninowe
    - II-3.2. Receptory zawierające kinazę histydynową
- III. Czy fitochrom jest kinazą histydynową? Uwagi końcowe

### I. Wstęp

Rośliny w ciągu całego życia podlegają różnorodnym zewnętrznym sygnałom: fizycznym, jak światło, wiatr, przyciąganie ziemskie, czy zmiany temperatury i chemicznym, jak działanie hormonów. Mechanizm oddziaływania tych sygnałów na znajdujące się na powierzchni błony komórkowej receptory, ich transdukcja w komórce i przemiana w określoną odpowiedź jest jednak stale jeszcze słabo poznana.

Dwadzieścia lat temu wiedza na temat przekazywania informacji w komórkach roślinnych praktycznie nie istniała [1]. Jeszcze pięć lat temu, w artykule przeglądowym, opublikowanym w „*Postęпах Biochemii*” pisałyśmy, że „w komórkach roślinnych nie udało się jak dotąd wyizolować błonowych receptorów” [2]. W ostatnim czasie nastąpiło jednak ogromne zainteresowanie problemami przekazywania informacji w komórkach roślinnych, a wiedza na ten temat niezmiernie wzrosła. Wiadomo zatem, że w komórkach roślinnych, zgodnie z klasyfikacją przyjętą dla komórek zwierzęcych, występują kanały zależne od potencjału elektrycznego, oraz receptory jonotropowe i receptory metabotropowe, zarówno związane z białkiem G jak mające aktywność kinaz [3]. Kanały zależne od potencjału i receptory jonotropowe to kanały jonowe, przez które wpływają do komórki lub wypływają z niej jony. Kanały te są otwierane lub zamykane w wyniku zmian potencjału czynnościowe-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Plant transmembrane receptors
  - II-1. Analogy with transmembrane animal receptors
  - II-2. G protein linked receptors
    - II-2.1. Auxin signal transduction
    - II-2.2. Light signal transduction
  - II-3. Protein kinase linked receptors
    - II-3.1. Receptor-like serine threonine kinases
    - II-3.2. Receptor histidine kinases
- III. Is phytochrome a histidine kinase? Concluding remarks

go, lub poprzez związanie liganda z białkiem receptorowym tworzącym kanał. Receptory metabotropowe nie mają charakteru kanału jonowego, a ich działanie polega na wywołaniu w komórce kaskady reakcji chemicznych [4].

Niniejsza praca stara się podsumować stan wiedzy na temat receptorów metabotropowych zarówno związanych z białkiem G jak i mających aktywność kinaz w komórkach roślinnych. Podaje krótką charakterystykę receptorów zwierzęcych i próbuje znaleźć analogię między światem roślin, zwierząt i bakterii.

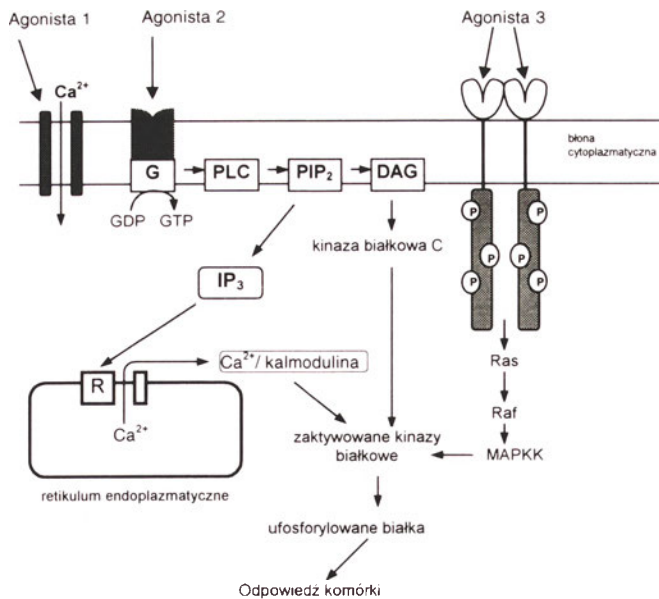
### II. Receptory komórek roślinnych

#### II-1. Analogia z transbłonowymi receptorami komórek zwierzęcych

W porównaniu do receptorów komórek roślinnych, budowa, działanie i inicjacja kaskady reakcji chemicznych następująca po pobudzeniu receptorów komórek zwierzęcych jest dobrze poznana [4-6]. Dlatego też, w naturalny poniekąd sposób, dane dotyczące przekazywania informacji w komórce roślinnej zazwyczaj porównuje się do zachodzących w komórce zwierzęcej, starając się znaleźć między nimi analogie.

Jak już powiedziano we Wstępie, w komórkach roślinnych występują kanały zależne od potencjału, receptory jonotropowe i metabotropowe [3]. Kanały jonowe zależne od potencjału błony są szeroko rozpowszechnione w świecie roślin. W odróżnieniu od świata zwierząt, gdzie kanały te występują w błonie komórkowej, u roślin znajdują się nie tylko w tej, lecz także w błonach struktur wewnątrzkomórkowych,

\* Prof., dr hab., Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



**Ryc. 1. Przekazywanie informacji w komórce zwierzęcej.** Agonista 1 działa na receptor zawierający kanał jonowy. Agonista 2 działa na receptor sprzężony z białkiem G (G), który wymienia GDP na GTP i aktywuje fosfolipazę C (PLC). PLC hydrolyzuje fosfolipid inozytoli (PIP<sub>2</sub>), co prowadzi do powstania diacylglicerolu (DAG) i trisfosfoinozytolu (InsP<sub>3</sub>). DAG aktywuje kinazę białkową C, a InsP<sub>3</sub> uwalnia Ca<sup>2+</sup> z wnętrza endoplazmatycznego retikulum. Agonista 3 wiąże się do receptora zawierającego kinazę tyrozynową. Związanie agonisty powoduje dimeryzację receptora. Aktywacja kinaz prowadzi do ufosorylowania określonych białek i odpowiedzi komórki.

takich jak wakuole i endoplazmatyczne retikulum [7]. Zagadnienie to nie jest jednak przedmiotem niniejszej pracy. Nie zostaną tu także omówione receptory jonotropowe. Ten rodzaj receptorów występuje u zwierząt w komórkach pobudliwych, takich jak np. komórki mięśniowe, czy nerwowe. Receptory te to wielocząsteczkowe, oligomeryczne białka, wielokrotnie przenikające przez błonę komórkową, związane bezpośrednio z kanałem jonowym, otwieranym lub zamykanym okresowo przez przyłączenie agonistów (Ryc. 1). Dobrym przykładem tej nadrodziny receptorów są znajdujące się w komórkach nerwowych receptory NMDA, na które jako agonista działa kwas L-glutaminowy. W świecie roślin, choć są pewne dowody, że sygnał (np. kwas abscyzynowy) działa na kanały błony komórkowej i powoduje wnikanie jonów wapnia do komórki [3, 7], to jednak taki typ receptora jak receptor NMDA nie został dotychczas zidentyfikowany.

W pracy niniejszej nie będą również omówione roślinne receptory błon wewnątrzkomórkowych, występujące w błonach endoplazmatycznego retikulum i wakuoli [3,7]. Zostanie natomiast przedstawiony najnowszy stan wiedzy dotyczący receptorów błony komórkowej sprzężonych z białkiem G i receptorów mających aktywność kinaz, tworzących grupę tzw. receptorów metabotropowych.

Receptory związane z białkiem G aktywują enzymy efektorowe i kanały jonowe na drodze pośredniej. Współdziałanie między enzymem, a receptorem zachodzi bowiem poprzez trzecie białko nazywane właś-

nie białkiem G [6]. W komórkach zwierzęcych, receptory sprzężone z białkiem G stanowią najliczniejszą grupę receptorów, odpowiadających na różnorakie sygnały, jak hormony, neurotransmitery, światło, substancje zapachowe czy inne bodźce lokalne. Wszystkie te receptory mają podobną strukturę. Składają się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego siedmiokrotnie przechodzącego przez błonę, z częścią N-terminalną po stronie zewnętrznej, a C-terminalną po wewnętrznej stronie błony. Kiedy ligand wiąże się z receptorem, zmiana konformacji białka receptorowego powoduje aktywację białka G związaną z wymianą cząsteczki GDP na GTP (Ryc. 1).

Białko G jest trimerem, składa się z podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . W formie zaktywowanej, zarówno podjednostka  $\alpha$ , jak i kompleks podjednostek  $\beta/\gamma$  aktywują określone enzymy efektorowe (np. fosfolipazę C), czy kanały jonowe. Fosfolipaza C hydrolyzuje fosfolipid inozytoli, fosfatydyloinozytolo 4,5-bisfosforan (PIP<sub>2</sub>) w wyniku czego powstają dwa wtórne przekaźniki informacji: diacylglicerol (DAG) i trisfosfoinozytol (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> uwalnia jony wapnia zmagazynowane w strukturach endoplazmatycznego retikulum (Ryc. 1). Uwolniony Ca<sup>2+</sup> łączy się z kalmoduliną i aktywuje kinazę białkową II, podczas gdy DAG aktywuje kinazę białkową C (Ryc. 1). Aktywacja kinaz powoduje fosforylację określonych białek i w efekcie prowadzi do określonej odpowiedzi komórki na działający na nią sygnał.

Podobnie jak receptory związane z białkiem G, również receptory związane z enzymami wiążą agonistę do N-terminalnej domeny znajdującej się po zewnętrznej stronie błony komórkowej. W przeciwieństwie do receptorów związanych z białkiem G, receptory te zawierają tylko jedną domenę transbłonową, a ich domena cytosolowa zawiera integralny enzym w cząsteczce (Ryc. 1). W świecie zwierząt, większość receptorów zawierających enzym w cząsteczce charakteryzuje się obecnością kinazy tyrozynowej. Związanie agonisty, np. naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), do formy monomerycznej białka receptorowego powoduje dimeryzację i autofosforylację reszt tyrozynowych znajdujących się w domenach katalitycznych łańcuchów polipeptydowych receptorów, blisko części C-terminalnej (Ryc. 1). Ufosorylowane tyrozyny służą teraz jako miejsce wiązania dla innych białek. Wiążą się one z receptorem dzięki specjalnej domenie aminokwasów, tzw. domenie SH2, rozpoznającej część katalityczną receptora. Po związaniu, wiele z nich ulega fosforylacji, a kolejne fosforylacje następnych białek prowadzą do tzw. kaskady kinaz (kaskada kinaz MAP).

Wśród działających na komórki zwierzęce czynników wzrostu jedynie receptor TGF $\beta$  (z ang.: *transforming growth factor  $\beta$* ) i jego analogi charakteryzują się obecnością kinazy serynowo/treoninowej, podczas gdy w świecie roślin ten typ receptorów jest szeroko rozpowszechniony (patrz: podrozdział II-3.1.) a recep-

tory zawierające kinazę tyrozynową nie występują.

Należy dodać, że w komórkach roślinnych mechanizm działania receptorów przekazujących sygnał przez białka G nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Istnieje jednak wiele dowodów pośrednich wskazujących na działanie receptorów tego typu. Zostaną one omówione na przykładzie oddziaływania na komórkę roślinną auksyn i światła.

## II-2. Receptory sprzężone z białkiem G

### II-2.1. Działanie auksyn

Auksyny należą do hormonów roślinnych dobrze zbadanych pod względem chemicznym. Auksyna naturalna, kwas indoliloctowy (IAA), odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu (elongacji), różnicowania i rozwoju roślin. Wiadomo, że na poziomie komórkowym, auksyna powoduje hiperpolaryzację błony komórkowej w wyniku wyrzutu jonów wodorowych przez aktywację  $H^+$ -ATPazy. Jony wodoru przenikają przez błonę komórkową do ściany komórkowej powodując jej zakwaszenie i zwiększając rozciągliwość, przez co najprawdopodobniej następuje wydłużenie i wzrost rośliny [8, 9].

Obecnie wiadomo, że auksyny działają zewnętrznie na błonę komórkową w kompleksie z białkami wiążącymi te cząsteczki (ABP, z ang.: *auxin binding protein*). W komórkach kukurydzy (*Zea mays*) zidentyfikowano pięć takich białek. Są to małe (około 20 kDa) cząsteczki, charakteryzujące się domeną wiążącą auksynę, miejscem ulegającym glikozylacji, oraz w części C-terminalnej motywem KDEL. W świecie zwierzęcym, KDEL, specjalna sekwencja aminokwasów jest charakterystyczna dla białek, które umiejscawiają się w błonie endoplazmatycznego retikulum. Tak jest i w przypadku roślin [10]. Białka ABP są znajdowane w tych właśnie strukturach komórkowych. Z drugiej jednak strony, białko to jest białkiem zewnątrzkomórkowym [9]. Można zatem sądzić, że w wyniku sekrecji jest ono wydzielane z komórki, być może w kompleksie z auksyną. Część badaczy przypuszcza, że właśnie to białko pełni funkcje receptora auksyny. Inni natomiast uważają, że jest to niemożliwe. Sądzą, że część hydrofobowa tego białka jest zbyt krótka, aby mogło przeniknąć przez błonę. Proponują zatem, że kompleks ABP/auksyna wiąże się do specyficznego białka zakotwiczonego w błonie komórkowej, pełniącego funkcje receptora [11]. Spekulują, że białko to jest receptorem związanym z białkiem G. Związanie kompleksu ABP/auksyna zmienia konformację białka receptorowego, co powoduje aktywację białka G, które następnie stymuluje enzymy efektorowe, jak  $H^+$ -ATPazę, czy fosfolipazę C. O udziale białka G w tym procesie świadczy fakt, że niehydrolizujący analog GTP,  $GTP\gamma S$ , wzmacnia działanie auksyn na komórkę [9]. Wykazano także, że syntetyczny analog auksyny, 2,4-D, powoduje szybki wzrost poziomu trisfosfoino-

zytolu i jego metabolitów, a zmianom tym towarzyszy, tak jak w komórkach zwierzęcych, spadek poziomu znakowanych fosfolipidów inozytolowych hydrolizowanych przez fosfolipazę C [12].

Ponieważ rosnące w kulturze komórki roślinne wymagają dla proliferacji dodatku auksyny, zaczęto przypuszczać, że być może auksyna może także działać jako mitogen. Istotnie, wykazano, że nieobecność auksyny w środowisku zatrzymuje cykl komórkowy komórek tytoniu, a ponowny dodatek wznowia ten proces. Jednocześnie następuje aktywacja kinaz: MAPKK i MAPK. Rezultaty te wskazują, że auksyny mogą indukować różne drogi przekazywania sygnałów, nie tylko z udziałem białek G, lecz także kaskady MAP kinaz [13].

### II-2.2. Działanie światła

W przeciwieństwie do auksyny, której receptor nie został jeszcze zidentyfikowany, fitochrom, wrażliwy na działanie światła receptor roślinny jest dobrze scharakteryzowany. Fitochrom jest niebiesko-zielonym barwnikiem o charakterze białkowym (chomoproteina), o masie 125 kDa. Jest on syntetyzowany jako forma nieaktywna i oznaczony symbolem Pr. Forma ta jest wrażliwa na światło czerwone, o długości fali 660 nm i absorbując je przekształca się w formę aktywną, Pfr. Promieniowanie czerwone o dłuższej fali (730 nm), tzw. daleka czerwień, przekształca Pfr z powrotem w Pr. W ciągu dnia fitochrom występuje głównie w formie Pfr. Należy dodać, że gen kodujący białkowy składnik fitochromu został już sklonowany, a na podstawie jego cDNA wydedukowano pierwszorzędową strukturę białka. Struktura i właściwości fitochromu zostały szczegółowo przedstawione na łamach *Postępów Biochemii* [14].

Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej zachodzące pod wpływem fotoindukcji fitochromu badano z użyciem wielu metod [15-20]. Wykazano, że podobnie jak w przypadku auksyn nie hydrolizujący analog GTP,  $GTP\gamma S$ , stymulował, a niehydrolizujący analog GDP,  $GDP\gamma S$ , hamował działanie fitochromu. Działanie to było także modyfikowane przez toksynę cholery [17]. W komórkach hipokotylu mutantu pomidora pozbawionego fitochromu A prowadzono szereg badań stosując metodę mikroiniekcji [15-19]. Wykazano, że do prawidłowego rozwoju komórki oprócz iniekcji fitochromu niezbędny jest także dodatek  $Ca^{2+}$ , kalmoduliny i cGMP.  $Ca^{2+}$  i kalmodulina konieczne są dla rozwoju chloroplastu, a cGMP do akumulacji antocjanów [17-19]. Wyniki tych badań wskazują na udział białka G w szlaku przekazywania informacji zapoczątkowanym przez fotoindukcję fitochromu. Udział białka G postuluje się również w przypadku przekazywania sygnałów w wyniku fotoindukcji kryptochromu — fotoreceptora światła niebieskiego [3, 20].

Dotychczas jednak nie wiadomo w jaki sposób

fotoreceptory oddziałują na białko G [3, 15, 20]. Są one bowiem cytosolowymi, rozpuszczalnymi białkami, a jak wiemy z badań nad komórką zwierzęcą, białka G są usytuowane w błonie komórkowej. Dla wyjaśnienia tego paradoksu, Treva i Malno [3] wysuwają szereg różnych hipotez. Sugerują, że być może fotoreceptory są związane z białkami cytoszkieletu znajdującymi się w bliskim kontakcie z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej. Inne przypuszczenie zakłada, że jakaś bardzo mała (w stosunku do nadmiaru w cytosolu) część fotoreceptorów jest jednak obecna w błonie, lub że działają one na białka G poprzez dodatkowy intermediat. Przypuszczają także, że być może związanie fotoreceptorów z błoną ma miejsce jedynie przez chwilę, tuż po aktywacji przez światło i absorpcji protonu, a także sugerują, że być może białko G w komórce roślinnej, choć podobne, ma inne właściwości niż to znajdujące u zwierząt.

Wszystkie te hipotezy są jak na razie jedynie spekulacjami. Nie wiadomo także, czy białko G przekazujące sygnały przy fotoindukcji wywoływanej światłem czerwonym i niebieskim działa według tego samego mechanizmu, a także czy te same czy inne cząsteczki bądź podjednostki białka G są zaangażowane w te procesy. W komórkach rzodkiewnika (*Arabidopsis*) wyizolowano pojedynczy gen kodujący podjednostkę  $\alpha$  białka G, nie wiadomo jednak czy to właśnie ta podjednostka zaangażowana jest w procesy przekazywania sygnałów indukowanych przez światło [20].

W roślinach stojących na niższym szczeblu drabiny ewolucyjnej, mchu *Ceratodon purpureus*, znaleziono gen kodujący białko będące fotoreceptorem dla światła czerwonego i dalekiej czerwieni [20]. Białko to ma domenę podobną do fitochromu roślin wyższych a w części C terminalnej zawiera kinazę białkową. Co więcej, białko to ulega autofosforylacji, a jego aktywność jest modulowana przez światło. Podobnie w błonie komórkowej roślin wyższych stwierdzono obecność kinazy białkowej o masie 120 kDa. Białko to ulega fosforylacji gdy rośliny zostają poddane krótkotrwałemu działaniu w zakresie promieniowania światła niebieskiego [3, 20].

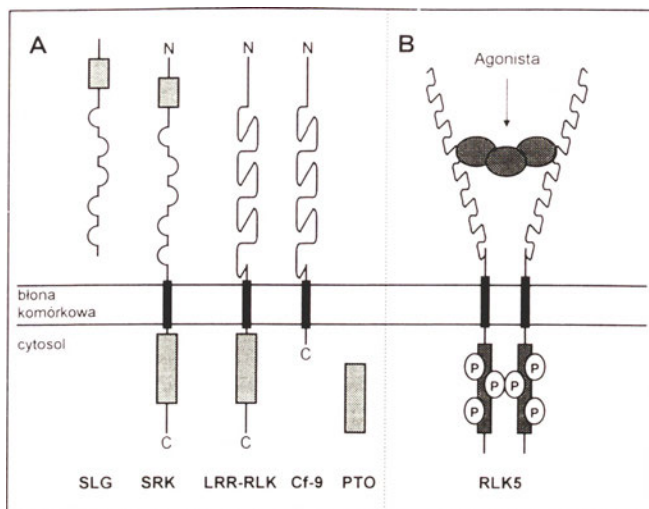
Wydaje się zatem, że światło w różnych typach komórek i na różnym etapie rozwoju roślin może oddziaływać na różne nadrodziny receptorów i indukować różne szlaki przekazywania informacji.

## II-3. Receptory zawierające kinazy białkowe

### II-3.1. Receptoro-podobne kinazy serynowo-treoninowe

W ciągu ostatnich lat, w wielu tkankach roślin wykazano obecność genów homologicznych do tych, które kodują białka receptorowe związane z kinazami tyrozynowymi u zwierząt [21]. W organizmach roślinnych, białka kodowane przez te geny posiadają podobnie jak receptory zwierzęce tylko jedną, pojedynczą

domenę transbłonową, oraz część zewnątrzkomórkową. W części wewnątrzkomórkowej, cytosolowej, występuje domena o aktywności enzymatycznej kinazy serynowo/treoninowej [17, 21]. Pomimo, że białka te zostały scharakteryzowane a ich struktura jest już dobrze poznana, jednak tylko w przypadku kilku z nich wiadomo jakie zewnątrzkomórkowe sygnały na nie działają. Dlatego też białka te nie są nazywane receptorami a jedynie receptoro-podobnymi kinazami (RLKs, z ang.: *receptor-like kinases*) [21] (Ryc. 2).



**Ryc. 2. Receptoro-podobne kinazy białkowe.** A. Receptoro-podobne kinazy białkowe zawierające w części cytosolowej domenę katalityczną o aktywności kinazy serynowo/treoninowej, jedną domenę transbłonową i część zewnątrzkomórkową. SLG, glikoproteina z domeną S; SRK, receptoro-podobne kinazy grupy S; LRR-RLK, receptoro-podobne kinazy zawierające wiele powtarzających się reszt leucynowych; Cf-9 i PTO, białka wywołujące reakcje odpornościowe na pleśń (Cf-9) i patogeny bakteryjne (PTO). B. Zaktywany receptor RLK-5 ulega dimeryzacji i autofosforylacji.

W zależności od budowy domeny zewnątrzkomórkowej łańcucha polipeptydowego, białka te zostały podzielone na trzy grupy: zawierające tzw. domenę S (SRK), liczne powtarzające się reszty leucynowe (LRR) i grupę receptorów o podobnej strukturze jak występująca w receptorach naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) [21, 22]. Katalityczna domena cytosolowa tych białek zawiera kinazę serynowo-treoninową i charakteryzuje się identycznym składem aminokwasów w około 40% (Ryc. 2A).

Kinazy receptoro-podobne pierwszej grupy znaleziono w różnych częściach roślin u kukurydzy, kapusty, rzodkiewnika, a także ryżu. Zewnątrzkomórkowy region łańcucha polipeptydowego tych receptorów stanowi tzw. domenę S podobną do S-domeny glikoproteiny kapusty (*Brassica*). Ponadto, podobnie jak u glikoproteiny, w zewnętrznej części łańcucha polipeptydowego (domena S), bliskiej domenie transmembranowej, występuje 10 reszt cysteinowych [23] (Ryc. 2A). Niektórzy badacze sugerują, że występująca na zewnątrz błony komórkowej S-domena glikoproteiny łączy się z zewnętrzną S-domeną receptoro-podobnej kinazy tworząc heterodimerski receptor.

Receptor ten działa jak bariera, nie pozwalając na samozapłodnienie rośliny [17, 21]. Istotnie, mutanty pozbawione genu *SRK* nie są w stanie odróżnić swojego od nieswojego ziarna pyłku i niezgodność na samozapłodnienie przestaje obowiązywać [24]. Badacze sugerują, że właśnie kompleks glikoproteina-receptor wchodzi w interakcję z pyłkiem kwiatowym i wywołuje ochronną odpowiedź komórki na swój pyłek [21, 24]. Mechanizm tej odpowiedzi jest jednak jeszcze nieznanym.

Druga grupa receptoro-podobnych kinaz charakteryzuje się obecnością w części zewnętrznej łańcucha polipeptydowego powtarzających się reszt leucynowych (Ryc. 2A). Kinazy receptoro-podobne RLK5, TMK i TMKL1 znaleziono u rzodkiewnika (*Arabidopsis*), a PRK1 u petunii (*Petunia*) [21]. Motyw LRR (z ang.: *leucine-reach-repeat*) znaleziono w wielu różnych białkach, pełniących różne funkcje. Wydaje się, że jest on potrzebny dla właściwej interakcji białko:białko. Motyw ten charakteryzuje się następującą sekwencją: Leu-X-X-Leu-X-Leu-X-X-Asn-X-Leu, powtarzającą się wielokrotnie. W projektowanym modelu działania receptoro-podobnej kinazy RLK5 zakłada się, że receptor ten po aktywacji ulega dimeryzacji i autofosforylacji, podobnie jak ma to miejsce w przypadku receptorów zawierających kinazy tyrozynowe u zwierząt (Ryc. 2B). Do tak zaktywowanych receptorów wiąże się białko KAPP (z ang.: *kinase-associated-protein-phosphatase*) [25]. Białko KAPP składa się z trzech regionów: bardzo krótkiej części N-terminalnej związanej z błoną komórkową, domeny wchodzącej w interakcję z kinazą, i w części C-terminalnej domeny katalitycznej o aktywności fosfatazy. Po aktywacji i autofosforylacji receptora, KAPP wiąże się bądź do fosfoseryny, bądź fosfotreoniny, bądź do obu ufosforylowanych reszt aminokwasów [21]. Nie wiadomo jednak, czy wiązanie białka KAPP do receptora RLK5 zachodzi podobnie jak w komórkach zwierzęcych dzięki domenie SH2 białka cytosolowego, wiążącego się z receptorem.

W ostatnim okresie czasu wyizolowano z liści, łodyg, korzeni i kwiatów różnych roślin geny kodujące białka chroniące rośliny przed chorobami wywołanymi przez patogeny roślinne [21]. I tak na przykład gen *Cf-9* koduje transbłonowe białko Cf-9, które charakteryzuje się obecnością 28 powtarzających się reszt leucynowych w domenie zewnątrzkomórkowej, pojedynczą domeną przechodzącą przez błonę komórkową i bardzo krótką domeną C-terminalną po stronie cytosolowej. Zewnątrzkomórkowa domena tego białka wykazuje homologię do podobnej, występującej w białkowej cząsteczce receptoropodobnych kinaz LRR-RLK. Obecność tego białka w liściach pomidorów uodparnia rośliny przeciwko pleśni [26]; jednak w jaki sposób białko Cf-9 przewodzi sygnał nie wiadomo.

Białko Cf-9 nie posiada w części cytoplazmatycznej domeny o aktywności kinazy serynowo-treoninowej

(Ryc. 2A). Natomiast białko cytosolowe PTO, kodowane przez gen *Pto* jest kinazą serynowo-treoninową wiążącą się z błoną komórkową i wywołującą odpowiedź na bakteryjne patogeny [21]. Tłumacząc nieznanym mechanizm przekazywania sygnałów przez te białka, badacze sugerują, że być może białko Cf-9 wiąże się z receptoropodobną kinazą serynowo-treoninową (LRR) lub z cytosolowym białkiem PTO tworząc aktywny kompleks po pobudzeniu przez sygnał zewnętrzny.

Ewentualne tworzenie się kompleksu Cf-9/PTO stanowiłoby analogię do podobnego występującego w układzie immunologicznym ssaków, gdzie białko rozpoznające antygen, charakteryzujące się krótką domeną cytosolową (interleukina-1, IL-1) łączy się z cytosolową kinazą serynowo-treoninową (IRAK) i w efekcie aktywuje czynnik transkrypcyjny (NF- $\kappa$ B). Podobna analogia występuje w układzie odpornościowym u *Drosophila* [27], gdzie pobudzony transbłonowy receptor z krótką domeną cytosolową (Toll) reaguje poprzez białko o nieznanym funkcji z kinazą serynowo-treoninową (Pelle) aktywując następnie poprzez kaskadę reakcji chemicznych czynniki transkrypcyjne w jądrze. Należy dodać, że zewnątrzkomórkowymi sygnałami działającymi na receptor Toll u *Drosophila* są nie tylko patogeny, lecz także we wczesnym stadium embriogenezy określone białko, odpowiedzialne za dalszy rozwój owada (z ang.: *development signal*) [27].

Omówione powyżej kinazy receptoro-podobne bogate w reszty leucynowe, wydają się brać także udział w przewodzeniu sygnałów brassinosteroidów, czy kwasu abscyzynowego [28-30]. Brassinosteroidy i kwas abscyzynowy to związki o właściwościach hormonalnych. Te pierwsze stanowią nową grupę roślinnych hormonów steroidowych, stymulujących wzrost i rozwój roślin (artykuł przeglądowy na temat biosyntezy i metabolizmu tych związków znajdzie czytelnik w jednym z ostatnich numerów Kosmosu [31]). Pod względem budowy chemicznej są one pochodnymi 5 $\alpha$ -cholestanu, a więc wykazują podobieństwo do hormonów steroidowych występujących w świecie zwierząt.

Ostatnio Li i Chory [28] sklonowali gen *BR 1*, który u mutantów rzodkiewnika koduje białko BR 1. Białko to jest transbłonową kinazą serynowo-treoninową typu LLR (Fig. 2A), zawierającą w domenie zewnątrzkomórkowej 25 reszt leucynowych [28, 29]. Ponieważ, jak już wspomniano powyżej, motyw powtarzających się reszt leucynowych sugeruje interakcję białko:białko, nie jest wykluczone, że z białkiem receptorowym BR/1 łączy się nie cząsteczka brassinosteroidu jako taka a związane z nią białko doprowadzające hormon do powierzchni komórki. W podobny sposób z receptorami błon komórkowych łączą się białka transportujące steroidowe hormony płciowe u zwierząt [28].

Z kolei kwas abscyzynowy, hormonalny inhibitor

wzrostu roślin, oddziałuje najprawdopodobniej na kinazę receptoro-podobną (RPK/1), która w zewnątrzkomórkowej domenie wiążącej ligand zawiera tylko 5 powtarzających się reszt leucynowych [30]. Traktowanie *Arabidopsis* przez jedną godzinę kwasem abscyzynowym indukuje ekspresję genu *RPK/1*. Co więcej, raptowna ekspresja tego genu następuje także wtedy, gdy roślina zostaje poddana działaniu stresów środowiskowych, takich jak odwodnienie, niska temperatura, czy zmiany ciśnienia osmotycznego [30].

A zatem pomimo, że drogi przekazywania sygnałów z udziałem receptoro-podobnych kinaz serynowo-treoninowych są u roślin jeszcze dokładnie nie poznane, to wydają się pełnić niezmiernie ważną rolę niedopuszczając do samozapłodnienia, pełniąc funkcje ochronne przeciwko patogenom chorobotwórczym, oraz najprawdopodobniej przewodząc sygnały brassinosteroidów czy kwasu abscyzynowego. Receptory te wydają się także odpowiadać na stres środowiskowy. Analogie z podobnymi systemami sygnałowymi u owadów i ssaków budzą najwyższe zainteresowanie; przypominamy także, że receptor  $TGF\beta$  zawierający kinazę serynowo-treoninową i współdziałający z czynnikiem transformacyjnym  $\beta$ , wydaje się konieczny dla prawidłowego przebiegu cyklu rozwojowego komórek zwierzęcych.

### II-3.2. Receptory zawierające kinazę histydynową

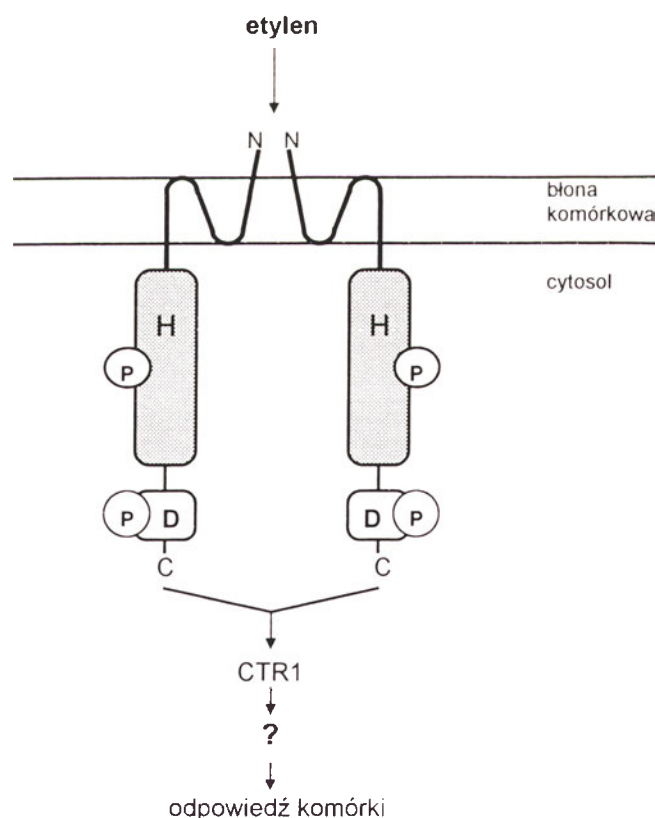
Struktura i funkcja wszystkich powyżej przedstawionych receptorów bazowała na ich podobieństwie do receptorów występujących w komórkach zwierząt. Jednakże w komórkach roślinnych wykazano także obecność receptorów przypominających dwuskładnikowy system receptorowy charakterystyczny dla organizmów bakteryjnych [32].

Dwuskładnikowy system receptorowy u bakterii odpowiada za regulację wielu procesów, takich jak chemotaksja, osmolarność, reakcja na dostępność i stężenie substancji pokarmowych, czy tworzenie przetrwalników [32]. System ten składa się z sensora, zakotwiczonego w błonie i odbierającego sygnały zewnętrzne. W skład sensora wchodzi jako integralna część cząsteczki histydynowa kinaza białkowa. Po zadziałaniu zewnętrznego sygnału, następuje aktywacja kinazy i autofosforylacja reszt histydynowych. Następnie dochodzi do przeniesienia grupy fosforanowej z histydyny na kwas asparaginowy wchodzący w skład drugiej części systemu, która jest białkowym czynnikiem transkrypcyjnym, tzw. regulatorem [3, 33, 34]. U większości bakterii regulator stanowi odrębną część systemu, niekiedy jednak sensor i regulator tworzą połączoną całość.

Ten typowy dla bakterii system receptorowy, zawierający kinazę histydynową został wykryty w komórkach *Arabidopsis thaliana*. Wykazano, że receptory te są aktywowane przez hormony roślinne — prosty gaz, etylen ( $C_2H_4$ ) i cytokiny. Powszechnie uważa się, że

etylen bierze udział w przyspieszeniu dojrzewania owoców, a cytokiny są hormonami odpowiedzialnymi za kiełkowanie roślin, jednak hormony te regulują wiele różnych procesów wzrostu, podziału i różnicowania a również reakcję rośliny na wpływ środowiska.

U rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) gen *ETR1* koduje białko receptorowe będące hybrydą zawierającą połączoną w jedną całość cząsteczkę sensora i regulatora. Sensor zawiera domenę N-terminalną z trzema transbłonowymi fragmentami łańcucha polipeptydowego. Do tych transbłonowych fragmentów wiąże się etylen, a więc wiąże się do receptora w błonie komórkowej [34]. Jest to zrozumiałe, bowiem etylen 14 razy lepiej rozpuszcza się w środowisku lipidowym niż wodnym. Przyłączenie etyleny powoduje dimeryzację receptorów i autofosforylację reszty histydyny znajdującej się w katalitycznej, cytosolowej domenie receptora (Ryc. 3). W cytosolu prócz domeny katalitycznej sensora znajduje się związane z nim białko regulatorowe. Reszta kwasu asparaginowego tego białka ulega również fosforylacji, podobnie jak ma to miejsce u bakterii [13, 33, 34] (Ryc. 3). U *Arabidopsis* wykryto jeszcze inne geny odpowiadające na etylen. Gen *ERS* koduje białko receptorowe ERS. Białko to zawiera



Ryc. 3. Dwusystemowy receptor etyleny, ETR1. Receptor ETR1 zawierający kinazę histydynową. Po związaniu etyleny receptor ulega dimeryzacji i autofosforylacji. Grupa fosforanowa z histydyny (H) zostaje przeniesiona na kwas asparaginowy (D), znajdujący się w drugiej części białka receptorowego. Po aktywacji receptora następuje aktywacja białka CTR1, będącego kinazą serynowo-treoninową. Kaskada kinaz prowadzi do określonej odpowiedzi komórki.



część N-terminalną, homologiczną w 75% z białkiem ETR1. Nie zawiera ono jednak domeny z kwasem asparaginowym [34]. Oba typy receptorów po aktywacji ulegają dimeryzacji i autofosforylacji i reagują z innym występującym w cytosolu białkiem, tzw. CTR1 (Ryc. 3). Białko to jest serynowo/treoninową kinazą białkową podobną do kinazy Raf znajdującej w komórkach zwierzęcych na szczycie kaskady MAP kinaz (MAPKKK) [13].

Cytokiny w komórkach *Arabidopsis* działają na inny receptor, homologiczny jednak do powyżej opisanego [35]. Wyizolowany gen *CKII* koduje w hodowlanych komórkach mutantów białko receptorowe CKII odpowiadające na działanie cytokiny wzmoczoną proliferacją. Białko receptorowe składa się z łączących ze sobą dwóch domen cytosolowych, z których pierwsza zawiera kinazę histydynową a druga kwas asparaginowy. Aktywacja receptora powoduje podobnie jak opisano dla etylenu autofosforylację histydyny a następnie fosforylację kwasu asparaginowego. Jednak, w odróżnieniu od receptora etylenu, w części błonowej występują tu tylko dwa segmenty transmembranowe a łączący je od strony zewnątrzkomórkowej łańcuch polipeptydowy zawiera liczne miejsca ulegające glikozylacji [35].

Należy dodać, że podobny bakteryjny, dwuskładnikowy, szlak przekazywania sygnałów zawierający kinazę histydynową w części sensora, oraz włączający etap przeniesienia grupy fosforanowej z histydyny na kwas asparaginowy w części regulatorowej, wykryto nie tylko u *Arabidopsis* lecz i u innych organizmów eukariotycznych, a mianowicie *Saccharomyces*, *Dictyostelium* i *Neurospora* [36].

### III. Czy fitochrom jest kinazą histydynową? Uwagi końcowe

Niniejsza praca uwidacznia jak bardzo w ciągu ostatnich kilku lat wzrosła wiedza o przekazywaniu sygnałów w komórkach roślinnych. Najlepszym przykładem gwałtownie rozwijającej się wiedzy o receptorach roślinnych są publikacje dotyczące receptorów zawierających kinazę histydynową. Pozwalają one, między innymi, na zmodyfikowanie dotychczasowych wiadomości dotyczących działania fitochromu.

Jak opisano powyżej (podrozdział II-2.2.), w literaturze dotyczącej działania fitochromu istnieją doniesienia wskazujące, że fitochrom odpowiadając na światło ulega fosforylacji. Stwierdzono, że fosforylowana jest znajdująca się w części N-terminalnej łańcucha polipeptydowego reszta seryny [36]. Sądzone jednak, że ta fosforylacja (podobnie jak w przypadku rodopsyny, czy receptorów  $\beta$ -adrenergicznych związanych z białkiem G u zwierząt [6]) prowadzi do desensytyzacji (odwrażliwienia) fitochromu i odbywa się z udziałem kinazy wiążącej się do receptora. Jak wykazano jednak już w połowie lat osiemdziesiątych, cząsteczka fitochromu jako taka ma właściwości kina-

zy [37]. Spostrzeżenie to było jednak trudne do wytłumaczenia i nie uznano je za istotne, ponieważ sekwencja aminokwasów fitochromu różni się znacznie od tej występującej w znanych sekwencjach kinaz serynowo/treoninowych, czy tyrozynowych. Badania lat ostatnich przyniosły jednak informacje o występowaniu w organizmach eukariotycznych bakteryjnej kinazy histydynowej [34-36]. Okazało się, że około 250 aminokwasów znajdujących w części C-terminalnej fitochromu wykazuje podobieństwo do tej kinazy [36]. Co więcej, w 1997 r. ukazały się prace, które dowiodły, że sinice (*Cyanobacteriae*) zawierają fitochrom CphI, będący regulowaną przez światło dwuskładnikową kinazą histydynową [36, 38].

To odkrycie nie pozwoliło już na dalsze lekceważenie poprzednich danych doświadczalnych. Badacze uważają więc, że występujący u roślin fitochrom jest najprawdopodobniej zmienioną w trakcie ewolucji bakteryjną kinazą histydynową. Elich i Chory [36], rozważając mechanizm działania fitochromu sugerują, że kinaza stanowiąca integralną część receptora prowadzi bądź fosforylację seryny, bądź (co jest narazie jedynie spekulacją) fosforylacji ulega histydyna, po czym następuje przeniesienie grupy fosforanowej na resztę seryny.

Pomimo intensywnych badań mechanizm działania fitochromu jest zatem daleki jeszcze od wyjaśnienia. Receptor ten nie może być zaliczony do receptorów zawierających kinazę serynową. Na pytanie: czy fitochrom jest kinazą histydynową? odpowiedź brzmi: jeśli jest, to jest to atypowa kinaza [36]. Nie wykazano bowiem fosforylacji histydyny, a gdyby zachodziła to przeniesienie reszty fosforanowej następowałoby na resztę serynę, a nie na kwas asparaginowy. Nie wiadomo także czy i w jaki sposób fitochrom współdziała z białkiem G.

Reasumując, niniejsza praca pokazuje jak bardzo wzrosła i jak bardzo jest jeszcze niekompletna wiedza o przekazywaniu sygnałów w komórkach roślinnych. Wykazuje, że przekazywanie sygnałów w świecie roślin zawiera wiele elementów podobnych do występujących w świecie zwierząt. Są nimi receptory błonowe, białkowe kinazy i fosfatazy, zależne od potencjału kanały, czy wtórne przekaźniki informacji. Dodatkowo jednak roślinne szlaki przekazywania sygnałów zawierają elementy typowe dla organizmów bakteryjnych, jak dwuskładnikowy system białek receptorowych z kinazą histydynową. Dane te, a szczególnie badania nad fitochromem uwidaczniają, że w procesie ewolucji rośliny wytworzyły swoją własną drogę przekazywania sygnałów w komórce. Jednocześnie, podobieństwo poszczególnych elementów szlaków przekazywania informacji u roślin, bakterii, drożdży, owadów i ssaków wskazuje niezbitcie na jednorodność świata organicznego.

Artykuł otrzymano 18 grudnia 1997 r.  
Zaakceptowano do druku 30 marca 1998 r.

1. Einspahr K J, Thompson G A, Jr (1990) *Plant Physiol* **93**: 361-366
2. Czarny M, Poddana H, Barańska J (1992) *Post Biochem* **38**: 107-112
3. Trewavas AJ, Malno R (1997) *Plant Cell* **9**: 1181-1195
4. Praca zbiorowa (1997) W: Nowak J Z, Zawilska J B (red) Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja. PWN, Warszawa
5. Praca zbiorowa (1995) W: Konarska L (red) Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. PWN, Warszawa
6. Barańska J (1997) W: Nowak J Z, Zawilska J B (red) Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja. PWN, Warszawa str. 28-41
7. Ward JM, Pei Z-M, Schroeder J I (1995) *Plant Cell* **7**: 833-844
8. Napier RM, Venis MA (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 72-75
9. Millner PA (1995) *Curr Opin Cell Biol* **7**: 224-231
10. Mac Donald H, Henderson J, Napier R M, Hawes C, Lazarus C M (1994) *Plant Physiol* **105**: 1049-1057
11. Klambt D (1991) *Plant Mol Biol* **6**: 1045-1053
12. Trewavas AJ, Gilroy S (1991) *Trends Genet* **7**: 356-361
13. Hirt H (1997) *Trends Plant Sci* **2**: 11-15
14. Tretyn A (1996) *Post Biochem* **42**: 57-64
15. Bowler C, Chua N-H (1994) *Plant Cell* **6**: 1529-1541
16. Furuya M, Schafer E (1996) *Trends Plant Sci* **1**: 301-307
17. Barbier-Brygoo H, Joyard J, Pugin A, Ranjeva R (1997) *Trends Plant Sci* **2**: 214-233
18. Neuhaus G, Bowler C, Kern R, Chua N-H (1993) *Cell* **73**: 937-952
19. Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, Chua N-H (1994) *Cell* **77**: 73-81
20. Deng X-W (1994) *Cell* **76**: 423-426
21. Braun DM, Walker JC (1996) *TIBS Trends Biochem Sci* **21**: 70-73
22. Walker JC (1994) *Plant Mol Biol* **26**: 1599-1609
23. Nasrallah JB, Nasrallah ME (1993) *Plant Cell* **5**: 1325-1335
24. Nasrallah JB, Stein JC, Kandasamy MK, Nasrallah ME (1994) *Science* **266**: 1505-1508
25. Stone JM, Collinge MA, Smith RD, Horn MA, Walker JC (1994) *Science* **266**: 793-796
26. Jones DA, Thomas CM, Hammod-Kosack KE, Balini-Kurti PJ (1994) *Science* **266**: 789-793
27. Wilson I, Vogel J, Somerville S (1997) *Curr Biol* **7**: R175-R178
28. Li J, Chory J (1997) *Cell* **90**: 929-938
29. Ecker JR (1997) *Cell* **90**: 825-827
30. Hong SW, Jon JH, Kwak JM, Nam HG (1997) *Plant Physiol* **113**: 1203-1212
31. Bajguz A, Czerpak R (1997) *Kosmos* **46**: 259-268
32. Parkinson JS (1993) *Cell* **73**: 857-871
33. Swanson RV, Simon MI (1994) *Curr Biol* **4**: 234-237
34. Chang C (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 129-133
35. Kakimoto T (1996) *Science* **274**: 982-985
36. Elich TD, Chory J (1997) *Cell* **91**: 713-716
37. McMichael RW, Lagarias JC (1990) *Curr Topics Plant Biochem Physiol* **9**: 259-270
38. Yeh K-C, Wu S-H, Murphy JT, Lagarias JC (1997) *Science* **277**: 1505-1508

## CD45, antygen z aktywnością fosfatazową, budowa; działanie i rola w aktywacji limfocytów T

### The CD45 antygen with phosphatase activity; structure and function in the T-cell activation

IWO BOHR<sup>1</sup>  
JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA<sup>2</sup>

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura molekularna CD45
- III. Powiązania strukturalno-funkcjonalne poszczególnych domen CD45
- IV. Zakończenie

**Wykaz stosowanych skrótów:** CD — kompleks różnicujący (ang. *cluster of differentiation*); CD45AP — białko związane z CD45 (ang. *CD45 associated protein*); EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy (ang. *epidermal growth factor*); gp — gli-

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Molecular structure of CD45
- III. Relations between structure and function of particular domains of CD45
- IV. Concluding remarks

koproteina (ang. *glykoprotein*); LCA — wspólny czynnik leukocytów (ang. *leucocyte common antygen*); LPAP — fosfobiałko limfocytów związane z fosfatazami (ang. *lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein*); MHC — białko zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*); N-CAM — (ang. *neutral cell adhesion molecule*); PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostowy (ang. *platelet derived growth factor*); PLC — fosfolipaza C (ang. *phospholipase C*); PKC — kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*); TCR — receptor limfocytów T (ang. *T-cell receptor*).

<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> prof. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

## I. Wstęp

Obszerna wiedza o kinazach fosfoproteinowych i ich kluczowym znaczeniu w regulacji przemian metabolicznych w ostatnim dziesięcioleciu została uzupełniona wynikami intensywnie prowadzonych badań nad fosfotazami fosfoproteinowymi [1-3].

Fosfotazy fosfoproteinowe można podzielić na dwie grupy: enzymy specyficzne w stosunku do miejsc tyrozynowych (typu I) oraz do miejsc serynowych i treoninowych białek (typu II). Wśród populacji fosfotaz typu I można wyróżnić podpopulacje białek rozpuszczalnych (cytosolowych, jądrowych itp.), jak i typu receptorowego, które ogólnym planem budowy przypominają receptory błonowe wykazujące aktywność kinazową specyficzną do miejsc tyrozynowych. Tego typu kinazami są tak ważne i dobrze poznane białka błonowe, jak receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), insulinopodobnego czynnika wzrostu, płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) itp. Szeroki przegląd dotyczący fosfotaz typu I zarówno rozpuszczalnych, jak i receptorowego planu budowy związanych z aktywacją limfocytów znajdzie czytelnik w pracy [4].

W okresie od 1988 do 1992 roku wyodrębniono i scharakteryzowano 30 różnych fosfotaz fosfoproteinowych, i sklonowano 15 fosfotaz typu receptorowego cyt. za [5, 6].

Do znaczących osiągnięć w dziedzinie poznania molekularnych właściwości fosfotaz fosfotyrozynowych można zaliczyć określenie krystalicznej struktury fosfotazy fosfotyrozynowej z serca wołu [7], następnie

z wątroby wołowej [8] oraz poznanie powiązań strukturalno-funkcjonalnych sekwencji centrum katalitycznego [9, 10]. Wykazanie w 1988 roku wysokiej homologii (sięgającej 40%) cytosolowych domen CD45 z sekwencją domeny katalitycznej fosfotazy PTB1B pochodzącej z łożyska ludzkiego [11] przyczyniło się do wykrycia aktywności fosfotazowej CD45 [12] i było przełomowym wydarzeniem w badaniach jego roli w procesach immunologicznych. Poza tym, odkrycie to, jako pionierskie, otworzyło drogę do badań innych białek transmembranowych o aktywnościach fosfotazowych.

Antygen CD45 jest transmembranową glikoproteiną występującą na powierzchni wszystkich jądrzastych komórek hematopoetycznych, w tym na niedojrzałych erytrocytach. Zanika on natomiast w ich formach dojrzałych i nie występuje na powierzchni płytek krwi [13]. W tabeli 1 podano wykaz fosfotaz transmembranowych i cytosolowych typu I występujących w komórkach hematopoetycznych [14-30].

Zanim antygenowi CD45 została nadana obecnie obowiązująca nazwa był nazywany w następujący sposób: LCA, B-220, T-200, Ly-5 [13, 31-34]. Źródłowość każdej z nich nawiązują do innej charakterystycznej cechy tego białka. LCA- jest skrótem od angielskiej nazwy *leucocyte common antigene*. Nazwa B-220 i T200 odzwierciedla stan wiedzy sprzed 20 lat, kiedy różne izoformy CD45 traktowano jako odrębne białka i postać o masie 220 kD występującą na powierzchni limfocytów B nie utożsamiano z różnymi izoformami enzymu występującymi na limfocytach T. Symbolem Ly-5 był oznaczany homologiczny antygen

**Tabela 1.**

Wykaz fosfotaz fosfoproteinowych występujących w komórkach hematopoetycznych.

Nazwa		Występowanie	Odnosnik literaturowy
Transmembranowe	CD45	Wszystkie komórki hemopoetyczne	[3, 6-19]
	PTP $\alpha$	Szeroko rozpowszechnione	
	PTP $\epsilon$	Szpicik kostny	
Cytosolowe	SHP	Komórki limfoidalne i mieloidalne	[19-31]
	PTPIC, HCP, SHC, PTPH	Komórki limfoidalne i mieloidalne	
	He PTP	Komórki limfoidalne	
	TC-PTP	Szeroko rozpowszechnione	
	PTP 1B	Szeroko rozpowszechnione	
	MEG-1	Megakariocyty	
	MEG-2	Megakariocyty	
	cdc25	Szeroko rozpowszechnione	
	PAC-1	Komórki limfoidalne	

podlegający ekspresji w mysich leukocytach.

O ważności CD45 w procesach immunologicznych, świadczyć może chociażby jego wysoki, mniej więcej dziesięcioprocentowy udział w całkowitej masie powierzchniowych glikoprotein limfocytów, a przede wszystkim potwierdzony w wielu układach doświadczalnych fakt niezbędności tego antygeny w procesie aktywacji limfocytów B i T oraz komórek NK i makrofagów. Eksperymenty, przeprowadzane z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej wykazały brak procesów aktywacji w liniach komórek nowotworowych nie wyrażających CD45 (np. Jurkat, HPB.ALL) oraz korelację między przywróceniem zdolności ekspresji tego antygeny, a pojawieniem się zdolności do aktywacji. Eksperymenty te zostały dokładniej opisane w różnych artykułach przeglądowych [31, 35-38]. Warto wspomnieć, że oprócz tego CD45 odgrywa znaczącą rolę w procesach apoptozy limfocytów i dojrzewania tymocytów w grasicy [39-41]. Udział CD45 w apoptozie i dojrzewaniu wydaje się być oczywisty w świetle tego, że zarówno w procesie aktywacji, apoptozy, jak i dojrzewania tymocytów bierze udział podobny zestaw antygenów powierzchniowych tych komórek oraz białek zaangażowanych w procesy przekazywania wewnątrzkomórkowego. Podobieństwa oraz różnice w przebiegu tych procesów, problem określania punktów dywergencji oraz konwergencji poszczególnych ciągów przemian wtórnego przekazywania w nie zaangażowanych są od pewnego czasu przedmiotem intensywnych badań [42-45].

## II. Struktura molekularna CD45

W połowie lat osiemdziesiątych określono pierwszorzędną strukturę CD45 szczura, myszy i człowieka z sekwencji nukleotydowej DNA [46-49].

Charakterystyczną cechą budowy molekularnej CD45 jest obecność w domenie zewnątrzkomórkowej produktów trzech N-terminalnych egzonów (oznaczanych jako 4, 5, 6 lub A, B, C) podlegających procesowi zróżnicowanego składania (*alternative splicing*). W zależności od wersji w jakiej została złożona dana izoforma CD45, jego masa cząsteczkowa może przyjmować wartości z zakresu 180-220 kD [13, 31].

Wielkość masy cząsteczkowej zależy także od stopnia glikozylacji enzymu, uwarunkowanej obecnością reszt aminokwasowych ulegających glikolizacji, co z kolei jest również związane z rodzajem złożenia egzonów podlegających zjawisku alternatywnego składania. Procesowi N- i O-glikozylacji mogą bowiem podlegać produkty ekspresji eksonów 3-8. Od sposobu glikozylacji uzależniony jest następujący po niej proces sjalilacji, który wpływa wydatnie na zmiany ładunku i całkowitej długości cząsteczki CD45. W zależności od rodzaju izoformy enzymu podlegającej ekspresji, długość cząsteczki białka waha się w szerokim przedziale od 28 do 55 nm. Dane te uzyskano przy pomocy obserwacji mikroskopowych [50].

Stwierdzono również zależności pomiędzy rodzajem izoformy (a co za tym idzie długością łańcucha cukrowcowego) podlegającej ekspresji w limfocytach, a ich stanem czynnościowym. Proces aktywacji limfocytów T powoduje przełączenie prowadzące do zmiany ekspresji CD45 z izoformy wysokocząsteczkowej na niskocząsteczkową [51]. Informacje o mechanizmach takiego przełączania ekspresji dokonującego się z udziałem czynnika transhamującego opisany został w artykule Rothsteina i wsp. [52]. W innych komórkach hematopoetycznych nie stwierdzono zróżnicowania ekspresji opisywanego antygeny. I tak w limfocytach B syntetyzowana jest jedynie ich forma wysokocząsteczkowa o masie 220 kD, podczas gdy makrofagi wyrażają formę niskocząsteczkową [53].

Wspomnieć jeszcze wypada, że występowanie powstających w wyniku splicing'u odpowiednich form CD45 koreluje także z innymi poza aktywacją limfocytów zjawiskami, takimi jak dojrzewanie limfocytów w grasicy i procesy apoptozy zachodzące w różnych stadiach rozwojowych tych komórek. I dla przykładu rozwijające się w grasicy tymocyty CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> znakują się formą niskocząsteczkową [38]. Do identyfikacji izoform stosuje się przeciwciała monoklonalne o wysokim powinowactwie do poszczególnych produktów splicing'u, stąd też przyjęło się nazewnictwo pochodzące od nazw tych przeciwciał. Większość autorów przyjmuje, że liczba możliwych złożań tych egzonów u człowieka wynosi 8, tak więc mamy odpowiednio formy wiążące specyficznie przeciwciała dla wysokocząsteczkowej postaci enzymu zapisywane są w postaci CD45R(ABC) dla formy wysokocząsteczkowej, CD45R(0) dla formy niskocząsteczkowej, a dla form pośrednich (posiadających tylko jeden lub dwa egzony) np. CD45R(A) [31] itp.

W obrębie domeny zewnątrzkomórkowej CD45 za regionem podlegającym glikozylacji (rozpatrując polipeptyd od N-końca) znajdują się dwa rejony bogate w reszty cysteinowe [54]. Poza tym stwierdzono, że niektóre domeny części zewnątrzkomórkowej wykazują pewne podobieństwo do cząsteczek adhezyjnych N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) [55].

W skład mało zmiennej części wewnątrzkomórkowej, która stanowi 2/3 długości łańcucha polipeptydowego CD45, wchodzi około 700 reszt aminokwasowych. Znajdują się to dwie domeny o sekwencji charakterystycznej dla centrum katalitycznego fosfotaz fosfotyrozynowych: D1 — proksymalna w stosunku do błony komórkowej i D2 — dystalna w stosunku do błony, przedzielone sekwencją kilkudziesięciu aminokwasów [13], przy czym aktywność katalityczną wykazuje głównie domena D1. Opinie badaczy co do ewentualnego udziału domeny D2 w procesie katalitycznym są podzielone [31, 56-60]. Sekwencja aminokwasów centrum katalitycznego, jak i mechanizm działania jest w dużym stopniu konserwatywny dla wszystkich fosfotaz fosfotyrozynowych. Nie jest ona natomiast homologiczna do domeny katalitycznej

fosfotaz typu II, co świadczy o braku pokrewieństwa pomiędzy fosfotazami typu I i II. Jest to o tyle ciekawe, że obydwa typy są spokrewnione ze sobą [3, 58]. Cechą charakterystyczną domeny katalitycznej wszystkich fosfotaz typu I jest występowanie konserwatywnego motywu o długości około 250 reszt aminokwasowych. W obrębie tej stosunkowo długiej sekwencji najważniejszą rolę pełni odcinek „minimum” tworzący pętlę katalityczną (obecny jest on także w tzw. niskocząsteczkowych fosfotazach fosfotyrozynowych o masie około 18 kD). Zawiera on resztę cysteinową w następującym motywie consensusowym: I/VHCxAG-xxRS/TG (x-oznacza dowolną resztę aminokwasową). Liczne badania wykazały udział reszty cysteinowej w procesie katalizy w charakterze czynnika nukleofilowego; umożliwiającego stworzenie przejściowego wiązania z fosforem grupy ortofosforanowej. Szersze informacje na temat roli poszczególnych reszt aminokwasowych w mechanizmie katalizy może czytelnik znaleźć w pracy Zhanga i wsp. [10], Barforda [9], Davisa i wsp. [61] oraz częściowo w pracach przeglądowych Charbonneau i Tonksa oraz Schaapvelda [3, 6].

Domena wewnątrzkomórkowa może podlegać fosforylacji typu II. Wielkim postępem wydaje się być podjęcie przez Kanga i wsp. [62] próby rozwiązania nietłatego zadania określenia lokalizacji miejsc fosforylacji *in vitro* i *in vivo*. Badania przeprowadzono z użyciem szeregu klasycznych i nowoczesnych metod (jak np. *matrix-assisted laser desorp-*

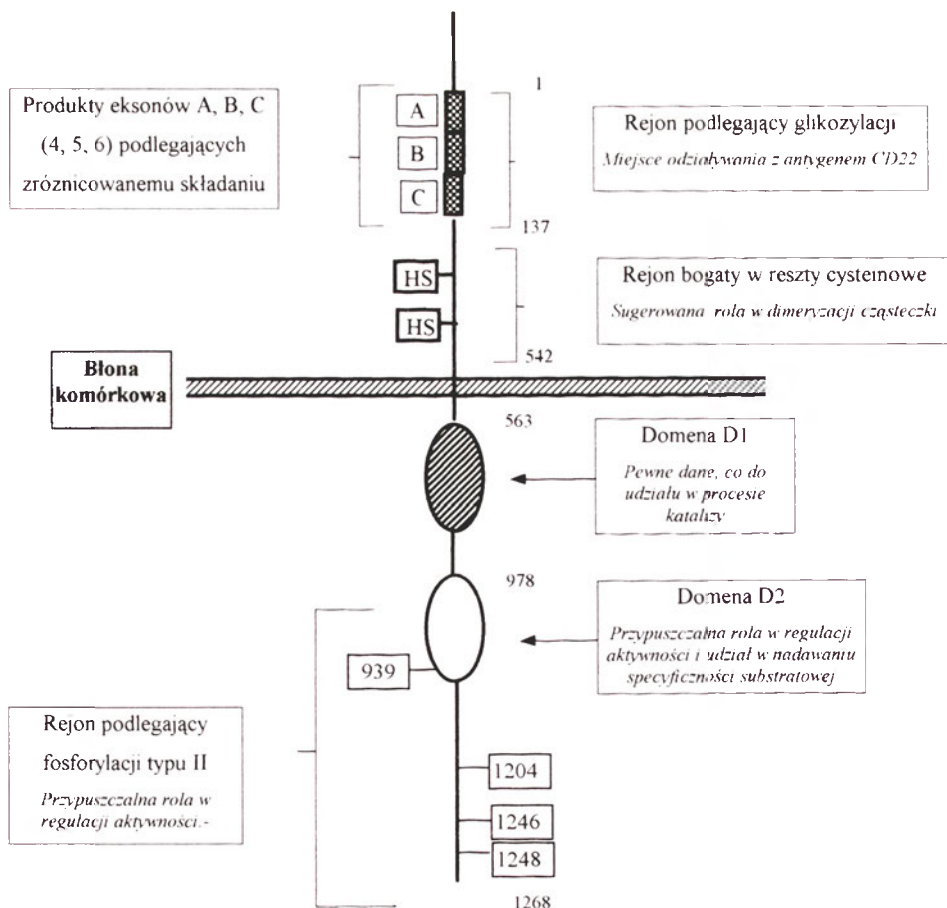
*tion/ionization mass spectrometry*). Dzięki ich zastosowaniu udało się zidentyfikować 4 miejsca fosforylacji typu II *in vivo*, jednym z nich jest miejsce Ser 939 znajdujące się w obrębie domeny katalitycznej D2. W fosforylacji *in vitro* tego miejsca uczestniczy PKC. W obrębie C-końcowej partii tzw. „ogona” występują jeszcze 3 miejsca fosforylacji zachodzącej *in vivo*, przy czym nie ustalono jaka z kinaz katalizuje fosforylację *in vivo* tych reszt [62]. Oprócz miejsc fosforylacji II zidentyfikowano także miejsca dla fosforylacji I [38, 63].

Charakterystyczną cechą wewnątrzkomórkowej domeny CD45 jest występowanie długiego (ok. 100 aminokwasów) „ogona” peptydowego ciągnącego się za domenami D1 i D2. Na rysunku przedstawiono schemat struktury antygeny CD45 (Ryc. 1).

### III. Powiązania strukturalno-funkcjonalne poszczególnych domen CD45

Ogólny plan budowy CD45 przypomina plan budowy receptorów błonowych wykazujących aktywność kinaz fosforyzowanych. Ponadto domena zewnątrzkomórkowa opisywanego antygeny posiada pewne domeny homologiczne do domen odpowiedzialnych w innych białkach za wiązanie specyficznych ligandów.

Fakty te skłoniły wielu badaczy do poszukiwania cząsteczek spełniających taką funkcję w odniesieniu do CD45. Jak dotychczas mimo intensywnych poszukiwań nie udało się znaleźć cząsteczki, która by spełniała



Ryc. 1. Schemat budowy molekularnej antygeny CD45. Po prawej stronie schematu podano numery wskazujące na pozycje reszt aminokwasowych w stosunku do N-końca, liczby w ramkach oznaczają reszty aminokwasowe (Ser bądź Thr) podlegające fosforylacji typu II. Szczegóły w tekście.

kryteria specyficznego liganda domeny zewnątrzkomórkowej wpływającego na aktywność enzymatyczną domeny wewnątrzkomórkowej. Przez jakiś czas antygen CD22 podlegający ekspresji na powierzchni limfocytów B uznawany był za czynnik specyficznie się z nią wiążący. Wkrótce jednak okazało się, że CD22 jako lektyna wiąże się niespecyficznie z wszystkimi cząsteczkami zawierającymi w swej budowie  $\alpha$  2,6 kwas sjałowy [64-67]. Poza tym uzyskane do tej pory dane wskazują na brak udziału domeny zewnątrzkomórkowej w przenoszeniu pobudzenia poprzez błonę komórkową, a więc w realizacji podstawowej czynności charakterystycznej dla klasycznych receptorów błonowych. Innymi słowy aktywność fosfotazowa domeny wewnątrzkomórkowej nie zależy najprawdopodobniej od stanu czynnościowego domeny zewnątrzkomórkowej CD45. To, że sygnał zewnątrzkomórkowy nie jest w ogóle konieczny dla aktywacji enzymu świadczy fakt, że CD45 wyizolowany z błony i nie związany z żadnym ligandem wykazuje wysoką konstytutywną aktywność hydrolityczną [66, 68]. Ponadto dla aktywności i funkcji CD45 obojętny jest rodzaj części zewnątrzkomórkowej. Udowodniono to przy pomocy doświadczeń, w których tworzono chimeryczne białka. I tak na przykład komórki posiadające domenę wewnątrzkomórkową CD45 skojarzoną z domeną zewnątrzkomórkową kinazy p60<sup>c-src</sup> zachowały zdolność do aktywacji na skutek stymulacji receptora TCR przeciwciałami. Podobne wyniki uzyskano w wypadku białka hybrydowego posiadającego zewnątrzkomórkową domenę MHC klasy I [69-71]. Ciekawsze wyniki dały doświadczenia z chimerą CD45-REGF. W sytuacji braku podawania EGF wyniki doświadczenia były podobne do poprzednio opisanych. Natomiast podanie tego czynnika wzrostowego jednocześnie ze stymulacją receptora limfocytów T owocowało zmniejszeniem poziomu aktywacji limfocytów, najprawdopodobniej na skutek dimeryzacji zewnątrzkomórkowych domen pochodzących z receptora dla EGF. Można więc przypuszczać, że dimeryzacja chimer CD45REGF wpływa na rozprężenie aktywacji TCR ze szlakiem sygnalizacji prowadzącej do aktywacji limfocytów, najprawdopodobniej przez wyłączenie aktywności fosfatazowej opisywanej chimery). W tym miejscu przypomnieć można, że dimeryzacja natywnej cząsteczki zewnątrzkomórkowej domeny REGF powoduje indukcję przekaznictwa (a nie hamowanie jak w wypadku CD45) na skutek włączenia aktywności kinazowej (cyt. za 38).

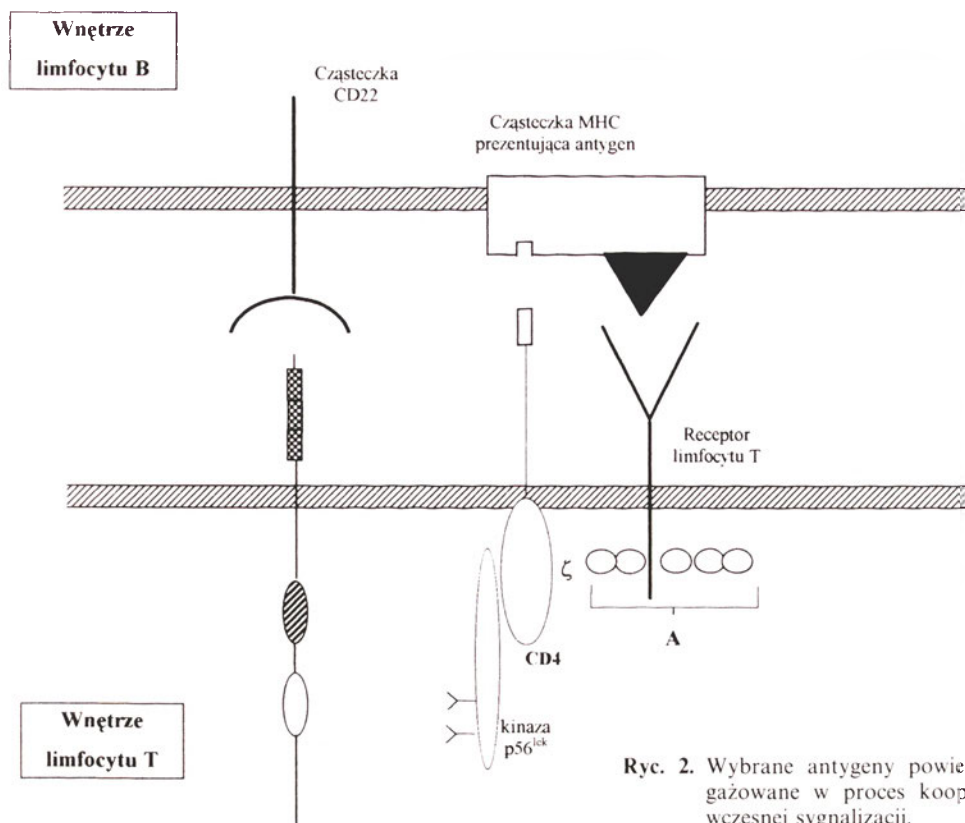
Obecne w natywnej domenie zewnątrzkomórkowej CD45 regiony bogate w reszty cysteinowe mogłyby służyć potencjalnej dimeryzacji. Jednak trzeba podkreślić, że takiego zjawiska nie zaobserwowano w odniesieniu do natywnego antygeny [54]. Poszukiwania naturalnego, specyficznego liganda nadal jednak trwały. W ich wyniku powstał dosyć długi rejestr różnych białek, które oddziałują z domeną zewnątrzkomórkową lub domeną wewnątrzkomórkową antygeny

CD45 (oddziaływania z częścią wewnątrzkomórkową są szerzej omówione w następnym podrozdziale). Wśród substancji endogennych, dla których stwierdzono oddziaływanie z domeną zewnątrzkomórkową CD45 jest glikoproteina gp 116 [72]. Istnieją również dane świadczące o możliwości oddziaływania natury adhezyjnej CD45 na powierzchni komórek hematopoetycznych znajdujących się w szpiku kostnym ze składnikiem substancji międzykomórkowej — siarczanem heparanu [73].

Dotychczas zgromadzone dane doświadczalne wydają się wskazywać na utratę przez domenę zewnątrzkomórkową CD45 w ciągu molekularnej ewolucji funkcji transmitowania sygnału na rzecz regulacji siły oddziaływania, pomiędzy receptorami generującymi sygnał I (TCR, CD4) i prezentowanym za pośrednictwem MHC antygenem. Niewyjaśnioną kwestią, jak dotychczas pozostaje, czy głównym czynnikiem regulującym oddziaływanie identyfikacyjne jest zależny od izoformy ujemny ładunek reszt kwasu sjałowego, czy stwarzany przez te ugrupowania zmienny dystans pomiędzy kooperującymi komórkami [38, 74].

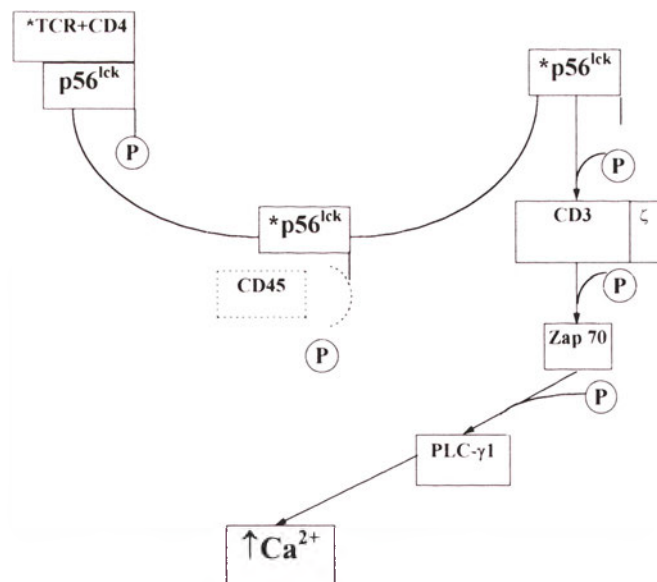
Z doświadczeń z użyciem różnych monoklonalnych przeciwciał specyficznych w stosunku do różnych regionów CD45 wynika, że związanie niektórych z nich powoduje zahamowanie proliferacji zarówno limfocytów T, jak i produkcji immunoglobulin przez limfocyty B. Pewne przeciwciała mogą jednak stymulować proliferację indukowaną czynnikami mitogennymi *in vitro*, a jeszcze inne przeciwdziałać agregacji komórkowej [76, 77]. Wyniki eksperymentów z chimerami prowadzą wprost do wniosków o dominującej „mechanicznej” roli domeny zewnątrzkomórkowej CD45 w identyfikacji immunologicznej. Natomiast doświadczenia z przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla różnych rejonów CD45 nie stoją w sprzeczności z tą tezą, częściowo ją nawet potwierdzając. Nie wykazały one bowiem bezpośredniego wpływu wiązania przeciwciał do opisywanej domeny na aktywność fosfotazową, natomiast wykazały negatywne oddziaływanie na agregację komórkową, a więc zjawiska koniecznego do zajścia procesu kooperacji immunologicznej komórek.

O ile w przypadku domeny zewnątrzkomórkowej powiązanie poszczególnych domen z ich funkcją wciąż jeszcze nie jest do końca wyjaśnione, o tyle w odniesieniu do domeny wewnątrzkomórkowej możemy powiedzieć, że funkcja przynajmniej jednej domeny — D1 jest dobrze poznana. Pewne jest jak to już to zostało zasygnalizowane na początku tego artykułu, że domena ta bierze udział w przekazywaniu informacji od zaktywowanego TCR na inne białka, co ostatecznie prowadzi w głównej mierze do aktywacji genomu. Najpierw jednak ma miejsce sekwencja procesów tzw. wczesnej sygnalizacji opartej na odwracalnej fosforylacji reszt fosfotyrozynowych białek najczęściej sprzężonych z odgrywającymi centralną rolę w procesach wczesnej sygnalizacji transmembranowymi białkami



Ryc. 2. Wybrane antygeny powierzchniowe i enzymy podblonowe zaangażowane w proces kooperacji limfocytów B i T oraz zjawiska wczesnej sygnalizacji.

TCR i CD4 [38] (patrz też Ryc. 2). Sekwencja wydarzeń zachodzących w ramach procesu wczesnej sygnalizacji jest przedstawiona na rycinie 3. Proces ten kończy się przełączeniem na sygnalizację typu II związaną z odwracalną fosforylacją miejsc serynowych i treoninowych białek prowadzącą do mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. „Zwrotnicą” powodującą przełączenie między tymi dwoma szlakami jest



Ryc. 3. Sekwencja wydarzeń prowadzących do aktywacji PLC- $\gamma$ 1 i mobilizacji jonów wapnia w limfocytach T — reszta ortofosforanowa związana z odwracalną fosforylacją typu I, linią ciągłą pznaczone procesy fosforylacji, linią przerywaną, procesy defosforylacji. \*TCR + CD4 — zaktywowany kompleks receptora TCR i antygeny CD4 (dotyczy limfocytów T-pomoocniczych), \*p56<sup>lck</sup> — zaktywowana kinaza lck,  $\uparrow Ca^{2+}$  — podwyższony poziom jonów wapnia wewnątrzkomórkowego. Szczegóły w tekście.

jedną z izoform fosfolipazy C-PLC $\gamma$ 1.

Z ryciny 3 wynika, że specyficznymi substratami dla wewnątrzkomórkowej domeny D1 CD45 wykazującej aktywność fosfotazową są kinazy z rodziny src, przy czym w samym systemie nie budzi wątpliwości udział jedynie p56<sup>lck</sup>, podczas gdy rola bardzo podobnej do niej kinazy p59<sup>lyn</sup> nie jest jak dotąd do końca wyjaśniona. Jak sugeruje Neel, [4] p56<sup>lck</sup> mogłaby być kinazą o niższym powinowactwie i stanowić jak gdyby odwodową linię sygnalizacyjną uruchamianą „awaryjnie”. W ten sposób przyczyniać miałyby się do dodatkowego wzmocnienia sygnału. Warto nadmienić, że jak dotąd obydwie kinazy są jedynymi zidentyfikowanymi naturalnymi substratami dla całej populacji fosfotaz typu receptorowego [6]. Katalizowana przez CD45 defosforylacja konserwatywnej reszty aminokwasowej (Tyr505) kinazy p56<sup>lck</sup> prowadzi do aktywacji enzymu i umożliwia najpierw fosforylację podjednostki  $\xi$  kompleksu CD3, a następnie ufosforylowania kinazy Zap70, która ostatecznie doprowadza do ostatniego etapu wczesnej sygnalizacji poprzez — fosforylację PLC $\gamma$  [42, 44-46]. Skoro jednak nie stwierdzono udziału domeny zewnątrzkomórkowej w procesie włączania i wyłączania aktywności enzymu, to narzuca się pytanie: dzięki jakiemu mechanizmowi nie dochodzi do ciągłej defosforylacji kinazy p56<sup>lck</sup> i ciągłej mobilizacji wapnia? Najprawdopodobniej jeden z mechanizmów regulacyjnych polega na zwrotnym zahamowaniu aktywności CD45 poprzez podwyższony poziom wapnia wewnątrzkomórkowego. Dzieje się tak na skutek aktywacji fosfotazy fosfoproteinowej typu II kalcyneuryny, enzymu zależnego od wapnia i kalmoduliny [13]. Poza tym czyn-

nikiem nie dopuszczającym do ciągłej indukcji wczesnej sygnalizacji jest niedostępność kinazy p56<sup>lck</sup>, która w stanie spoczynku jest związana z antygenem CD4. Zmiana konformacji CD4 na skutek oddziaływania z MHC kooperującej komórki powoduje spadek jego powinowactwa do kinazy p56<sup>lck</sup> i jej udostępnienie dla fosfotazy CD45 [26].

Kwestią otwartą jest sprawa braku absolutnej specyficzności D1 CD45 do kinaz typu src. Stwierdzono bowiem, że fosfotaza ta wykazuje również aktywność w stosunku do takich sztucznych substratów jak fosforan modyfikowanego chemicznie lizozymu, chociaż aktywność jej jest znacznie niższa niż innych fosfotaz [11]. Przypuszcza się, że różne sekwencje rozbudowanego C-końca mają na celu m.in. zapewnienie wysokiego powinowactwa w stosunku do substratu. Taką rolę przypisywano przede wszystkim domenie D2. Miałyby ona rozpoznawać określone sekwencje i łączyć się z nimi umożliwiając prowadzenie katalizy domenie D1, sama pozostając milczącą katalitycznie.

Pewną rolę w regulacji aktywności enzymatycznej oraz w regulowaniu dostępności substratu mogą również odgrywać interakcje domeny wewnątrzkomórkowej z różnymi białkami. Najpoważniejszym kandydatem do spełniania takich ww. funkcji jest białko CD45AP (CD45-associated protein) o masie 32 kD zwane również CD45AP [78]. W jego przypadku na podstawie budowy, można nawet formułować przypuszczenia do charakteru jej działania, ponieważ posiada ono domenę WW, podobną w charakterze funkcjonalnie do domeny SH3. Sekwencja WW też bowiem jest odpowiedzialna za rozpoznawanie podobnych sekwencji białkowych (bogaty w reszty proliny). CD45AP mogłoby więc rekrutować białek do miejsca rozpoznawanego przez WW. Być może zadaniem CD45AP jest zbliżanie enzymu do jego substratu- kinazy p56<sup>lck</sup>. Stwierdzono także oddziaływanie CD45 z białkiem cytoszkieletarnym-fodryną [4].

Otwarty pozostaje ciągle problem określenia roli innych poza wskazanymi kinazami endogennych substratów. Istnieją dane, że takim substratem mogłoby być wspomniene wyżej białko CD45AP. Poza tym wskazuje się na podjednostkę ζCD3 jako na fosfoproteinę mogącą odgrywać taką rolę [79], albowiem białko to jest substratem dla aktywowanej przez CD45 kinazy p56<sup>lck</sup> (patrz Ryc. 3).

#### IV. Zakończenie

Z omówionych wyżej prac wynika iż w okresie ostatnich dziesięciu lat, tzn. od wykrycia w 1988 roku aktywności fosfotazowej domeny D1 poznawano dosyć szczegółowo jego strukturę i rolę w procesach wczesnej sygnalizacji w limfocytach T. Podkreślić w tym miejscu należy, że CD45 pełni ważną rolę także w procesach sygnalizacyjnych przebiegających w innych leukocytach, jednak z uwagi na ograniczone

rozmiary tego artykułu zawężono jego treść do procesów zachodzących w trakcie aktywacji limfocytów T.

Ciekawą, choć wciąż nie w pełni potwierdzoną wydaje się być hipoteza o utracie funkcji transmitowania sygnału z zewnątrz do wnętrza komórki przez domenę zewnątrzkomórkową CD45 na rzecz regulacji siły oddziaływania pomiędzy kooperującymi komórkami.

Artykuł otrzymano 20 października 1997 r.  
Zaakceptowano do druku 30 marca 1998 r.

#### Piśmiennictwo

1. Taylor SS, Knighton DR, Zhang J, Eyck LFT, Sovadski J (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**: 429-462
2. Shenolikar S, Nairu AC (1991) W: Greengard P, Robinson GA (red) *Protein Phosphatases*. t. 21. Raven Press Ltd, New York
3. Charbonneau H, Tonks K (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**: 463-493
4. Neel BG (1997) Role of phosphatases lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **9**: 405-420
5. Walton KM, Dixon JE (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 101-120
6. Schaapveld R, Wieringa B, Hendriks W (1997) Receptor-like protein tyrosine phosphatases: alike and yet so different. *Mol Biol Rep* **24**: 247-262
7. Zhang ZY, Van Etten RL (1990) *Arch Biochem Biophys* **282**: 39-49
8. Su X-D, Taddel N, Stefani M, Ramponi G, Nordlund P (1994) *Nature (Lond)* **370**: 575-578
9. Barford D (1995) *Current Opinion in Biology* **5**: 728-734
10. Zhang JY, Małachowski WP, Van Etten RL, Dixon JE (1994) *J Biol Chem* **269**: 8140-8145
11. Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, Fisher EH (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7182-7186
12. Tonks K, Charbonneau H, Dilitz CD, Fischer EH, Walsh KA (1988) *Biochemistry* **27**: 8695-8701
13. Trowbridge IS, Ostergaard HL, Johnson P (1991) *Biochim Biophys Acta* **1095**: 46-56
14. Trowbridge IS (1991) *J Biol Chem* **266**: 23517-23520
15. Matthews RJ, Cahir ED, Thomas ML (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4444-4448
16. Kaplan R, Morse B, Huebner K, Croce C, Howk R, Ravera M, Ricca G, Jaye M, Schlessinger J (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7000-7004
17. Jirik FR, Janzen NM, Melhado IG, Harder KW (1990) *FEBS Lett* **273**: 239-242
18. Sap J, D'Eustachio P, Givol D, Schlessinger J (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6112-6116
19. Matthews RJ, Bowne DB, Flores E, Thomas ML (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 2396-2405
20. Shen S-H, Bastein L, Posner BI, Chretien P (1991) *Nature (Lond)* **352**: 736-739
21. Plutzky J, Neel BG, Rosenberg RD (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1123-1127
22. Cool DE, Tonks NK, Charbonneau H, Walsh KA, Fisher EH, Krebs EG (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5257-5261
23. Mosinger B, Tilman U, Westphal H, Tremblay ML (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4999-5033
24. Swarup G, Kamatkar S, Radha V, Rema V (1991) *FEBS Lett* **280**: 65-69
25. Guan K, Huan RS, Watson SJ, Geahlen RL, Dixon JE (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1501-1505
26. Charbonneau H, Tonks NK, Kumar S, Dilitz CD, Harrylock M, Cool DE, Krebs EG, Fisher EH, Walsh KA (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5225-5256
27. Brown Shimer S, Johnson KA, Bentley Lawrence J, Johnson C, Bruskin A, Green NR, Hill



- DE (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5148-5152
28. Chernoff J, Schievella AR, Jost CA, Erikson RL, Neel BG (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2735-2739
  29. Gu M, York JD, Warshawsky I, Majerus PW (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5867-5871
  30. Gu M, Warshawsky I, Majerus PW (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2980-2984
  31. Trowbridge IS, Thomas ML (1994) *Annu Rev Immunol* **12**: 85-116
  32. Chan AC, Desai DM, Weiss A (1994) *Annu Rev Immunol* **12**: 555-592
  33. Okumara M, Thomas ML (1995) *Curr Opin Immunol* **7**: 312-319
  34. Yakura H (1995) *Crit Rev Immunol* **14**: 311-336
  35. Woodford-Thomas Thomas ML (1993) *Sem Cell Biol* **4**: 409-418
  36. Ledbetter JA, Deans JP, Aruffo A, Grosmaire LS, Kanner SB, Bolen JB, Schieven L (1993) *Curr Opin Immunol* **5**: 334-340s
  37. Koretzky GA (1993) *FASEB J* **7**: 420-426
  38. Penninger JM, Wallace VA, Kishihara K, Mak TW (1993) *Immunol Rev* **135**: 183-214
  39. Latinis KM, Carr LL, Peterson LJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA (1997) *J Immunol* **158**: 4602-4611
  40. Rolinski J (1997) *Postępy Biologii Komórki* **24**: 561-574
  41. Wong B, Choi Y (1997) *Curr Opin Immunol* **9**: 385-364
  42. Matuszczyk J, Stżądala L (1997) *Post Hig Med Dośw* **51**: 351-356
  43. Musci MA, Latinis KM, Koretzky GA (1997) *Clin Immunol Immunopathology* **83**: 205-222
  44. Chan AC, Shaw AS (1995) *Curr Opin Immunol* **8**: 394-401
  45. Unkeless JC, Jin J (1997) *Curr Opin Immunol* **9**: 338-343
  46. Thomas ML, Bardley An, Gagnon J, Williams AF (1985) *Cell* **41**: 83-93
  47. Saga Y, Tung J-S, Shen F-W, Boyse CA (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 6940-6944 and correction 1987 (84)
  48. Thomas ML, Eynolda PJ, Chami A, Ben-Nerriach J, Trowbridge IS (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5360-5363
  49. Saga Y, Tung J-S, Shen F-W, Boyse CA (1987) *Proc Natl Acad Sci* **84**: 5364-5368
  50. Mc Call MN, Shotton DM, Barclay AN (1992) *Immunology* **76**: 310-317
  51. Bell EB, Sparshott SM (1990) *Nature (Lond)* **348**: 163-164
  52. Rothstein DM, Saito H, Streuli M, Schlossman SF, Morimoto C (1992) *J Biol Chem* **267**: 7139-7147
  53. Landsdorp PM, Sutherland, Eaves CJ (1990) *J Exp Med* **172**: 363-367
  54. Thomas ML (1989) The leucocyte common family. *Annu Rev Immunol* **7**: 339-369
  55. Williams AF (1987) *Immunol Today* **8**: 298-303
  56. Tan X, Stover DR, Walsh KA (1993) *J Biol Chem* **268**: 6835-6838
  57. Johnson P, Ostegaard HL, Wasden C, Trowbridge IS (1992) *J Biol Chem* **267**: 8035-8041
  58. Goldstein BJ (1995) W: Biochemical studies of PTPase catalytic activity Protein Profile 2: 1485-1515. Academic Press
  59. Desai DM, Sap J, Silvenoinen O, Schlessinger J, Weiss A (1994) *EMBO J* **13**: 4002-4010
  60. Ng DHW, Maiti A, Johnson P (1995) *Biochim Biophys Res Commun* **206**: 302-309
  61. Davis P, Zhou M-M, Van Etten RL (1994) *J Biol Chem* **269**: 8734-8740
  62. Kang S, Liao P, Gage DA, Esselman WJ (1997) *J Biol Chem* **272**: 11588-1596
  63. Stover DR, Charboneau H, Tonks NK, Walsh KA (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7704-7707
  64. Engel P, Nojima Y, Rothstein D, Zhou L-J, Wilson GL (1993) *J Immunol* **150**: 4719-4732
  65. Powell LD, Sgroi D, Sjobrg ER, Stamenkovic I, Varki A (1993) *J Biol Chem* **268**: 7019-7018
  66. Dianzani U, Liuqman M, Rojo J, Yagi J, Baron JL, Woods A, Janeway CA Jr Bottomly K (1990) *Eur J Immunol* **20**: 249-2257
  67. Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T (1991) *Cell* **66**: 1133-1144
  68. Dianzani U, Redoglia V, Malavasi F, Bragardo M, Pileri A, Janeway CA Jr, Bottomly K (1992) *Eur J Immunol* **22**: 365-340
  69. Hovis RR, Donavan JA, Musci MA, Motto DG, Goldman FD, Ross SE, Koretzky GA (1993) *Science* **260**: 544-546
  70. Volarevic S, Niklinska BB, Brns CM, June CH, Weissman AM, Ashwell JD (1993) *Science* **260**: 541-543
  71. Desai DM, Sap J, Schlessinger J, Weiss A (1993) *Cell* **73**: 541-554
  72. Arendt CW, Ostergaard HL (1995) *J Biol Chem* **270**: 2313-2319
  73. Coombe DR, Watt SM, Parish CR (1994) *Blood* **84**: 739-752
  74. Thomas ML (1994) *Curr Opinion Cell Biol* **6**: 247-252
  75. Novak TJ, Farber D, Leintenberg D, Hong SC, Johnson P, Bottomly K (1994) *Immunity* **1**: 109-119
  76. Robson SC, Siegel JB, Kirsch RE (1996) *Immunology and Cell Biology* **74**: 65-71
  77. Lorenz HM, Lagoo AS, Hardy KJ (1994) *Blood* **83**: 1862-1870
  78. Schraven B, Schoenhaut D, Bruyns E, Koretzky G, Eckerson C, Wallich R, Kirchgessner H, Sakorafas P, Labkovsky B, Ratnofsky S, Meuer S (1994) *J Biol Chem* **269**: 29102-29111
  79. Furakawa T, Itoh M, Krueger NX, Streuli M, Saito H (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10928-10932



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

# Wpływ immunomodulatorów typu MDP na sekrecję i aktywność cytokin

## Influence of immunomodulators of the type MDP on secretion and activity of cytokines

KRYSTYNA DZIERZBICKA<sup>1</sup>,  
MAGDALENA GOZDOWSKA<sup>2</sup>,  
ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Badania *in vitro* i *in vivo*
- III. Wstępne badania kliniczne
- IV. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. *In vitro* i *in vivo* studies
- III. Preliminary clinical studies
- IV. Summary

**Wykaz stosowanych skrótów:** GM-CFU — komórka tworząca *in vitro* kolonie neutrofilowo-makrofagowe (*colony forming units* — C); CSA — aktywność pobudzająca tworzenie kolonii (*colony stimulating activity*), CSF<sub>5</sub> — czynnik stymulujący kolonizację (*colony stimulating factor*); ConA — Concanavalina A; FAF — czynnik aktywujący fibroblasty (*fibroblast activating factor*); G-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (*granulocyte colony stimulating factor*); GM-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*); IL-1 — interleukina 1; IL-1 RA — antagonistyczny receptor IL-1 (*IL-1 receptor antagonist*); IL-1 $\beta$  — interleukina 1 $\beta$ ; IL-2 — interleukina 2; IL-6 — interleukina 6; IL-8 — interleukina 8; IFN- $\alpha$  — interferon alfa; L18-MDP(Ala) — *N*-acetylmuramylo-6-*O*-stearioilo-L-alanylo-D-izoglutamina; LIF — czynnik hamujący migrację leukocytów (*leukocyte inhibitory factor*); MAF — czynnik aktywujący makrofagi (*macrophage activating factor*); MDP — muramylo-dipeptyd (*N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina); MDP(L-Ala)C921 — ester metylowy 1-*O*-benzyl-6-*O*-[*N*(1'-nitroakrydylo-9')- $\beta$ -alanylo]-*N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutaminy; MDP-Lys(L18) — *N*<sup>2</sup>(*N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamylo)-*N*<sup>6</sup>-stearioilo-L-lizyna; M-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (*macrophage-colony stimulating factor*); MTP-PE — *N*-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutamylo-L-alanylo-2-(1'2'-dipalmitoilo-sn-glicerolo-3'-hydroksyfosforyloksy)-etyloamid; MDP-GDP — 1-*O*-(*N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamylo)-2,3-*O*-dipalmitoilo-glicerol; MDPGBe-GDP — ester *n*-butylowy 6-*O*-( $\beta$ , $\gamma$ -dipalmitoiloglicerylo)-*N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-glutaminy; mRNA — matrycowy albo informacyjny RNA; Murabutide — ester *n*-butylowy *N*-acetylmuramylo-L-alanylo-D-glutaminy; nor-MDP — analog MDP nie zawierający grupy metylowej w łańcuchu bocznym kwasu muraminowego; PAF — czynnik aktywujący płytki krwi (*platelet activating factor*); rHuIFN- $\gamma$  — rekombinowany ludzki interferon gamma; rMuIFN- $\gamma$  — rekombinowany myszy interferon

gamma; SAA — białko amyloidu A surowicy (*serum amyloid A protein*); sTNF-RII — rozpuszczalny receptor II TNF (*soluble TNF-receptor II*); sTNF-R — rozpuszczalny receptor czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (*soluble tumor necrosis factor  $\alpha$  receptor*); TCF — czynnik immunologicznej kontroli wzrostu (*tissue coding factor*); TNF- $\alpha$  — czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ).

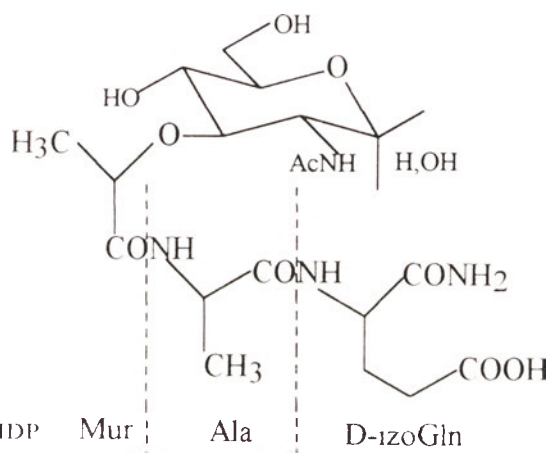
### I. Wstęp

Cytokiny to nazwa ogólna białek wydzielanych przez komórki i pełniących rolę mediatorów międzykomórkowych. Są to białka regulacyjne działające na dojrzewanie, aktywację i różnicowanie wielu komórek, w tym komórek układu odpornościowego. Wpływają na funkcje efektorowe komórek regulując w ten sposób przebieg odpowiedzi immunologicznej, pośrednicząc w utrzymaniu homeostazy. Cytokiny budzą w ostatnich latach coraz większe zainteresowanie badawcze, tym bardziej, że coraz częściej znajdują praktyczne zastosowanie w terapii. Do najpopularniejszych należą: interferony ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ), IL-2 i TNF- $\alpha$ , znane z tego, że próbuje się je bezpośrednio wykorzystać w terapii nowotworów, oraz cytokiny z grupy czynników stymulujących powstawanie kolonii, takich jak czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów (G-CSF), czy czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów i monocytów (GM-CSF), stosowane w leczeniu ubocznych, związanych z supresyjnym wpływem na szpik, efektów chemioterapii i radioterapii. Użycie cytokin napotyka na wiele ograniczeń, utrudniających stosowanie u człowieka, między innymi, osobniczą efektywność leczniczą, silne niepożądane objawy uboczne, a nawet działanie toksyczne w trakcie leczenia. Występowanie tych ograniczeń skłania do podejmowania prób stosowania terapii

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

łączonych, wykorzystujących efekt synergiczny, pozwalający na obniżenie dawek poniżej progu toksyczności. Przeprowadzone dotychczas próby ujawniły, że efekt taki występuje przy łącznym podawaniu cytokin z innymi cytokinami, monoklonalnymi przeciwciałami, hormonami a także innymi lekami [1, 2].

Celem opracowania jest przedstawienie wpływu immunomodulatora typu MDP (*N*-acetylo-muramilo-L-alanylo-D-izoglutaminy), najmniejszego adiuwantowo czynnego związku zsyntetyzowanego na wzór naturalnego fragmentu ściany komórkowej *Mycobacterium* i jego analogów na wydzielanie różnych cytokin przez różne komórki. Muramylopeptydy wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym aktywność immunostymulującą, zdolność stymulowania odporności niespecyficzną oraz działanie przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe [3-5]. Immunologiczne właściwości muramylopeptydów łączy się ze zdolnością do stymulowania lub hamowania biosyntezy wielu cytokin [5-7].



## II. Badania *in vitro* i *in vivo*

Dotychczasowe badania ujawniły, że muramylopeptydy silnie aktywują rozmaite funkcje monocytów i makrofagów do wytwarzania i uwalniania szeregu specyficznych cytokin. Wykazano, że monocyty ludzkie stymulowane w warunkach *in vitro* hydrofilową pochodną nor-MDP 0,001-50 µg/ml jednocześnie z rHuIFN- $\gamma$  uwalniają TCF odpowiedzialny za własności cytotoxiczne w stosunku do komórek zmienionych nowotworowo: ludzkiego czerniaka A375, raka okrężnicy HT-29, raka gruczołu krokowego PC-3, oraz gruczolakoraka piersi: MDA-MB468 i MDA-MB435S [8]. MDP poprzez monocyty stymuluje sekrecję induktorów IL-6 (IL-1 i TNF- $\alpha$ ) wielofunkcyjnej cytokiny, wytwarzanej przez komórki wielu typów m.in. przez monocyty, fibroblasty, osteoblasty i osteoklasty. Istnieją doniesienia [9], że MDP może stymulować powstawanie IL-6 na drodze bezpośredniej wpływając na mRNA na poziomie transkrypcji i posttranskrypcji. Oznaczone zostały trzy różne łańcuchy mRNA dla IL-6: 3,4kb mRNA, 1,6kb mRNA i 1,4kb mRNA, pojawiające się w cytoplazmie monocytów po

stymulacji MDP [9]. IL-6 współdziała z innymi cytokinami w aktywowaniu limfocytów T w kierunku uwalniania IL-2 [9, 10], uczestniczy w różnicowaniu komórek szpiku [11, 12], stymuluje hepatocyty do produkcji białek ostrej fazy [13], a także poprzez IL-1 wpływa na temperaturę organizmu [14]. W wyniku stymulacji MDP oraz jego lipofilowej pochodnej MTP-PE uczestniczy ona również w kształtowaniu odpowiedzi immunologicznej poprzez różnicowanie limfocytów B, przyspieszanie syntezy przeciwciał, indukcję limfocytów T<sub>c</sub> oraz wzrost liczby komórek linii plazmocytozy [15]. MDP-Lys(L18) stymuluje ludzkie monocyty krwi obwodowej do uwalniania IL-6 także w warunkach *in vitro* [17]. W Katedrze Histologii A.M. w Gdańsku badano wpływ pochodnych MDP(L-Ala)C921 (związek zsyntetyzowany w naszym laboratorium) i L18-MDP(Ala) (preparat handlowy, [3]) na poziom IL-6 w surowicach pochodzących od zwierząt zdrowych i obciążonych czerniakiem amelanotycznym Ab Bomirskiego, poddanych i niepoddanych zabiegowi operacyjnego usunięcia guza. W doświadczeniu użyto samców chomika syryjskiego odmiany złocistej, którym wszczepiano podskórnie komórki czerniaka Ab Bomirskiego. Preparaty podawano zwierzętom podskórnie, co drugi dzień od momentu wszczepienia komórek czerniaka. Aktywność IL-6 oznaczano metodą biologiczną, wykorzystując linię komórkową B9. Zarówno pochodna L18-MDP(Ala), jak też MDP(L-Ala)C921 działały aktywująco na uwalnianie IL-6 do surowicy. Znaczne podwyższenie poziomu IL-6 w stosunku do kontroli zaobserwowano pod wpływem MDP(L-Ala)C921 u zwierząt nosicieli guza Ab 160.3%; poziom ten wzrastał u zwierząt po usunięciu guza (226.1%) [47]. MDP stymuluje również wydzielanie induktorów IL-1 i TNF- $\alpha$ . Monocyty stymulowane MDP uwalniają CSF<sub>s</sub>, który to za pośrednictwem szpiku kostnego zwiększa liczbę krwinek białych w krążeniu [5]. Uwalniają one również czynnik zwiększający agregowanie płytek (PAF) [16]. Pod wpływem muramylopeptydów wzrasta wydzielanie przez makrofagi licznych czynników odpowiedzialnych za stymulację komórek układu immunologicznego, w tym CSA, FAF, IL-1, SAA, TNF [18]. MDP wraz z MAF wykazują synergizm w aktywowaniu *in vitro* cytotoxiczności makrofagów w stosunku do wielu nowotworów [19]. IL-1, uwalniana przez makrofagi pod wpływem MDP-Lys(18), MDP-GDP i MDPG-GDP stymuluje limfocyty T do produkcji CSF<sub>s</sub>, który z kolei indukuje proliferację i różnicowanie komórek szpiku (CFU-C) [20-22]. MDP a także MTP-PE (7,5 µg/osobnika) podawane dożylnie razem z rMuIFN- $\gamma$  myszom w postaci liposomów niszczą komórki czerniaka B16 w płucach i węzłach chłonnych chorych zwierząt [23-25]. Natomiast MDP i rMuIFN- $\gamma$  w liposomach stymuluje otrzewnowe makrofagi myszy, które wykazują w badaniach *in vitro* zwiększoną cytotoxiczność w stosunku do komórek czerniaka B16/BL6 [26]. Najczęściej badaną cytokiną jest

interferon, jednak jego stosowanie w leczeniu różnych złośliwych i wirusowych infekcji jest ograniczone zmienną osobniczo toksycznością i wielkością terapeutycznie skutecznej dawki [27]. Praktyczne znaczenie znalazł IFN- $\alpha$  w terapii pacjentów z rakiem nerki, czerniakiem i szpiczakiem oraz w leczeniu białaczek [28]. Próbuje się także stosowania interferonu w leczeniu chorób o podłożu zapalnym i immunologicznym [28-30]. Aktywność przeciwzapalna IFN- $\alpha$  związana jest z indukowaniem przeciwzapalnych cytokin [31, 32] i hamowaniem produkcji zapalnych czynników (mediatorów) [33]. Rozpoczęto szczegółowo badania wpływu IFN- $\alpha$  w ochronie myszy z ostrym zapaleniem wątroby wywołanym podaniem Concanavaliny-A (Con A). Przy okazji tych badań oceniano skuteczność samego Murabutide, syntetycznej apirogennej pochodnej MDP lub w mieszaninie z IFN- $\alpha/\beta$  do ochrony myszy z zapaleniem wątroby wywołanym Con A i klasycznej formy fibrosarcomy Meth A u myszy. Murabutide jest jedną z 9 lipofilowych pochodnych MDP poddawanych testom klinicznym. Podawany zdrowym ochotnikom powodował uwalnianie antyzapalnych mediatorów, takich jak antagonistyczny receptor IL-1 (IL-1RA) czy rozpuszczalny receptor czynnika martwicy guza  $\alpha$  (sTNF-R) nie powodując indukowania zapalnych cytokin (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ ). Murabutide w połączeniu z IFN- $\alpha/\beta$  znacząco redukuje śmiertelność myszy (z 70% do 33%) powodowaną endotoksycznym wstrząsem (*endotoxic shock*) [34]. Obserwacje te stwarzają nadzieję na zastosowanie podobnego zestawu w leczeniu endotoksycznego wstrząsu u ludzi.

### III. Wstępne badania kliniczne

Uwagę zwracają opublikowane wyniki pierwszej fazy badań klinicznych przeprowadzonych na zdrowych ochotnikach, którym podawano podskórną pochodną MDP Murabutide (3-7 mg) i IFN- $\alpha$  (Roferon-A,  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  U). Celem tych badań było określenie profilu klinicznej tolerancji, oraz stwierdzenie ewentualnych efektów ubocznych na organizm pacjentów. Wyniki okazały się bardzo obiecujące, wykazano synergiczne działanie tych cząsteczek, przy czym nie zaobserwowano działań ubocznych cytotoksycznych często występujących w wyniku łącznego podawania immunostymulatora z cytokiną [34]. W drugiej fazie badań określano u zdrowych ochotników poziom wydzielanych cytokin w surowicy w następstwie równoczesnego podawania  $1 \times 10^6$  U IFN- $\alpha$  i 7 mg Murabutide. Otrzymane wyniki dowodzą, że łączne stosowanie Murabutide z IFN- $\alpha$  powoduje znaczny wzrost poziomu: G-CSF, IL-6, sTNF-RII i IL-1RA; nie zauważono natomiast indukowania zapalnych cytokin takich jak: IL-1 $\beta$ , IL-8 i TNF- $\alpha$ . Nie stwierdzono także podwyższonego poziomu GM-CSF, IL-2, Oncostatin M, LIF i IL-6, ani istotnych działań ubocznych; badania są kontynuowane [34].

### IV. Podsumowanie

Muramylopeptydy, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [5-7, 35], stymulują różnicowanie komórek produkujących cytokiny, jak i wydzielanie samych cytokin. W dotychczas opublikowanych pracach zwrócono uwagę na różnice w indukowaniu cytokin przez monocyty i makrofagi w odpowiedzi na obecność pochodnych MDP. Wykazano indukowanie CSF<sub>S</sub> przez muramylopeptydy [36-38]. Z ostatnich badań wynika, że MDP wpływa na wzrost czynnika granulocyto-makrofagowego (GM-CSF) na poziomie mRNA i makrofagowego (M-CSF) w śledzionie i płucach myszy [36], nie powoduje natomiast wydzielania G-CSF. Okazało się jednak, że ludzkie monocyty krwi obwodowej stymulowane pochodną MDP-Lys(L18) pobudzają syntezę G-CSF [39]. Autorzy usiłowali interpretować te rozbieżności sugerując, że muramylopeptydy rzeczywiście wpływają na produkcję G-CSF, ale tylko poprzez uwalnianie IL-1 [40]. Udział CSF<sub>S</sub> w odporności organizmu na infekcje zależy nie tylko od wpływu na proliferację leukocytów, ale także od bezpośredniej aktywacji dojrzałych komórek [41, 42]. Immunomodulatorowa aktywność pochodnych MDP związana jest również, ze zdolnością hamowania produkcji pewnych cytokin [43]. Np. hamują one produkcję IFN- $\alpha$  w mysiej/szczurzej śledzionie i obwodowych makrofagach związane to jest z ograniczeniem produkcji IL-2 przez stymulowane splenocyty [44, 45]. IFN- $\alpha$  był pierwszą cytokiną zastosowaną w leczeniu nowotworów. Skuteczność jego stosowania była jednak ograniczona toksycznością wymaganej dawki i wybiórczą skutecznością [46]. Dlatego też próbowano podawać go w połączeniu z innymi cytokinami (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) lub chemioterapeutycznymi lekami, ale jak dotychczas nie uzyskano oczekiwanych rezultatów [46]. Natomiast łączne podawanie IFN- $\alpha/\beta$  z bezpiecznym immunostymulatorem jakim jest Murabutide, wykazuje *in vitro* i *in vivo* synergistyczną aktywność przeciw edotoksycznemu wstrząsowi oraz wirusowemu zapaleniu mięśnia sercowego. Obecnie preparaty te przechodzą I i II fazę badań klinicznych. Studia nad mechanizmem aktywującego działania obu tych immunomodulatorów są intensywnie prowadzone.

#### Podziękowanie

Praca finansowana w ramach Badań Własnych nr umowy 012233/001.

Artykuł otrzymano 19 lutego 1998 r.  
Zaakceptowano do druku 22 czerwca 1998 r.

#### Piśmiennictwo

1. Azuma (1992) *Int J Immunopharmac* **14**: 487-496
2. Jakóbiśiak M, Lasek W (1996) W: Jakóbiśiak M (red) *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 660-664

3. Adam A, Lederer E (1984) *Med Res Rev* **4**: 111-152
4. Kołodziejczyk AM, Kołodziejczyk AS (1987) *Post Biochem* **33**: 203-229
5. Baschang G (1989) *Tetrahedron* **45**: 6331-6360
6. Brondy VC, Kaushansky K, Shoemaker SG, Aggarwal BB, Adamson JW (1990) *J Immunol* **40**: 3789-3794
7. Shimoda K, Okamura O, Kawasaki C, Omori F, Matsuguchi T, Niho Y (1990) *Int J Immunopharmacol* **7**: 729-736
8. Sone S, Lopez-Bernstein G, Fidler IJ (1986) *Cancer Immunol Immunother* **21**: 93-99
9. Sanceau J, Falcoff R, Beranger D, Carter DB, Wietzerbin J (1990) *Immunology* **69**: 52-56
10. Garman RD, Jacobs KA, Clark SC, Raulet DH (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7629-7633
11. Leary AG, Ikebuchi K, Hirai Y, Wong GG, Yang Y-C, Clark SC, Ogawa M (1988) *Blood* **71**: 1759-1763
12. Shabo Y, Lotem J, Rubinstein M, Revel M, Clark SC, Wolf SF, Kamen R, Sachs L (1988) *Blood* **72**: 2070-2073
13. Nijsten MWN, De Groot ER, Ten Duis HJ, Klasen HJ, Hack CE, Aarden LA (1987) *Lancet* **2**: 921
14. Helle M, Brakenhoff JPJ, De Grot Els R, Aarden LA (1988) *Eur J Immunol* **18**: 957-959
15. Frost H, Murray JL, Chaudri HA, Van damme J (1990) *J Biol Response Mod* **9**: 160-166
16. Salem P, Deryckx S, Duliost A, Viver E, Denizot Y, Damais C, Dinarello CA, Thomas Y (1990) *J Immunol* **144**: 1338-1344
17. Shimoda K, Okamura S, Harada N, Fusayuki O, Niho Y (1990) *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **70**: 289-296
18. Adam A, Lederer E (1988) *ISI Atlas Sci* **1**: 205-214
19. Sone S, Fidler IJ (1980) *J Immunol* **125**: 2454-460
20. Yamaguchi F, Akahane K, Takashi T, Tsukada W (1988) *Arzneim-Forsch Drug Res* **38**: 983-986
21. Ymaguchi F, Akasaki M, Tsukada W (1988) *Arzneim-Forsch Drug Res* **38**: 980-983
22. Galelli A, Charlot B, Phillips NC, Chedid L (1989) *Cancer Res* **49**: 810-815
23. Fidler IJ, Barnes Z, Fogler WE, Kirsh R, Bugelski P, Poste G (1982) *Cancer Res* **42**: 496-501
24. Fidler IJ, Fogler WE, Brownbill AF, Schumann G (1987) *J Immunol* **138**: 4509-4514
25. Fidler IJ, Fan D, Ichinose Y (1989) *Invasion Metastasis* **9**: 75-88
26. Saiki I, Fidler IJ (1985) *J Immunol* **135**: 684-688
27. Galvani DW, Cawley JC (1990) *Blood Rev* **4**: 175-180
28. Gutterman JU (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1198-1205
29. Baron S, Tying SK, Fleischmann WR, Copenhagen DH, Niesel DW, Klimpel GR, Stanton GJ, Hughes TK (1991) *JAMA* **266**: 1375-1383
30. Heremans H, Billiau A (1989) *Drugs* **38**: 957-972
31. Bahr GM, Darcissac E, Bevec D, Dukor P, Chedid L (1995) *Int J Immunopharmacol* **17**: 117-131
32. Tilg H, Vogel W, Dinarello CA (1995) *Blood* **85**: 433-435
33. Aman MJ, Rudolf G, Goldschmitt J, Aulitzky WE, Lam C, Hubert C, Peschel G (1993) *Blood* **82**: 2371-2378
34. Bahr GM, Darcissac E, Bevec D, Dukor P, Chedid L (1995) *Int J Immunopharmacol* **17**: 117-131
35. Dinarello CA, Kruger JM (1986) *FASEB* **45**: 2545-2548
36. Brondy VC, Kaushansky K, Shoemaker SG, Aggarwal BB, Adamson JW (1990) *J Immunol* **144**: 3789-3794
37. Galelli A, Chedid L (1984) *J Immunol* **137**: 3211-3215
38. Galelli A, Charlot B, Phillips NC, Chedid L (1989) *Cancer Res* **49**: 810-815
39. Shimoda K, Okamura O, Kawasaki C, Omori F, Matsuguchi T, Niho Y (1990) *Int J Immunopharmacol* **7**: 729-736
40. Akahane K, Yamaguchi F, Kita Y, Une T, Osada Y (1990) *Arzneimittelforschung* **40**: 179-183
41. Clark SC, Kamen R (1987) *Science* **236**: 1229-1237
42. Devereux S, Linch D (1990) *Q J Med* **75**: 537-550
43. Leclerc C, Galelli A, La Bonnardiere C, Chedid L (1985) *Int J Immunopharmacol* **7**: 343
44. Ikeda S, Negishi T, Nishimura C (1985) *Antiviral Res* **5**: 207-215
45. Meyer T, Dietrich FM, Walker MR, Hochkeppel HK (1986) *J Interferon Res* **6**: 183-188
46. Gilewski TA, Golomb HM (1990) *Sem Oncol* **17**: 3-10
47. Szmit E, Sosnowska D, Mysliwski A, Mysliwska J, Dzierzbicka K, Kołodziejczyk A (1997) Symp Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Gdańsk 16-18, P39, str. 107

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

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

# Wirus vaccinia i jego zastosowanie w biologii molekularnej oraz immunologii

## Vaccinia virus and its application in molecular biology and immunology

DARIUSZ KMIECIAK\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Cykl życiowy wirusa vaccinia
  - II-1. Genom wirusa
  - II-2. Proces infekcji wirusem
  - II-3. Transkrypcja genów wirusowych
- III. Konstruowanie zrekombinowanych wirusów vaccinia
  - III-1. Projektowanie i przygotowanie sekwencji DNA insertu
  - III-2. Klonowanie obcego DNA i selekcja rekombinantów
  - III-3. Bezpośrednia ligacja insertu do genomu wirusa
- IV. Zastosowanie zrekombinowanych wirusów vaccinia
  - IV-1. Ekspresja obcych genów w komórkach eukaryotycznych
  - IV-2. Badania odpowiedzi humoralnej i komórkowej
- V. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** Da — dalton; dl. — długość; h — godzina; gpt — fosforybozylotransferaza guaninowa (EC 2.4.2.22); kDa — kilodalton; kpz —  $10^3$  par zasad; m. cz. — masa cząsteczkowa; N — dowolna zasada; ok. — około; pz — pary zasad; S — stała Svedberga; TK — kinaza tymidylanowa (EC 2.7.1.21); X-gal — 5-bromo-4-chloro-3-indoilo- $\beta$ -D-galaktozyd.

### I. Wstęp

Wirus vaccinia (ang. *vaccinia virus*), używany do szczepień ochronnych przeciwko ospie prawdziwej (łac. *variola vera*), został wyizolowany bezpośrednio, bądź pośrednio z zakażonego bydła [1]. Niektóre preparaty wirusa pochodziły także od innych zwierząt. Różne szczepy wirusa po prawie dwustu latach dały początek współczesnemu wirusowi vaccinia, którego pochodzenie nie zostało dokładnie wyjaśnione [2].

Angielski lekarz Edward Jenner zastosował i opisał po raz pierwszy w 1798 r. efekt ochronny szczepienia wirusem ospy krowiej (ang. *cowpox virus*) przeciwko ospie prawdziwej [1]. Wykorzystał przy tym spostrzeżenie, iż ówczesne dojarki, poprzez zakażenie się wirusem ospy krowiej, uzyskiwały odporność na infekcję wirusem ospy prawdziwej [1].

Obecnie, wirus vaccinia znalazł nie tylko zastosowa-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Life cycle of vaccinia virus
  - II-1. Viral genome
  - II-2. Process of infection with the virus
  - II-3. Transcription of viral genes
- III. Construction of recombinant vaccinia viruses
  - III-1. Design and preparation of the insert DNA
  - III-2. Cloning of foreign DNA and selection of recombinants
  - III-3. Direct ligation into viral genome
- IV. Application of the recombinant vaccinia viruses
  - IV-1. Expression of foreign genes in eukaryotic cells
  - IV-2. Studies of humoral and cellular responses
- V. Concluding remarks

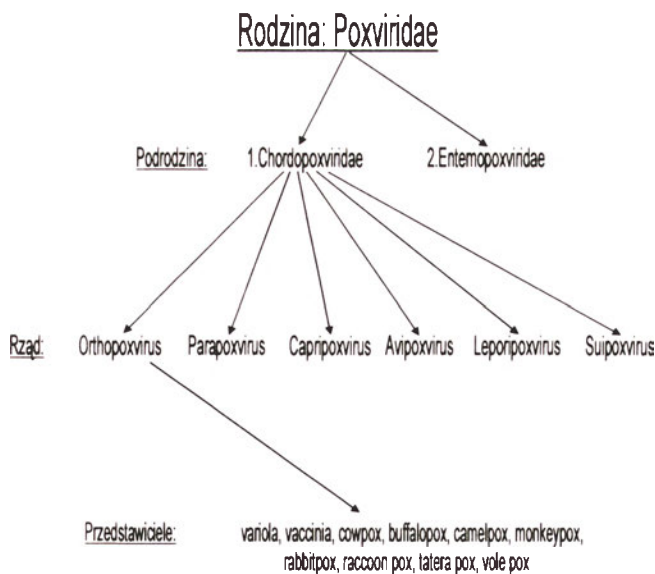
nie do szczepień ochronnych. Istnieje olbrzymia ilość publikacji, w których opisano wykorzystanie tego wirusa jako wektora do ekspresji genów w komórkach eukaryotycznych, do syntezy biologicznie czynnych białek, do badania relacji struktura: funkcja białka, a w immunologii do badania odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Zagadnienia te nie zostały dotychczas szerzej omówione w polskiej literaturze fachowej. Skupiając się głównie na sposobach wklonowywania obcych genów w ten wektor, a mniej uwagi poświęcając na cykl życiowy wirusa, autor wyraża nadzieję, że zainteresowanie wśród polskich czytelników wirusem vaccinia, jako użytecznym narzędziem w biologii molekularnej i immunologii, wzrośnie.

### II. Cykl życiowy wirusa vaccinia

#### II-1. Genom wirusa

Wirus vaccinia należy do rodziny poxwirusów (ang. *poxviridae family*), której przedstawiciele zakażają zarówno kręgowce, jak i bezkręgowce [3]. Razem z m.in. wirusem ospy prawdziwej (ang. *variola virus*) i wirusem ospy krowiej (*cowpox virus*) tworzy rodzaj ortopoxwirusów (ang. *orthopoxvirus genus*) (Ryc. 1). Wszystkie ortopoxwirusy są ściśle ze sobą spokrewnione. Analiza restrykcyjna DNA niektórych poxwirusów ujawniła homologię sekwencji, zwłaszcza w regionie centralnym genomu (m. cz. ok.  $30 \times 10^6$  Da) oraz w końcowych

\* Mgr, Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań



Ryc. 1. Uproszczony schemat ukazujący przynależność taksonomiczną wirusa vaccinia.

powtórzeniach (m. cz. do  $6 \times 10^6$  Da) [4]. Ponadto ustalono, że opisywany wirus vaccinia, chociaż bardzo podobny, różni się jednak od wirusa ospy krowiej oraz ospy prawdziwej i można go uznać za odrębny gatunek [4]. Z drugiej jednak strony, jak wspomniano we wstępie, pochodzenie jego jest niewyjaśnione, ale podobieństwo map restrykcyjnych trzech wyżej wspomnianych wirusów [4] nie wyklucza, że wirus vaccinia może być hybrydą albo „laboratoryjnym” potomkiem szczepu, który nie istnieje już w przyrodzie [5]. Domniemana masa cząsteczkowa DNA wirusa vaccinia, oszacowana na podstawie analizy restrykcyjnej, wynosi ok.  $124 \times 10^6$  Da [4].

Poxwirusy są jedyną rodziną wirusów DNA, których cały cykl życiowy, łącznie z replikacją, zachodzi w cytoplazmie komórek eukariotycznych [3]. Unikalną ich cechą jest również to, że własny DNA koduje ogromną większość enzymów i czynników białkowych potrzebnych do replikacji i transkrypcji [3, 6]. DNA wirusa vaccinia, jak zresztą i innych poxwirusów występuje w postaci dwuniciowej, liniowej cząsteczki

o długości 186 kbp [7]. Na jej końcach występują struktury typu „szpilki do włosów” (ang. *hairpin loop*), które łączą obie nici w jedną cząsteczkę [8]. Sekwencje DNA w tym miejscu stanowią głównie pary AT [8]. W genomie wirusa vaccinia występują też końcowe, odwrócone powtórzenia sekwencji (ang. *inverted terminal repeats: ITR*), tzn. identyczne, ale przeciwnie zorientowane sekwencje o długości ok. 10 kbp, znajdujące się na końcach cząsteczki DNA [9].

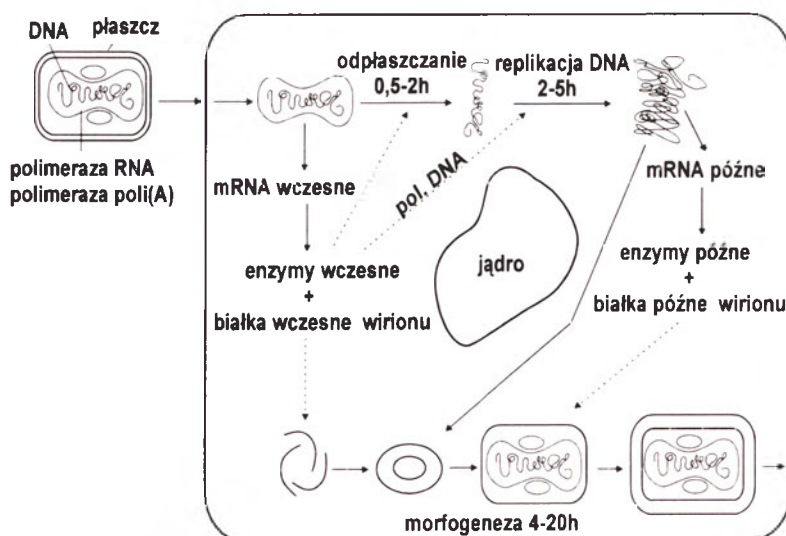
Genom dwóch szczepów wirusa vaccinia został zsekwencjonowany w całości. Są to: szczep Ankara, 177923 bp (nr dostępu w bazie GenBank: U94848) oraz szczep Kopenhaga, 191737 bp (nr M35027).

## II-2. Proces infekcji wirusem

Wirus vaccinia występuje w dwóch formach infekcyjnych: w formie wewnątrzkomórkowego dojrzałego wirusa (ang. *IMV- intracellular mature virus*) i zewnątrzkomórkowego opłaszczonego wirusa (ang. *EEV- extracellular enveloped virus*). Forma EEV zawiera dodatkową błonę lipidową [10] i odmienne białka powierzchniowe [11]. Spośród sześciu znanych genów, specyficznych dla formy EEV, jeden z nich, B5R, kodujący glikoproteinę o m. cz. 42 kDa, wpływa na wielkość kolonii wirusa i jego delecja powoduje zmniejszenie kolonii oraz atenuację wirusa *in vivo* [12].

Cykl życiowy wirusa vaccinia można uznać jako typowy dla przedstawicieli rodziny poxwirusów (Ryc. 2). Wejście wirusa do komórki gospodarza zapoczątkowuje jego fuzja z błoną cytoplazmatyczną, po której następuje proces internalizacji [13]. Próby zidentyfikowania białek odpowiedzialnych za proces adsorpcji i penetrację wskazują na dwa białka płaszcza wirusa: o m. cz. 56 kDa i 14 kDa [14, 15]. Zaproponowano również, że receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *EGF- epidermal growth factor*) może odgrywać rolę w procesie internalizacji wirusa, gdyż kodowane przez wirusa białko wydzielnicze, VGF (ang. *vaccinia growth factor*), wiąże się tym receptorem [16]. Jednakże, wirus infekuje komórki nawet w przypadku mutacji

Ryc. 2. Schemat cyklu życiowego wirusa vaccinia (wg [7], zmodyfikowano).



polegającej na zahamowaniu ekspresji VGF [17]. Być może, że przyczyną tego jest m.in. zdolność wiązania wirusa do siarczanu heparanu, składnika proteoglikanów występujących na powierzchni komórek, ponieważ wykazano, że białko wirusowe A27L wiąże się do tego związku, a więc może pośredniczyć w wiązaniu wirusa do komórki i infekcji [18]. Zdolnością tą, zasugerowano, można też wytłumaczyć niską specyficzność wirusa vaccinia co do wyboru komórki gospodarza [18].

Równocześnie z fuzją wirusa z błoną cytoplazmatyczną i jego internalizacją, rozpoczyna się proces likwidacji płaszcza co wiąże się z uwolnieniem lipidów i białek wirusowych [19]. Etap ten stanowi pierwszą fazę infekcji, której nie blokują inhibitory syntezy RNA i białek [20]. Druga faza zaczyna się po okresie utajenia (0,5 do 2 godz., w zależności od natężenia infekcji) i charakteryzuje się syntezą RNA oraz białek [19, 21]. Synteza DNA wirusa vaccinia rozpoczyna się ok. 1-2 godz. po infekcji i daje w rezultacie ok.  $10^4$  kopii genomu na komórkę, z czego ok. połowa ulega upakowaniu do wirionów potomnych [22, 23].

### II-3. Transkrypcja genów wirusowych

Proces transkrypcji genów wirusa vaccinia można podzielić na trzy etapy: transkrypcję genów wczesnych, pośrednich oraz późnych (Ryc. 3) [24]. Dowiedziono, że DNA wirusa, który zainfekował komórkę, służy jako matryca do ekspresji genów wczesnych, natomiast ekspresja genów pośrednich i późnych zachodzi na nowo zsintetyzowanym DNA [25, 26].

Ekspresja genów wczesnych zaczyna się dzięki składnikom systemu wczesnej transkrypcji, które wraz z DNA wirusa są upakowane w rdzeniu wirionu infekującego komórkę [27, 28]. Następuje to w ciągu kilku minut po internalizacji wirusa [27, 28]. Powstały w wyniku transkrypcji genów wczesnych mRNA podlega modyfikacjom takim jak dodanie 7-metyloguaniny na końcu 5' (tzw. kap) [29], poliadenylacja [30], a niektóre z cząsteczek zawierają także krótki odcinek liderowy poli(A) na końcu 5', powstały w wyniku procesu edycji [31].

W procesie transkrypcji genów wczesnych wirusa bierze udział VETF (ang. *vaccinia virus early transcription factor*), czynnik transkrypcyjny, który jest białkiem wiążącym DNA i złożonym z podjednostek 70- oraz 82 kDa, kodowanych przez geny D6R i A8L [32, 33]. Jest on produkowany w fazie późnej infekcji i pakowany do jądra wirusa w procesie tworzenia wirionów potomnych [34]. Oprócz tego, białka D6R i A8L wpływają na morfogenezę wirusa i ich brak zakłóca powstanie dojrzałych cząstek potomnych wirusa [35, 36].

Regiony promotorowe genów podlegających wczesnej transkrypcji występują głównie w odcinku ok. 30 pz przed miejscem startu transkrypcji [37-39]. Odcinek od -28 do -13, zawierający dużo reszt A, jest, podobnie

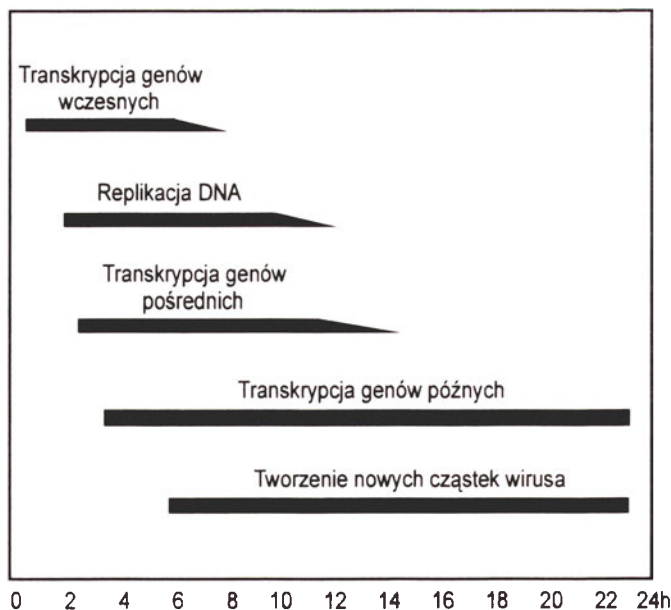
jak sekwencja TATA dla promotorów genów eukariotycznych, regionem, który wyznacza miejsce inicjacji transkrypcji [40].

Terminacja transkrypcji genów wczesnych wirusa vaccinia zachodzi ok. 20-50 pz (w kierunku 3') za sekwencją TTTTNT [41]. Zauważono, że inkorporacja halogenkowych pochodnych UTP do nowo powstającego łańcucha RNA hamowała terminację transkrypcji [42]. Sugeruje to, że sygnał terminacji może być rozpoznawany nie w DNA, a w RNA, jako: UUUUUNU. Sygnał terminacji dla polimerazy RNA, przekazywany za pomocą wirusowego czynnika terminacji VTF/CE (ang. *viral termination factor/capping enzyme*) wymaga hydrolizy ATP, dokonywanej przez białko kompleksu elongacyjnego, NPH-1 (ang. *nucleoside triphosphate phosphohydrolase-1*) [43].

Jak przewidywano, sekwencja TTTTNT występuje w większości genów wczesnych wirusa vaccinia, ale: (1) niektóre geny nie posiadają tego sygnału i wtedy terminacja transkrypcji występuje na końcu 3' następnego transkrybowanego genu i (2) nawet gdy motyw ten jest obecny, terminacja nie zawsze jest całkowita. Obydwa te warunki tłumaczą występowanie nadmiernie długich cząsteczek wczesnego mRNA [44-46].

Jak już wcześniej wspomniano, replikacja DNA wirusa wyznacza następny etap infekcji. Dochodzi wówczas do ekspresji genów pośrednich, a zaraz potem genów późnych wirusa. Na temat transkrypcji genów pośrednich ciągle niewiele wiadomo. Jak dotąd, poznano pięć genów pośrednich [47, 48], z których trzy np. kodują transaktywatory ekspresji genów późnych [48].

Geny późne kodują wiele enzymów, takich jak: deoksyrybonukleazy [49], fosfohydrolazy trifosforanów nukleozydów [49, 50], czy topoizomerazy [51], a także większość białek strukturalnych cząsteczki



Ryc. 3. Przybliżone przedziały czasowe pokazujące kolejność zdarzeń w cyklu życiowym wirusa vaccinia od momentu infekcji do powstania nowych cząstek wirusa (wg [24], zmodyfikowano).



wirusa [52]. Jedno z nich, produkt genu I1, o wielkości 35 kDa, produkowane w późnym stadium infekcji, jest białkiem wiążącym się do DNA w nowo powstających wirionach, zatem wpływa na ich morfogenezę, a jego brak powoduje formowanie się wirionów niedojrzałych [53].

Informacyjne RNA genów późnych wyróżniają się kilkoma cechami. Ich koniec 5' zawiera sekwencję poliA złożoną z ok. 35 reszt [54, 55], w odróżnieniu od mRNA genów wczesnych, w którym, jeśli taki odcinek występuje, jest on znacznie krótszy [31]. Ta sekwencja poliA nie jest zakodowana w genomie wirusa, a powstaje w wyniku działania polimerazy RNA (ang. *backward slippage*) i jak się wydaje, może mieć znaczenie w wiązaniu czynników translacyjnych i podjednostki 40S rybosomu, która następnie przesuwa się w kierunku kodonu inicjującego AUG, z reguły ulokowanego bezpośrednio za sekwencją poliA.

Spośród czynników transkrypcyjnych wpływających na ekspresję genów późnych wymienić można VLTF-1 i VLTF-2 (ang. *vaccinia virus late transcription factor*), produkty genów G8R i A1L [56, 57]. Ponadto, doniesiono, że w procesie transkrypcji genów późnych może uczestniczyć czynnik VLTF-X, który wiąże się do promotorów genów późnych i którego aktywność znaleziono również w cytoplazmie z niezakażonych komórek HeLa [58]. To sugeruje, że w transkrypcji genów późnych wirusa vaccinia może brać udział czynnik komórkowy, a nie tylko pochodzenia wirusowego.

Sygnal terminacji transkrypcji genów późnych nie został rozpoznany. Wydaje się, że synteza RNA, raz rozpoczęta, może być kontynuowana wzdłuż odcinków kodujących inne geny późne, jak również geny wczesne, nawet jeśli są one przeciwnie zorientowane [59, 60]. Tłumaczy to występowanie różnej długości mRNA kodującego dane białko. Sygnal terminacji transkrypcji genów wczesnych TTTTNT występuje czasem w sekwencji genów późnych, ale nie jest rozpoznawany w procesie ich transkrypcji [41].

W regionie promotorowym genów późnych charakterystyczną sekwencją jest konserwatywny motyw TAAAT, wewnątrz którego następuje inicjacja transkrypcji [61, 62]. Często bezpośrednio za sekwencją TAAAT występuje reszta G dając odcinek TAAATG, w którym ostatnie trzy zasady tworzą odpowiednik kodonu inicjującego na nici DNA: ATG [62]. Mutacje w obrębie reszt A motywu TAAAT obniżają wydajność transkrypcji genów późnych [61, 63].

Podczas infekcji, poxwirusy kodują białka, których zadaniem jest obrona przed, czy też zneutralizowanie odpowiedzi immunologicznej. Doniesiono np. że wirusy variola i cowpox produkują białko wydzielnicze (sekwencja genu tego białka jest także silnie zakonserwowana u wirusa vaccinia), które wiąże się do  $\beta$ -chemokin [64]. Jego rolą zatem, jest prawdopodobnie inhibicja antywirusowego, przeciwwzapalnego działania  $\beta$ -chemokin, chociaż nie wykazuje ono podobieństwa

do sekwencji ich receptorów. Ponadto, forma EEV wirusa jest otoczona płaszczem wywodzącym się z błon aparatu Golgiego co, jak wykryto, nadaje jej odporność na specyficzne przeciwciała neutralizujące [65].

### III. Konstruowanie zrekombinowanych wirusów vaccinia

#### III-1. Projektowanie i przygotowanie sekwencji DNA insertu

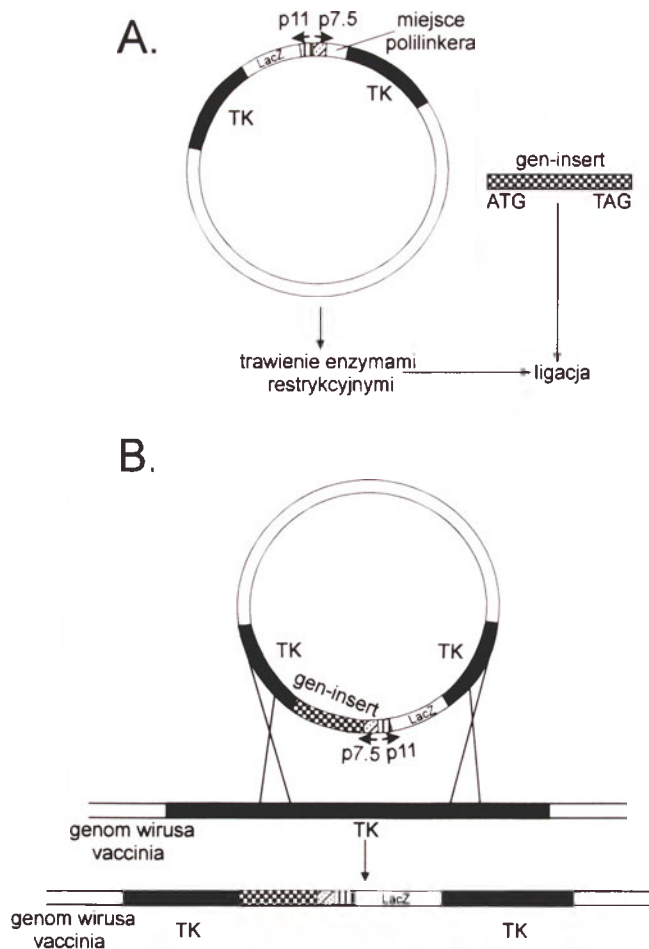
Wirusowe, prokariotyczne lub eukariotyczne geny lub cDNA, zawierające otwarte ramki odczytu, mogą być użyte do rekombinacji DNA zmodyfikowanych wirusów vaccinia. Pozwala to na ekspresję tych genów, lub cDNA, po infekcji komórek gospodarza. Ważne jest, aby promotor „genu-insertu” pochodził od wirusa vaccinia, ponieważ promotory komórkowe i pochodzące od innych wirusów nie są rozpoznawane przez aparat transkrypcyjny tego wirusa. Kinetyka produkcji białka, na matrycy mRNA kodowanego przez DNA insertu, zależy od użytego promotora. Promotory wczesne z reguły pozwalają na ekspresję białka w ciągu sześciu godzin od infekcji; promotory późne — od ok. 6 godz. po infekcji, aż do wystąpienia znacznych efektów cytotoksycznych w komórce [66, 67]. Najbardziej powszechnie jest jednak używany promotor p7.5, zawierający zarówno wczesne, jak i późne sekwencje promotorowe [68]. Zależnie od warunków, kieruje on ciągłą ekspresją białka, przez 1 do 2 dni, ale nie dłużej gdyż, jak wspomniano, wystąpienie efektów cytotoksycznych prowadzi w konsekwencji do śmierci komórki.

Projektując sekwencję DNA, którą zamierza się wklonować do wektora, trzeba pamiętać nie tylko o tym, aby ramka odczytu była pozbawiona intronu/ów, ale również żeby DNA nie zawierało sekwencji TTTTNT, oznaczającej terminację transkrypcji genów wczesnych wirusa [69, 70]. Podobne sekwencje, znajdujące się w genie, który ma zostać wklonowany, mogą prowadzić do przedwczesnej terminacji transkrypcji tego genu, a w rezultacie do obniżonej wydajności syntezy jego produktu białkowego [70]. Jeżeli celem eksperymentu jest np. uzyskanie dużych ilości białka, a motyw TTTTNT występuje w regionie, w którym zamiana jednego lub kilku aminokwasów nie wpływa na strukturę i funkcję białka, motyw ten, przed wklonowaniem do wektora, można zmienić poprzez mutagenезę [70].

Aby w pełni naśladować wirusowe RNA, nie ulegające translacji liderowe odcinki 5', jak i 3'-końcowe sekwencje insertu z reguły usuwa się lub skraca możliwie jak najbardziej tak, że do wektora wprowadzona zostaje tylko otwarta ramka odczytu [67, 70].

#### III-2. Klonowanie obcego DNA i selekcja rekombinantów

Uzyskanie zrekombinowanego wirusa vaccinia



**Ryc. 4.** A. Konstrukcja plazmidu zawierającego gen-insert. Po trawieniu odpowiednimi enzymami, zarówno plazmidu, jak i genu-insertu, następuje ligacja i odszukanie prawidłowego plazmidu potomnego.  
B. Homologiczna rekombinacja pomiędzy stransfekowanym plazmidem, a genomem wirusa vaccinia. Zainfekowane „dzikim” wirusem komórki transfekuje się plazmidem zawierającym gen-insert w kasecie ekspresyjnej pomiędzy segmentami genu TK. W wyniku zjawiska podwójnego crossing-over następuje przeniesienie genu-insertu do genomu wirusa. Szczegóły tego procesu i sposób identyfikacji wirusów potomnych opisano w tekście.

obejmuje dwa etapy: (1) wprowadzenie obcego DNA do specjalnie zaprojektowanego plazmidu i (2) homologiczną rekombinację, w komórkach zainfekowanych „dzikim” szczepem wirusa, po transfekcji plazmidem zawierającym insert (Ryc. 4).

W pierwszym etapie wykorzystuje się plazmidy transferowe zawierające fragment (z reguły gen) DNA wirusa vaccinia, którego ciągłość została przerwana poprzez wstawienie kasety ekspresyjnej składającej się z promotora wirusa vaccinia oraz miejsca polilinkera (ang. *polylinker site*), pozwalającego na wklonowanie obcego genu [71, 72]. Plazmidy te są tak zaprojektowane, że zrekombinowane wirusy mogą być rozróżnione od rodzicielskich za pomocą metod selekcji pozytywnej lub negatywnej dla fenotypu kinazy tymidylanowej (TK) [67, 71-73], selekcji za pomocą antybiotyku [73], czy też w oparciu o ekspresję  $\beta$ -galaktozydazy [71, 72].

Drugi etap, homologiczna rekombinacja, następuje po transfekcji komórek, które wcześniej zostały zain-

fekowane „dzikim” szczepem vaccinii. Rekombinacja ta występuje naturalnie, a z reguły ok. 0,1% wirusów potomnych zawiera w swoim genomie insert [74].

Aby dokładniej prześledzić sposób uzyskiwania zrekombinowanego wirusa założmy, że wektor zawiera kasetę ekspresyjną znajdującą się pomiędzy dwoma fragmentami najczęściej wykorzystywanego do tego celu genu kinazy tymidylanowej (TK) [71, 72]. Poprzez wstawienie kasety gen ten staje się nieczynny, zatem wektor posiada fenotyp TK<sup>-</sup>. Oprócz promotora p7.5 i miejsc dla enzymów restrykcyjnych, gdzie wstawiony został insert, kasetę posiada także drugi promotor, np. dla genów późnych (p11) zawierający gen LacZ [71, 72]. Po infekcji komórek „dzikim” szczepem wirusa o fenotypie TK<sup>+</sup>, następuje transfekcja wektorem TK<sup>-</sup>. W czasie namnażania się wirusa w cytoplazmie, dochodzi do zjawiska podwójnego crossing-over, a więc homologicznej rekombinacji pomiędzy segmentami genu TK wektora i wirusa. W ten sposób następuje wbudowanie kasety ekspresyjnej do genomu wirusa. Wirusy zrekombinowane, o fenotypie TK<sup>-</sup> są selekcjonowane w komórkach posiadających także fenotyp TK<sup>-</sup> i rosnących w pożywce z dodatkiem toksycznego analogu tymidyny 5-bromodeoksyurydyny (ang. *5-bromodeoxyuridine*: BrdU). Bromodeoksyurydyna, fosforylowana przez TK, po wbudowaniu do genomu wirusa hamuje wzrost niezrekombinowanych wirusów o fenotypie TK<sup>+</sup>.

Zastosowanie genu LacZ pozwala na identyfikację pożądaných rekombinantów TK<sup>-</sup>, LacZ<sup>+</sup> od spontanicznych mutantów TK<sup>-</sup> [71, 72]. W pożywce agarozowej zawierającej BrdU oraz X-gal, zrekombinowane wirusy LacZ<sup>+</sup>, a więc te, w których przypuszczalnie będzie się również znajdował gen-insert, dają kolonie koloru niebieskiego, w odróżnieniu od białych kolonii spontanicznych mutantów TK<sup>-</sup>. Wreszcie, ostateczna identyfikacja pożądaných klonów może nastąpić przy użyciu innych metod, np. immunoprecypitacji [70].

### III-3. Bezpośrednia ligacja insertu do genomu wirusa

Oprócz sposobu uzyskiwania zrekombinowanych wirusów vaccinia, opisanego powyżej, rozwinięto metody, w których gen-insert łączy się bezpośrednio do genomu wirusa, a następnie uzyskany DNA wprowadza się do komórek wcześniej zakażonych pomocniczym wirusem, którego rola polega na dostarczeniu enzymów oraz czynników wczesnej transkrypcji, wprowadzanych razem z wirionem do komórki podczas infekcji. Ponadto, zastosowane metody pozwalają wyeliminować proces rekombinacji homologicznej w celu uzyskania zrekombinowanych wirusów potomnych co wiąże się z większą wydajnością.

Scheifflinger F. i wsp. [75] skonstruowali zrekombinowane wirusy vaccinia za pomocą dwóch sposobów, w obu wykorzystując jako wirus pomoc-

niczy wirus ospy drobiu (ang. *fowlpox*), wyróżniający się tym, że (1) efektywnie namnaża się tylko w komórkach ptasich (w tym wypadku w fibroblastach embriionów kurzych) i (2) chociaż może infekować komórki ssacze (CV-1), to jednak cykl życiowy nie jest w nich ukończony. Natomiast wirus vaccinia nie jest aż tak ograniczony, jeżeli chodzi o wybór komórki-gospodarza i w zastosowanym układzie namnażał się zarówno w komórkach ptasich, jak i ssaczyc. Strategia polegała na tym, że najpierw wyizolowano DNA wirusa vaccinii, przecięto go enzymem restrykcyjnym, posiadającym tylko jedno miejsce cięcia (np. *SmaI* lub *NotI*) w nieistotnym dla cyklu życiowego wirusa miejscu, a potem połączono z przeciętym tak samo DNA insertu, którym był gen markerowy, fosforybozylotransferaza guaninowa, *gpt* (ang. *gpt-guanine phosphoribosyltransferase*) z *Escherichia coli*, sprzężony z promotorem *p7.5*. Następnie, mieszaninę ligacyjną podano do komórek (A) ssaczyc zakażonych wirusem ospy drobiu i (B) ptasich, zakażonych wirusem ospy drobiu. W przypadku (A) produkowany był tylko potomny wirus vaccinia, który zebrano i zakażono nim następne komórki ssacze hodowane w pożywce selekcyjnej dla *gpt*, co pozwoliło znaleźć klony zrekombinowanego wirusa. W przypadku (B) procedura była dłuższa, ponieważ w ptasich komórkach namnażały się dwa wirusy: *fowlpox* i vaccinia, które zebrano i zakażono nimi komórki ludzkie w celu wyeliminowania wirusa ptasiego, a dopiero potem szukano rekombinantów wirusa vaccinia.

W podobnym eksperymencie, w którym użyto genetycznie zmodyfikowanego DNA wirusa vaccinia (modyfikacja polegała na tym, że unikalne miejsce trawienia enzymem *NotI* przeniesiono w miejsce bezpośrednio za odpowiednikiem kodonu startu genu *TK*, tak, że wstawienie obcego DNA w to miejsce pozwala na selekcję klonów potomnych o fenotypie *TK<sup>-</sup>*), po jego przecięciu i ligacji z genem-insertem, wprowadzano mieszaninę ligacyjną za pomocą transekcji do komórek ssaczyc, zakażonych wcześniej wirusem vaccinia *ts42*, czyli wrażliwym na temperaturę, warunkowo letalnym szczepem wirusa [76]. Następnie hodowano komórki przez dwa dni w temperaturze 40°C. W tej temperaturze szczep *ts42* nie prowadzi replikacji swojego DNA, ani też rekombinacji homologicznej, co pozwoliło na uzyskanie wirusów potomnych niezmutowanych, typu dzikiego oraz zrekombinowanych, które później wyselekcjonowano. W kolejnej pracy doniesiono o modyfikacjach DNA wirusa vaccinia, pozwalających na bezpośrednie wstawienie genu-insertu i łatwiejszą selekcję [77]. Nowo skonstruowany DNA wirusa vaccinia posiadał dwa unikalne miejsca cięcia dla enzymów restrykcyjnych, *NotI* i *Apal*, umiejscowionych pomiędzy odpowiednikiem dla kodonu startu genu *TK*. Pozwala to na ukierunkowaną ligację, tzn. że klony potomne posiadają insert tylko w jednej orientacji. Dodatkowo, przed genem dla *TK* wstawiono silny promotor, jak *p7.5*.

Zastosowanie ligacji *in vitro* fragmentu DNA do genomu wirusa pozwoliło na ułatwienie we wstawieniu dużych fragmentów DNA, w porównaniu z metodą rekombinacji homologicznej. Największy fragment, jaki udało się wklonować w ten sposób, miał dł. 26 kbp, a delecja nieistotnych regionów wirusa vaccinia może jeszcze tą długość zwiększyć [76].

## IV. Zastosowanie zrekombinowanych wirusów vaccinia

### IV-1. Ekspresja obcych genów w komórkach eukariotycznych

Czas i stopień ekspresji genu wirusa vaccinia określa w dużej mierze „siła” jego promotora. W przypadku promotorów genów wczesnych, ekspresja występuje przed pojawieniem się rozległych efektów cytotoksycznych. Ogólnie biorąc, duże ilości pożądanego białka są produkowane, kiedy do ekspresji użyte są promotory późne [73, 78]. Wprowadzenie mutacji do promotora, zarówno wczesnego, jak i późnego, może zwiększyć jego „siłę” [40, 61, 71].

Inne podejście wykorzystuje wydajność, „siłę” i specyficzność promotora polimerazy RNA bakteriofaga T7 [79-81]. Gen polimerazy T7 wklonowuje się do wirusa vaccinia. Po infekcji komórek zrekombinowanym wirusem następuje transfekcja plazmidem, w którym pod kontrolą promotora dla polimerazy T7 znajduje się badany gen. Polimeraza T7, pochodząca od zrekombinowanego wirusa, kontroluje ekspresję tego genu. Zamiast plazmidu można użyć drugiego wirusa, do którego wbudowany został fragment zawierający promotor polimerazy T7 i dany gen. Ekspresję białka uzyskuje się wtedy poprzez równoczesną infekcję komórek obydwoma zrekombinowanymi wirusami.

Zrekombinowany wirus vaccinia pozwala nie tylko na uzyskiwanie dużych ilości białka przy użyciu promotora *p7.5* czy promotora i polimerazy T7, ale jednocześnie zapewnia możliwość modyfikacji potranslacyjnych produktu białkowego, m.in. N- i O-glikozylację [82, 83], fosforylację [84], cięcia proteolityczne [85, 86], transport do jądra [87] i przez błonę komórkową [88] oraz wydzielanie [89].

### IV-2. Badania odpowiedzi humoralnej i komórkowej

Po infekcji wirusowej w organizmie zwierzęcym pojawia się spektrum przeciwciał skierowanych przeciwko komponentom białkowym wirusa. Określenie jednak, które z nich mają właściwości neutralizujące infekcyjność wirusa nie jest zadaniem łatwym. W rozwiązaniu tego zadania może pomóc immunizacja zwierząt zrekombinowanym wirusem vaccinia, który jako wektor, zawiera tylko jeden, ulegający ekspresji, gen danego antygeny wirusowego. Podejście to może

być szczególnie korzystne jeżeli badany antygen jest białkiem błonowym, ponieważ będzie on prezentowany w sposób, który naśladuje naturalną infekcję. Surowica pochodząca od zwierząt szczepionych zrekombinowanym wektorem vaccinia zostaje następnie analizowana pod względem zdolności neutralizacji infekcji, *in vitro* i/lub *in vivo*.

Szczepienia żywym, zrekombinowanym wirusem dokonuje się z reguły śródskórnymi. W ten sposób, u różnych gatunków zwierząt, wykazano produkcję przeciwciał neutralizujących, skierowanych m.in. przeciwko białku błonowemu gp340 wirusa *Epsteina-Barra* (u królika) [90], glikoproteinie D wirusa opryszczki *Herpes simplex* (u myszy) [91], oraz glikoproteinie G wirusa wścieklizny (u myszy, szopa i lisa) [92-94].

Druga część odpowiedzi immunologicznej, odpowiedź komórkowa organizmu, wykorzystuje głównie limfocyty cytotoksyczne (CD8), które rozpoznają obce antygeny prezentowane w połączeniu z głównym czynnikiem zgodności tkankowej klasy pierwszej (MHC-I). Białka wirusowe, produkowane wewnątrz zainfekowanej komórki, ulegają częściowej hydrolizie, a ich fragmenty są następnie eksponowane na zewnątrz w formie peptydów w połączeniu z MHC-I. W takiej postaci są one rozpoznawane jako obce antygeny przez limfocyty cytotoksyczne. I znowu, podobnie jak w przypadku odpowiedzi humoralnej, użycie zrekombinowanego wektora vaccinia zawierającego pojedynczy gen, albo nawet fragment genu określonego czynnika infekcyjnego, pomaga w zorientowaniu się, które antygeny odpowiadają za zwiększoną aktywację limfocytów cytotoksycznych, a które pozostają „bierne”. W układzie *in vitro* komórki autologiczne lub dopasowane pod względem MHC-I infekuje się zrekombinowanym wektorem, zawierającym badany antygen, znakuje się radioaktywnym chromem  $^{51}\text{Cr}$  i następnie inkubuje z limfocytami pochodzącymi od zainfekowanego zwierzęcia [95, 96]. Stopień aktywacji komórek CD8 mierzy się poziomem radioaktywności w pożywce, wprost proporcjonalnym do ilości komórek prezentujących badany antygen, uszkodzonych w wyniku działania limfocytów cytotoksycznych.

Stosując zrekombinowany wirus, jako wektor, do stymulacji odpowiedzi komórkowej, warto jednak pamiętać o tym, że immunizowane zwierzęta wystawione są nie tylko na badany antygen, ale również na antygeny wirusa vaccinia, przeciwko którym także może się rozwinąć odpowiedź komórkowa [96-98]. Stąd może pojawić się konieczność użycia innego źródła antygeny do stymulacji *in vitro* wyizolowanych komórek, bądź komórek, które mają prezentować ten antygen jako „cel” dla limfocytów CD8 [99]. Jako alternatywa może służyć: infekcja komórek, dopasowanych pod względem MHC-I, za pomocą wirusa, z którego pochodzi dany antygen, transfekcja stała plazmidem ze sklonowanym genem kodującym ten antygen, lub też użycie fragmentów antygeny w postaci peptydów podanych do pożywki [99].

Opisując odpowiedź humoralną i komórkową, trzeba także wspomnieć o próbach użycia zrekombinowanych wirusów vaccinia do szczepień ochronnych zwierząt. W wielu przypadkach efekt ochronny związany jest z powstaniem przeciwciał neutralizujących, skierowanych przeciwko białkom płaszcza wirusa, kodowanym przez gen-insert. Np. dobrą protekcję osiągnięto przeciwko wirusowi grypy (influenza virus) i wirusom infekującym drogi oddechowe (ang. *respiratory syncytial viruses*), używając zrekombinowane wirusy vaccinia, prowadzące ekspresję białek powierzchniowych uprzednio wymienionych wirusów, natomiast rekombinanty wirusa vaccinia, kodujące nukleoproteiny, wykazywały słaby efekt ochronny [100, 101]. Użycie zrekombinowanego wirusa vaccinia, zawierającego gen dla białka G wirusa wścieklizny, do immunizacji lisów metodą doustną, doprowadziło do wysokiego stopnia ochrony tych zwierząt przed zachorowaniem [94]. Oprócz tego, doniesiono o połowym zastosowaniu szczepionki przeciwko wściekliznie, złożonej ze zrekombinowanego wirusa vaccinia i rozprzestrzenionej w przynęcie z pozytywnym skutkiem nad obszarem częstego występowania wścieklizny wśród kojotów [102]. Dotychczas uzyskane wyniki sugerują, że immunizacja dzikich zwierząt na szeroką skalę może być skuteczna, tym bardziej, że zrekombinowane wirusy vaccinia posiadają wiele cech typowych dla konwencjonalnych szczepionek, przygotowanych z żywych, osłabionych wirusów. Ponadto, są one ekonomiczne w produkcji, łatwe w przechowywaniu oraz dystrybucji, a także eliminują potencjalne niebezpieczeństwo powrotu do pełnej wirulencji.

## V. Uwagi końcowe

Rezultaty badań wskazują, że zrekombinowany wirus vaccinia już jest cennym narzędziem, stosowanym w immunologii doświadczalnej. Od pewnego czasu uwaga badaczy koncentruje się też na potencjalnym wykorzystaniu wirusa vaccinia oraz pokrewnych wirusów, jako szczepionki w praktyce weterynaryjnej i w leczeniu ludzi [przegląd zob. 103].

Dalsze perspektywy rozwoju technologii wykorzystującej zrekombinowane wirusy vaccinia stwarzają prace nad zmianami biologicznymi wirusa, ułatwiającymi klonowanie obcych genów i pozwalającymi na zwiększenie ich ekspresji oraz w kierunku zmniejszenia cytotoksyczności tego wirusa.

### Podziękowanie

Autor pragnie podziękować p. Agnieszce Kobielałk za cenną pomoc w przygotowaniu rycin.

Artykuł otrzymano 6 listopada 1997 r.

Zaakceptowano do druku 25 czerwca 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Jenner E (1959) W: Camac CNB (red) Classics of medicine and surgery. Dover, New York, str 213-240 cyt wg [89]

2. Baxby D (1977) *J Infect Dis* **136**: 453-455
3. Moss B (1985) W: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Melnick JL, Roizman B, Shope RE (red) *Virology* Raven, New York, str 685-704
4. Mackett M, Archard LC (1979) *J Gen Virol* **45**: 683-701
5. Esposito JJ, Knight JC (1985) *Virology* **143**: 230-251
6. Moss B (1990) *Annu Rev Biochem* **59**: 661-688
7. Moss B (1990) W: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Melnick JL, Roizman B, Shope RE (red) *Virology* 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, str 2079-2111
8. Baroudy BM, Venkatesan S, Moss B (1982) *Cell* **28**: 315-324
9. Garon CF, Barbosa E, Moss B (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4863-4867
10. Payne L (1978) *J Virol* **27**: 28-37
11. Payne LG (1992) *Virology* **187**: 251-260
12. Mathew E, Sanderson CM, Hollinshead M, Smith GL (1998) *J Virol* **72**: 2429-2438
13. Dales S, Kajioka R (1964) *Virology* **24**: 278-294
14. Rodriguez JF, Paez E, Esteban M (1987) *J Virol* **61**: 395-404
15. Stern W, Dales S (1976) *Virology* **75**: 232-241
16. Twardzik DR, Brown JP, Ranchalis JE, Todaro GJ, Moss B (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5300-5304
17. Buller RM, Chakrabarti S, Cooper JA, Twardzik DR, Moss B (1988) *J Virol* **62**: 886-874
18. Chung CS, Hsiao JC, Chang YS, Chang W (1998) *J Virol* **72**: 1577-1585
19. Joklik WK (1964) *J Mol Biol* **8**: 263-276
20. Holowczak JA (1972) *Virology* **50**: 216-232
21. Joklik WK (1964) *J Mol Biol* **8**: 277-288
22. Joklik WK, Becker Y (1964) *J Mol Biol* **10**: 452-474
23. Salzman NP (1960) *Virology* **10**: 150-152
24. Moss B, Ahn B-Y, Amegadzie B, Gershon PD, Keck JG (1991) *J Biol Chem* **266**: 1355-1358
25. Moss B, Salzman NP (1968) *J Virol* **2**: 1016-1027
26. Pennington TH (1974) *J Gen Virol* **25**: 433-444
27. Munyon WH, Kit S (1966) *Virology* **29**: 303-306
28. Kates JR, McAuslan B (1967) *Proc Natl Acad Sci USA* **57**: 314-320
29. Wei CM, Moss B (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 318-322
30. Kates J, Beeson J (1970) *J Mol Biol* **50**: 19-23
31. Ink BS, Pickup DJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1536-1540
32. Broyles SS, Fesler BS (1990) *J Virol* **64**: 1523-1529
33. Broyles SS, Yuen L, Shuman S, Moss B (1988) *J Biol Chem* **263**: 10754-10760
34. Gershon PD, Moss B (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4401-4405
35. Hu X, Carroll LJ, Wolffe EJ, Moss B (1996) *J Virol* **70**: 7669-7677
36. Hu X, Wolffe EJ, Weisberg AS, Carroll LJ, Moss B (1998) *J Virol* **72**: 104-112
37. Mars M, Beaud G (1987) *J Mol Biol* **198**: 619-631
38. Weir JP, Moss B (1987) *Virology* **158**: 206-210
39. Coupar BE, Boyle DB, Both GW (1987) *J Gen Virol* **68**: 2299-2309
40. Davison AJ, Moss B (1989) *J Mol Biol* **210**: 749-769
41. Yuen L, Moss B (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6417-6421
42. Shuman S, Moss B (1988) *J Biol Chem* **263**: 6220-6225
43. Deng L, Shuman S (1998) *Genes Dev* **12**: 538-546
44. Bajszar G, Wittek R, Weir JP, Moss B (1983) *J Virol* **45**: 62-72
45. Golini F, Kates JR (1984) *J Virol* **49**: 459470
46. Morgan JR, Roberts BE (1984) *J Virol* **51**: 283-294
47. Vos JC, Stunnenberg HG (1988) *EMBO J* **7**: 3487-3492
48. Keck JG, Baldick CJ, Moss B (1990) *Cell* **61**: 801-809
49. Pogo BG, Dales S (1969) *Proc Natl Acad Sci USA* **63**: 1297-1303
50. McAuslan BR, Kates JR (1967) *Virology* **33**: 709-716
51. Bauer WR, Ressner EC, Kates J, Patzke J (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 1841-1845
52. Moss B, Rosenblum EN, Garon CF (1973) *Virology* **55**: 143-156
53. Klemperer N, Ward J, Evans E, Traktman P (1997) *J Virol* **71**: 9285-9294
54. Patel DD, Pickup DJ (1987) *EMBO J* **6**: 3787-3794
55. Bertholet C, Van Meir E, ten Heggeler-Bordier B, Wittek R (1987) **50**: 153-162
56. Keck JG, Kovacs GR, Moss B (1993) *J Virol* **67**: 5740-5748
57. Wright CF, Coroneos AM (1993) *J Virol* **67**: 7264-7270
58. Wright CF, Hubbs AE, Gunasinghe SK, Oswald BW (1998) *J Virol* **72**: 1446-1451
59. Cooper JA, Wittek R, Moss B (1981) *J Virol* **39**: 733-745
60. Mahr A, Roberts BE (1984) *J Virol* **49**: 510-520
61. Davison AJ, Moss B (1989) *J Mol Biol* **210**: 771-784
62. Rosel JL, Earl PL, Weir JP, Moss B (1986) *J Virol* **60**: 436-439
63. Hänggi M, Bannwarth W, Stunnenberg HG (1986) *EMBO J* **5**: 1071-1076
64. Smith CA, Smith TD, Smolak PJ, Friend D, Hagen H, Gerhard M, Park L, Pickup DJ, Torrance D, Mohler K, Schooley K, Goodwin RG (1997) *Virology* **236**: 316-327
65. Ichihashi Y (1996) *Virology* **217**: 478-485
66. Weir JP, Moss B (1984) *J Virol* **51**: 662-669
67. Mackett M, Smith GL, Moss B (1984) *J Virol* **49**: 857-864
68. Cochran MA, Puckett C, Moss B (1985) *J Virol* **54**: 30-37
69. Yuen L, Moss B (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6417-6421
70. Earl PL, Hügen AW, Moss B (1990) *J Virol* **64**: 2448-2451
71. Davison AJ, Moss B (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 4285-4286
72. Chakrabarti S, Brechling K, Moss B (1985) *Mol Cell Biol* **5**: 3403-3409
73. Falkner FG, Moss B (1988) *J Virol* **62**: 1849-1854
74. Moss B (1991) *Science* **252**: 1662-1667
75. Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9977-9981
76. Merchlinsky M, Moss B (1992) *Virology* **190**: 522-526
77. Merchlinsky M, Eckert D, Smith E, Zauderer M (1997) *Virology* **238**: 444-451
78. Patel DD, Ray CA, Drucker RP, Pickup DJ (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9431-9435
79. Fuerst TR, Earl PL, Moss B (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 2538-2544
80. Fuerst TR, Moss B (1989) *J Mol Biol* **206**: 333-348
81. Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8122-8126
82. Ball LA, Young KK-Y, Anderson K, Collins PL, Wertz GW (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 246-256
83. Elango N, Prince GA, Murphy BR, Venkatesan S, Chanock RM, Moss B (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1906-1910
84. Guy B, Kiény MP, Riviere Y (1987) *Nature (Lond)* **330**: 266-269
85. Chakrabarti S, Robert-Guroff M, Wong-Staal F, Gallo RC, Moss B (1986) *Nature (Lond)* **320**: 535-537
86. Rice CM, Franke CA, Strauss JH, Hruby DE (1985) *J Virol* **56**: 227-239
87. Smith GL, Levin JZ, Palese P, Moss B (1987) *Virology* **160**: 336-345
88. Stephens EB, Compans RW, Earl P, Moss B (1986) *EMBO J* **5**: 237-245
89. Smith GL, Mackett M, Moss B (1983) *Nature (Lond)* **302**: 490-495
90. Mackett M, Arrand JR (1985) *EMBO J* **4**: 3229-3234
91. Cremer KJ, Mackett M, Wohlenberg C, Notkins AL, Moss B (1985) *Science* **228**: 737-740
92. Esposito J, Brechling K, Baer G, Moss B (1987) *Virus Genes* **1**: 7-21
93. Rupprecht CE, Wiktor TJ, Johnston DH, Hamir AN, Dietzschold B, Wunner WH, Glickman LT, Koprowski H (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7947-7950
94. Blancou J, Kiény MP, Lathe R, Lecocq JP, Pastoret PP, Soulebot JP, Desmettre P (1986) *Nature (Lond)* **322**: 373-375
95. McMichael AJ, Michie CA, Gotch FM, Smith GL, Moss B (1986) *J Gen Virol* **67**: 719-726

96. Bennink JR, Yewdell JW, Smith JW, Moller C, Moss B (1984) *Nature* (Lond) **311**: 578-579
97. Andrew ME, Coupar BEH, Ada GL, Voyle DB (1986) *Microbial Pathol* **1**: 443-452
98. Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, Moss B (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1785-1789
99. Bennink JR, Yewdell JW (1990) *Curr Top Microbiol Immunol* **163**: 153-184
100. Andrew ME, Coupar BEH, Boyle DB (1989) *Immunol Cell Biol* **67**: 331-337
101. King AM, Stott EJ, Langer SJ, Young KK, Ball LA, Wertz GW (1987) *J Virol* **61**: 2885-2890
102. Fearneyhough MG, Wilson PJ, Clark KA, Smith DR, Johnston DH, Hicks BN, Moore GM (1998) *J Am Vet Med Assoc* **212**: 498-502
103. Paoletti E (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11349-11353

## Regulacja ekspresji genu syntazy tymidylanowej

### Regulation of thymidylate synthase gene expression

MAGDALENA DĄBROWSKA\*

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Poziom syntazy tymidylanowej a aktywność proliferacyjna komórki
- III. Regulacja poziomu mRNA syntazy tymidylanowej w różnych fazach cyklu komórkowego
- IV. Autoregulacja translacji mRNA syntazy tymidylanowej
- V. Syntaza tymidylanowa jako enzym metaboliczny zdolny do wiązania mRNA c-myc i p53
- VI. Zakończenie

**Wykaz stosowanych skrótów:** cdk — kinazy cykliczne; DHFR — reduktaza dihydrofolianowa; D1694 — N<sup>10</sup>-metylotiofenowa pochodna 2-dezamino-5,8-dideazafolianu; E2F, Spl, Ets — czynniki transkrypcyjne; IRE-BP — (*iron responsive element — binding protein*); PCNA — jądrowy czynnik komórek proliferujących; Rb, p53 — białka supresorowe; RT:PCR — (*reverse transcription:polymerase chain reaction*); TS — syntaza tymidylanowa.

#### I. Wstęp

Syntaza tymidylanowa [EC 2.1.1.45] katalizuje reakcję metylacji pozycji C5 pierścienia pirymidynowego dUMP, zachodzącą w wyniku przeniesienia i redukcji grupy hydroksymetylowej N<sup>5,10</sup>-metylenotetrahydrofolianu, z jednoczesnym wytworzeniem dihydrofolianu i dTMP [1]. Reakcja ta stanowi w komórce jedyne źródło biosyntezy *de novo* dTMP, który jest następnie fosforylowany kolejno do dTDP i dTTP, będącego substratem polimerazy DNA [2]. Inhibicja aktywności syntazy tymidylanowej prowadzi do zahamowania podziałów komórek, dlatego też enzym ten wykorzystywany jest jako docelowy w chemioterapii [3-5].

Regulacja ekspresji dowolnego eukariotycznego ge-

#### Contents:

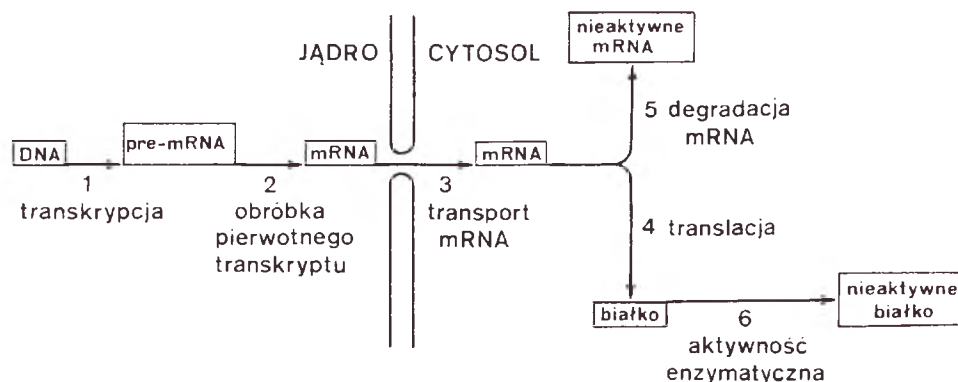
- I. Introduction
- II. Thymidylate synthase level and cell proliferative activity
- III. Cell cycle dependent regulation of thymidylate synthase mRNA level
- IV. Autoregulation of thymidylate synthase mRNA translation
- V. Thymidylate synthase as a metabolic enzyme binding c-myc and p53 mRNAs
- VI. Concluding remarks

nu kodującego białko enzymatyczne zachodzić może na etapie transkrypcji, obróbki pierwotnego transkrypty i transportu mRNA do cytoplazmy, translacji oraz regulacji aktywności białka enzymatycznego. Istotna może być także stabilność transkrypty i białka (Ryc. 1) [6, 7]. Regulacja ekspresji genu syntazy tymidylanowej w komórkach ssaczy zachodzi głównie na etapie obróbki pierwotnego transkrypty i translacji [8, 9]. Także aktywność enzymatyczna syntazy tymidylanowej może podlegać regulacji zależnej od aktywności polimerazy DNA, a zachodzącej prawdopodobnie za pośrednictwem nukleotydów tyminowych [2].

#### II. Poziom syntazy tymidylanowej a aktywność proliferacyjna komórki

Korelację wysokiej aktywności syntazy tymidylanowej z procesami proliferacji komórek wykazano w wielu układach biologicznych, w tym w wątrobie regenerującej i embrionalnej w porównaniu z wątrobą normalną, w szczurzej hepatomie oraz w ssących komórkach prawidłowych i nowotworowych *in vitro* [2]. Badając zależność aktywności syntazy tymidylanowej od fazy cyklu komórkowego stwierdzono, że w wyniku stymulacji wzrostu mysich fibroblastów aktywność

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



Ryc. 1. Sześć poziomów regulacji ekspresji genu eukariotycznego kodującego białko enzymatyczne [wg 6].

właściwa enzymu zwiększa się znacznie w fazie S, a więc wówczas, gdy zachodzi replikacja DNA [10]. W zsynchronizowanych mysich komórkach białaczkowych *in vitro* natomiast, aktywność właściwa syntazy tymidylanowej jest stała i nie zależy od fazy cyklu komórkowego [11]. Rozbieżność uzyskanych wyników jest zapewne konsekwencją tego, że w przypadku fibroblastów mierzono aktywność syntazy tymidylanowej w fazie S pierwszej po wyjściu komórek z fazy  $G_0$ , w przypadku zaś komórek białaczkowych oznaczono aktywność enzymu w fazie S, następującej po fazie  $G_1$  kolejnego cyklu podziałowego. W zakresie regulacji ekspresji różnych genów faza S cyklu komórkowego występująca jako pierwsza w komórkach poddanych stymulacji jest bowiem odmienna od faz S, kolejno następujących po sobie cykli podziałowych [12, 13]. Ekspresja polimerazy DNA alfa indukowana jest w fazie S po przerwaniu stanu spoczynku komórek, jednakże w fazach S kolejnych cykli proliferacyjnych obserwuje się jedynie nieznaczny wzrost poziomu mRNA i białka enzymu oraz jego aktywności. Uważa się zatem, że całkowicie odmiennie mechanizmy kierują regulacją ekspresji genu polimerazy DNA alfa przy wchodzeniu w cykl oraz w komórkach przechodzących kolejne cykle mitotyczne [14]. Podobnie, pomimo 10-krotnych wahań poziomu białka syntazy tymidylanowej występujących pomiędzy fazami S i  $G_2$  kolejnych cykli podziałowych ludzkich komórek raka sutka, 10-krotny wzrost ilości mRNA enzymu występuje tylko w pierwszej po synchronizacji wzroście komórek, fazie S [15]. Badania poziomu białka syntazy tymidylanowej w różnych fazach cyklu ludzkich komórek nowotworowych w hodowli asynchronicznej wykazały, że enzym ten nie występuje jedynie w komórkach będących w konfluencji, a więc w fazie  $G_0$  cyklu. Niewielkie różnice w poziomie tego enzymu występują między fazami  $G_0/G_1$ , S,  $G_2/M$  cyklu, znaczące zaś między komórkami będącymi w fazie wzrostu wykładniczego (38-60% komórek w fazie S) i w konfluencji (5-10% komórek w fazie S) [16]. Można więc przypuszczać, że tak jak w przypadku polimerazy DNA alfa odmiennie mogą być mechanizmy regulacji ekspresji genu syntazy tymidylanowej po przerwaniu stanu spoczynku i w komórkach przechodzących kolejne cykle. Powyższe wyniki wskazują również na występowanie korelacji pomiędzy zwiększonym pozio-

mem białka syntazy tymidylanowej i nie tyle fazą S cyklu komórkowego, co procesami proliferacji [16]. Ścisły związek pomiędzy wysoką aktywnością syntazy tymidylanowej a replikacją DNA wykazano w zsynchronizowanych mysich komórkach białaczkowych hodowanych *in vitro*. Zablockowanie syntezy DNA w dzielących się komórkach powoduje zahamowanie aktywności syntazy tymidylanowej mierzonej *in situ*, natomiast nie wywołuje zmiany aktywności właściwej enzymu, mierzonej w wyciągach komórkowych. Wydaje się zatem, że *in vivo* wysoka aktywność syntazy tymidylanowej sprzężona jest przede wszystkim z syntezą DNA, której zablockowanie prowadzi do zahamowania aktywności enzymu prawdopodobnie przez nagromadzający się produkt reakcji [11, 17]. Zahamowanie aktywności reduktazy rybonukleotydowej, topoizomerazy lub polimerazy DNA alfa wywołuje inhibicję aktywności syntazy tymidylanowej zarówno w mysich komórkach białaczkowych, jak i w fibroblastach ludzkich i chemicznych [11, 17-19]. Aktywności enzymów zaangażowanych w biosyntezę prekursorów (w tym syntazy tymidylanowej) i replikację DNA okazały się także tworzyć kompleks enzymatyczny w jądrach chemicznych fibroblastów będących w fazie S, natomiast nie występujący w jądrach komórek będących w fazie  $G_0/G_1$  [20]. Ewentualne związanie syntazy tymidylanowej w kompleksie multienzymatycznym stwarza możliwość interpretacji mechanizmu sprzężenia jej aktywności z replikacją DNA, jako polegającego na oddziaływaniach allosterycznych pomiędzy enzymami w kompleksie [19, 20].

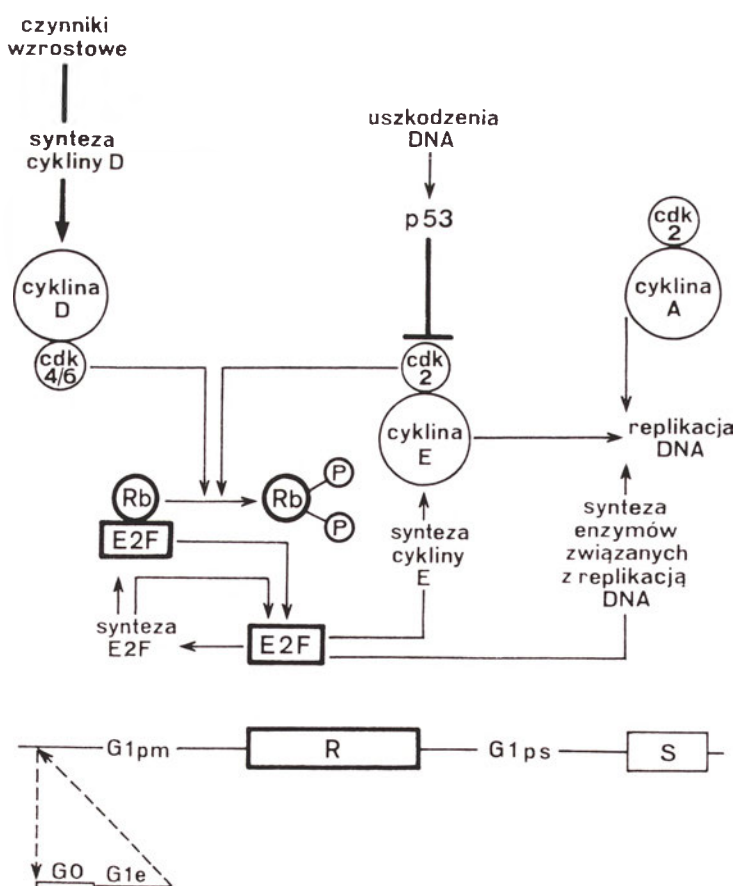
Wysoka aktywność syntazy tymidylanowej może być także utrzymywana w układach nie proliferujących, jakimi są niezaplodnione jaja muszki owocowej, jedwabnika morwowego i jeżowca [21-23]. Wydaje się, że wysoki poziom tego enzymu jest w przypadku niezaplodnionych jaj przejawem ich gotowości do rozpoczęcia podziałów [2]. Wzrost aktywności syntazy tymidylanowej w gruczołach przednich jedwabnika morwowego podczas zachodzącej w nich poliploidyzacji jąder, wskazuje natomiast na możliwość sprzężenia ekspresji tego enzymu z syntezą DNA pomimo braku aktywności mitotycznej [22]. Aktywność syntazy tymidylanowej porównywalna z tą, jaka występuje w regenerującej wątrobie szczura utrzymuje się także w larwach mięśniowych włośnia *Trichinella*

*spiralis*, w okresie gdy nie zachodzi w nich synteza DNA i nie obserwuje się ich wzrostu [24]. Może być to przejawem gotowości larw do rozpoczęcia intensywnego rozwoju po zainfekowaniu następnego żywiciela, a może mieć także związek z dość unikalną zdolnością tych larw do cofnięcia zróżnicowania komórek mięśniowych, w których się osiedlają, a następnie utrzymywania ich na granicy faz  $G_2/M$  cyklu komórkowego przez cały czas swojego w nich bytowania [25]. Nie można wykluczyć, że komórki w ciele larwy pozostają pod wpływem tych samych sygnałów co zainfekowane włókno mięśniowe [24].

### III. Regulacja poziomu mRNA syntazy tymidylanowej w różnych fazach cyklu komórkowego

Wczesne badania zależnej od cyklu komórkowego regulacji ekspresji genu syntazy tymidylanowej w mysich fibroblastach doprowadziły do wniosku, że wzrost aktywności enzymu w fazie S jest efektem zwiększonego poziomu transkrypcji genu [10]. Przynajmniej częściowa kontrola ekspresji na poziomie transkrypcji właściwa jest innym genom fazy S cyklu komórkowego, reduktazy dihydrofolianowej [26, 27], kinazy tymidynowej [28-30] i polimerazy DNA alfa [14, 31]. W utrzymywaniu tej kontroli istotną rolę koordynacyjną wydają się odgrywać czynniki transkrypcyjne rodziny E2F, których aktywność zależna jest od produktu genu supresora retinoblastomy, białka Rb (Ryc. 2), a także cyklin i kinaz zależnych od cyklu

komórkowego [12, 32-35]. W regionie promotorowym genu mysiej syntazy tymidylanowej, stwierdzono występowanie miejsca, mogącego potencjalnie wiązać czynniki transkrypcyjne E2F, jednakże jego inaktywacja znosi tylko nieznacznie występujące po stymulacji wzrostu, zwiększenie ilości mRNA enzymu [36]. Także kotransfekcja chomiczych fibroblastów, nie wytwarzających własnej syntazy tymidylanowej, plazmidem ekspresyjnym kodującym białko Rb wiążące czynniki E2F i plazmidem zawierającym gen reporterowy pod kontrolą promotora genu mysiej syntazy tymidylanowej, powoduje nieznaczne zahamowanie funkcji tego promotora [37]. Wydaje się zatem, że czynniki E2F nie odgrywają istotnej roli w regulacji ekspresji genu mysiej syntazy tymidylanowej [12, 36, 37]. Dla ludzkich komórek nowotworu kości zaobserwowano, że poziom syntazy tymidylanowej zależny jest od obecności aktywnych czynników transkrypcyjnych E2F [38-40]. Możliwe jest jednak, że regulacja ta zachodzi za pośrednictwem innych czynników, mogących oddziaływać z promotorem genu [37]. Istotne dla funkcji promotora zarówno mysiej jak i ludzkiej syntazy tymidylanowej wydają się być miejsca rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne Spl. a w przypadku genu mysiego prawdopodobnie także, przez czynniki Ets [36, 37, 41-43]. Sekwencje wiązania tych czynników występują jednak w promotorach wielu ssaczycy genów, których ekspresja nie zależy od fazy cyklu komórkowego. Ich wpływ zatem na skorelowaną ze wzrostem ekspresję syntazy tymidylanowej może być uzależniony od oddziaływań z innymi czynnikami



Ryc. 2. Rola białka Rb w przejściu punktu granicznego faz  $G_1$ , S cyklu komórkowego (na podstawie doświadczeń na mysich i ludzkich fibroblastach) [wg 35]. Punkt graniczny R cyklu komórkowego decyduje o wejściu komórki w stan replikacji i rozdziela fazę  $G_1$  na fazę  $G_1$ -pm (*post-mitosis*), której przebieg wymaga obecności czynników wzrostowych i na fazę  $G_1$ -ps (*pre S-phase*), która zachodzi niezależnie od ich obecności. Brak czynników wzrostowych w fazie  $G_1$ -pm powoduje wyjście komórki do fazy  $G_0$ , z której wejście tj.  $G_1$ -e ( $G_1$ -entry), do tego samego punktu w  $G_1$ -pm, z którego nastąpiło wyjście do  $G_0$ , zachodzi po upływie 8 godzin od podania czynników wzrostowych. W punkcie granicznym R zachodzi fosforylacja białka Rb przez kinazy zależne od cyklu komórkowego, cdk 4/6 (zależne od cykliny D) i następnie przez cdk 2 (zależną od cykliny E). Fosforylacja białka Rb powoduje uwolnienie czynników transkrypcyjnych E2F aktywujących między innymi transkrypcję genów, kodujących enzymy związane z replikacją DNA, osiągające maksimum aktywności w fazie S cyklu komórkowego.



[36]. Późniejsze badania wykazały, że w wyniku stymulacji wzrostu mysich fibroblastów znacznemu wzrostowi ilości mRNA syntazy tymidylanowej w fazie S cyklu komórkowego towarzyszy niewielki wzrost poziomu transkrypcji genu [44]. Także w przypadku pobudzonych do wzrostu ludzkich fibroblastów poziom transkrypcji genu syntazy tymidylanowej pozostaje niezmienny, pomimo obserwowanego wzrostu aktywności enzymu [45]. Zaproponowano więc, że w regulację ilości mRNA syntazy tymidylanowej w komórkach proliferujących zaangażowane są mechanizmy posttranskrypcyjne. Wzrost ilości mRNA przy niezmiennym poziomie transkrypcji genu po stymulacji wzrostu komórek, obserwuje się także dla innego białka zaangażowanego w procesy syntezy DNA, jądrowego czynnika komórek proliferujących PCNA. Uważa się, że istotną rolę odgrywa tu między innymi wzrost stabilności pierwotnego transkryptu [46]. Nie wiadomo jednak, czy także w przypadku syntazy tymidylanowej stabilność pierwotnego transkryptu jest istotna dla regulacji ekspresji genu.

Oporność ludzkich komórek raka jelita grubego na 5-fluorouracyl, będący prekursorem silnego inhibitora syntazy tymidylanowej 5-fluoro-dUMP, jest efektem wzrostu ilości białka enzymu, czemu nie towarzyszy wzrost ilości mRNA [47]. Także w przypadku ludzkich, zarówno normalnych jak i nowotworowych komórek nabłonka gruczołu młecznego, działanie *in vitro* inhibitora syntazy tymidylanowej D1694 (będącego chinazolinową pochodną N<sup>5,10</sup>-metylenotetrahydrofolianu), powoduje 10-40-krotny wzrost ilości białka enzymu przy stałej ilości jego mRNA. Zahamowanie transkrypcji nie powoduje zmiany poziomu ani mRNA ani białka enzymu. Jednocześnie, w obecności D1694 synchronicznie dzielące się komórki nie wykazują zależnych od faz cyklu komórkowego oscylacji ilości białka syntazy tymidylanowej. Enzym ten ulega konstytutywnej ekspresji na poziomie wyższym niż w komórkach nie poddanych działaniu inhibitora [15]. Powyższe wyniki wskazują, że mechanizmy posttranskrypcyjne odpowiedzialne są za wzrost poziomu syntazy tymidylanowej w fazie S oraz za nadanie oporności, jaką wykazują komórki po krótkotrwałym działaniu inhibitorów enzymu 5-fluorouracylu i D1694 [15, 47]. Także długotrwała (kilkumiesięczna) ekspozycja komórek na fluorodezoksyurydynę (prekursor 5-fluoro-dUMP) o stężeniach stopniowo zwiększanych, prowadzi do nabycia oporności wynikającej z nadprodukcji białka enzymu. U podstaw tej oporności może leżeć jednak amplifikacja genu syntazy tymidylanowej [48, 49].

Półokres trwania mRNA syntazy tymidylanowej w mysich fibroblastach będących zarówno w stanie spoczynku jak i pobudzonych do wzrostu, jest zbliżony i wynosi odpowiednio 9 i 7 godzin. Wzrost poziomu syntazy tymidylanowej w fazie S cyklu nie jest więc efektem wzrostu stabilności mRNA enzymu [44]. Podobnie dzieje się w przypadku komórek

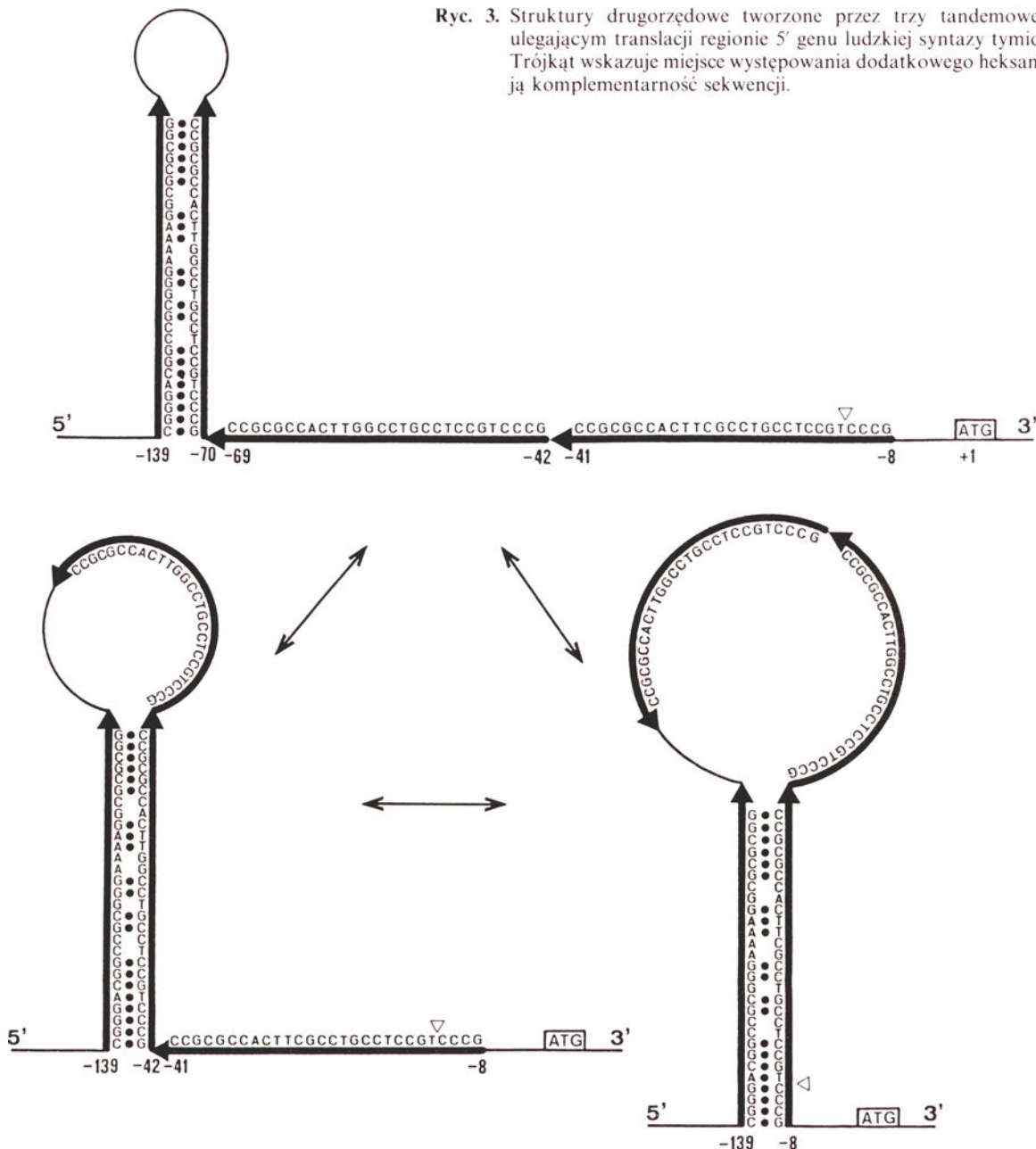
nabłonka gruczołu młecznego w warunkach działania D1694 [15].

Syntaza tymidylanowa należy do białek o strukturze silnie konserwowanej w toku ewolucji [1, 50]. Zgodność sekwencji aminokwasowej enzymu ludzkiego i mysiego sięga 90% [51]. W obydwóch przypadkach geny kodujące ten enzym zawierają 6 intronów [52, 53]. Na podstawie doświadczeń, w których mysie fibroblasty transfekowano konstrukcjami zawierającymi określone egzony, introny i sekwencje przylegające do genu mysiej syntazy tymidylanowej stwierdzono, że dla wystąpienia wzrostu ilości mRNA enzymu w fazie S cyklu komórek poddanych stymulacji, istotna jest obecność sekwencji promotorowej oraz prawidłowego przebiegu procesu wycięcia przynajmniej jednego intronu. Ważna wydaje się być nie tyle sekwencja intronu, co proces składania mRNA [54, 55]. Podobnie, w przypadku ludzkiej syntazy tymidylanowej indukcja ekspresji mRNA i białka enzymu w fazie S następuje wówczas, gdy obecna jest sekwencja promotorowa genu i intron 1 [56]. Oddziaływania występujące pomiędzy regionem promotorowym genu i co najmniej jednym intronem warunkują zatem ekspresję syntazy tymidylanowej, skorelowaną ze wzrostem komórek. Nie wyklucza się także współudziału innych czynników białkowych [8, 57]. Obecność intronów, pomimo tego, że nie warunkuje ekspresji białka, ma także wpływ na poziom mRNA wspomnianego powyżej PCNA zarówno w fazie G<sub>0</sub> jak i po stymulacji wzrostu komórek [58].

#### IV. Autoregulacja translacji mRNA syntazy tymidylanowej

Na regulację ekspresji ludzkiej syntazy tymidylanowej zachodzącą na etapie translacji, wskazywało występowanie trzech tandemowych powtórzeń o długości 28 nukleotydów, w nie ulegającym translacji regionie 5' [59, 60]. Powtórzenia te mogą tworzyć trzy wzajemnie przemienne i energetycznie stabilne struktury drugorzędowe (Ryc. 3), których obecność wpływa hamująco na poziom ekspresji enzymu. Zostało to stwierdzone dla mysich komórek nie wytwarzających własnego enzymu, transformowanych plazmidami zawierającymi cDNA ludzkiej syntazy tymidylanowej oraz różnej długości sekwencje poprzedzające kodon startu translacji [61]. Jak już wspomniano, wzrost poziomu i aktywności syntazy tymidylanowej występujący w ludzkich komórkach raka jelita grubego po krótkotrwałej ekspozycji na 5-fluorouracyl, jest efektem zwiększonej syntezy białka enzymu. Zjawisko to warunkuje oporność na cytostatyki, ponieważ 30-40% enzymu pozostającego w formie wolnej w komórce pozwala na utrzymanie syntezy DNA na poziomie umożliwiającym wzrost. Wywołana przez 5-fluorouracyl indukcja syntezy syntazy tymidylanowej jest więc efektem uprzedniego związania enzymu z inhibitorem [47]. Akumulacja białka syntazy tymidyla-

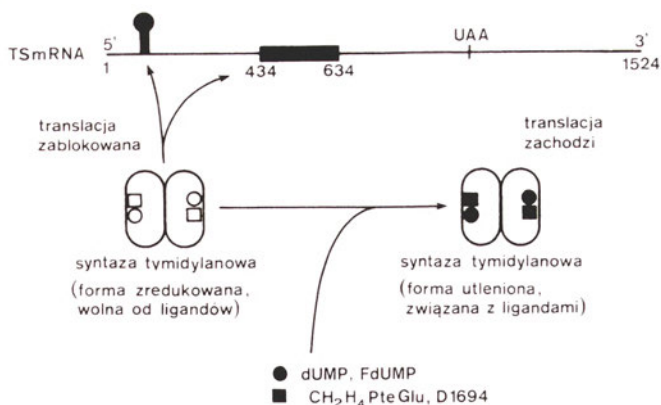
Ryc. 3. Struktury drugorzędowe tworzone przez trzy tandemowe powtórzenia w nie ulegającym translacji regionie 5' genu ludzkiej syntazy tymidylanowej [wg 60]. Trójkąt wskazuje miejsce występowania dodatkowego heksameru. Kropki oznaczają komplementarność sekwencji.



nowej w ludzkich komórkach nabłonka gruczołu mlecznego, spowodowana działaniem D1694, ustaje w obecności inhibitora translacji [15]. Wydaje się zatem, że zasadniczym etapem regulacji ekspresji syntazy tymidylanowej, stanowiącym podstawę oporności komórek na krótkotrwały stres cytostatyczny jest translacja.

Białko ludzkiej syntazy tymidylanowej wiąże się zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, z własnym mRNA [62, 63]. Translacja *in vitro* zostaje specyficznie zahamowana w obecności białka enzymu, natomiast całkowicie odblokowana w obecności substratów, dUMP i N<sup>5,10</sup>-metylenotetrahydrofolianu, jak i inhibitora, 5-fluoro-dUMP [62]. Fizjologiczne substraty oraz ich analogi współzawodniczą więc z mRNA o wiązanie przez enzym. W ich obecności mRNA nie jest skompleksowane z białkiem enzymu i zachodzi inicjacja translacji. Odblokowanie translacji następuje zatem w momencie zapotrzebowania na aktywność syntazy tymi-

dylanowej, czyli wówczas, gdy enzym jest wysycony substratem lub gdy stan taki jest symulowany w obecności inhibitora. Syntaza tymidylanowa przeprowadza więc regulację translacji własnego mRNA (Ryc. 4). Zidentyfikowano dwa regiony mRNA uczestniczące w tworzeniu kompleksu z białkiem enzymu. Jeden obejmuje obszar 188 początkowych nukleotydów mRNA, w obrębie którego zawarty jest kodon inicjacji translacji, a drugi obszar 200 nukleotydów sekwencji kodującej białko. W obrębie 188 nt może tworzyć się stabilna struktura drugorzędowa typu szpilki do włosów, której pętlę stanowi kodon inicjacji translacji. Dla właściwego rozpoznania białka konieczna jest obecność wewnątrz tej struktury heksameru GCCAUG. Bezpośrednio z białkiem syntazy tymidylanowej kontaktuje się obszar 36 nt. Nie ustalono żadnych sekwencji wspólnych dla obydwóch regionów wiązania białka, jednak możliwe jest występowanie pomiędzy nimi podobieństw strukturalnych [64].



Ryc. 4. Model autoregulacji translacji mRNA ludzkiej syntazy tymidylanowej [wg 9].  
 $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu-N}^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolian.

Także syntaza tymidylanow *E. coli* wiąże własne mRNA. Punktowe mutacje w białku tego enzymu, w miejscu wiązania  $\text{N}^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolianu oraz w reszcie cysteinowej centrum aktywnego znoszą tę zdolność, natomiast w miejscu wiązania dUMP (z wyjątkiem wyżej wspomnianej cysteiny) — pozostają bez wpływu na tworzenie kompleksów z mRNA. Oddziaływanie białko/mRNA syntazy tymidylanowej *E. coli* warunkowane jest więc bezpośrednim oddziaływaniem określonych obszarów białka z mRNA lub też zależy od nadawanej przez nie, konformacji enzymu [65].

Poprzez autoregulację translacji kontrolowana jest ekspresja niektórych białek bakteriofagów [66] oraz białek rybosomalnych *E. coli* [67]. W organizmach eukariotycznych, oprócz syntazy tymidylanowej także ekspresja ludzkiej DHFR, której jedną z funkcji jest regeneracja kofaktora dla reakcji syntazy tymidylanowej [2], może podlegać regulacji na drodze tworzenia się kompleksów RNA-białko, co hamuje inicjację translacji [68]. Wydaje się także, że translacja mRNA PABP (*poly(A)-binding protein*) regulowana jest w sposób negatywny przez białko PABP, przyłączające się do nie ulegającego translacji regionu 5' mRNA. PABP hamuje również translację własnego mRNA *in vitro* [69, 70]. W przypadku białek prokariotycznych łączących się z RNA, białka płaszczka bakteriofaga R17 [71] i syntetazy aminoacylo-tRNA *E. coli* [72] oraz eukariotycznego białka zaangażowanego w regulację metabolizmu żelaza IRE-BP (*iron responsive element binding protein*) [73-75], do skompleksowania RNA wymagana jest obecność zredukowanej grupy sulfhydrylowej. Także syntaza tymidylanowa wykazuje największe powinowactwo do własnego mRNA wówczas, gdy posiada zredukowane grupy sulfhydrylowe [76], co jest również warunkiem inicjacji procesu katalizy [1]. Nie wiadomo, czy autoregulacja ekspresji syntazy tymidylanowej właściwa jest także innym organizmom ssaczym. W procesie tworzenia się kompleksu ludzkiej syntazy tymidylanowej z jej własnym mRNA istotną rolę wydają się odgrywać nukleotydy sąsiadujące z kodonem AUG. Jednak pomimo dużej konserwaty-

wności sekwencji genów i białek syntaz tymidylanowych myszy, człowieka oraz innych organizmów, ten właśnie region cechuje się znaczną zmiennością [1, 55].

Autoregulacja translacji jest więc mechanizmem regulacji ekspresji dwóch genów fazy S cyklu komórkowego, syntazy tymidylanowej i reduktazy dihydrofolianowej. Także kinaza tymidynowa, kolejny enzym fazy S katalizujący reakcję fosforylacji tymidyny, a więc dostarczający prekursora do syntezy DNA, podlega regulacji na poziomie translacji. Zwiększa się bowiem poziom syntezy białka enzymu w fazie S cyklu, natomiast poziom mRNA pozostaje niezmienny [77, 78]. Przypuszcza się zatem, że regulacja translacji tych trzech białek decydować może o utrzymaniu właściwego poziomu syntezy dTMP w warunkach stresu cytotatycznego.

## V. Syntaza tymidylanowa jako enzym metaboliczny zdolny do wiązania mRNA c-myc i p53

Liczne białka, do których należą czynniki transkrypcyjne i regulatory wzrostu, wykazują zdolność wiązania z kwasami nukleinowymi, co stanowi podstawę regulacji ekspresji genów. Zidentyfikowano kilkanaście enzymów metabolicznych, które w komórkach eukariotycznych lub prokariotycznych, oprócz przeprowadzania różnych reakcji przemian energii, syntezy nukleotydów lub aminokwasów, posiadają także zdolność łączenia się z kwasami nukleinowymi, przez co uczestniczą w przetwarzaniu informacji genetycznej [79, 80]. Wśród tych enzymów, poza syntazą tymidylanową, wyróżnia się między innymi także ssacza dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerolowego (GAPDH), która jest enzymem glikolitycznym i jednocześnie łączy się z mRNA i tRNA, regulując w ten sposób ekspresję genów na poziomie translacji. GAPDH uczestniczy także w procesie naprawy DNA jako glikozylaza uracyl-DNA oraz w procesie replikacji DNA jako białko występujące w kompleksie polimerazy DNA alfa [81]. Inne przykłady enzymów tej grupy to drożdżowa dehydrogenaza izocytrynianowa, która jest enzymem cyklu kwasów trójkarboksylowych oraz przyłącza się do nie ulegających translacji regionów 5' mitochondrialnych mRNA [82], bakteryjna dehydrogenaza prolinowa, która utlenia prolinę do glutaminianu i reguluje własną ekspresję wiążąc się z DNA [83], ssacza dehydrogenaza glutaminianowa — kluczowy enzym łączący różne szlaki metaboliczne i przyłączający się specyficznie do mRNA oksydazy cytochromu c [84]. Także wspomniane powyżej białko IRE-BP, okazało się być cytozoolową akonitazą [85]. Podobnie DHFR, która spełnia istotną rolę na szlaku biosyntezy nukleotydów purynowych [86], posiada zdolność łączenia się z własnym mRNA *in vitro*. Powszechne występowanie, od organizmów prokariotycznych do ssaków z człowiekiem włącznie, enzymów metabolicznych przyłączają-

cych pochodne nukleotydowe wskazuje na to, że jest to silnie konserwowana dawna wartość ewolucyjna [80]. Cechą wspólną większości omawianych enzymów jest to, że w procesach katalizy ich kofaktorami są pochodne nukleotydowe. W przypadku syntazy tymidylanowej nukleotyd jest substratem reakcji. Wydaje się, że pierwotnie reakcja przeprowadzana była przez RNA, które następnie dokonało syntezy białka, a to z kolei ostatecznie zastąpiło RNA w funkcji katalitycznej. Koenzymy te stanowiłyby więc ewolucyjny relikw po cząsteczkach RNA, spełniających pierwotnie rolę enzymów [87, 88]. Miejsca wiązania koenzymów przez współczesne enzymy białkowe mogą być jednocześnie miejscami wiązania kwasów nukleinowych, co ma miejsce w przypadku syntazy tymidylanowej. Przyłączenie substratu lub mutacja cysteiny w centrum aktywnym enzymu znosi zdolność wiązania mRNA. Zjawisko autoregulacji translacji wydaje się być odzwierciedleniem pierwotnych oddziaływań białko/kwas nukleinowy, natomiast obserwowana w przypadku niektórych enzymów tej grupy (np. dehydrogenazy prolinowej) zdolność wiązania z DNA, jest być może konsekwencją ewolucyjnej zmiany materiału genetycznego z RNA na DNA [80]. Uważa się również, że łączenie się białek z kwasami nukleinowymi odzwierciedla stereospecyficzne oddziaływania, które legły u podstaw powstania kodu genetycznego [89]. Kompleksowanie więc własnego mRNA byłoby charakterystyczne dla białek starych ewolucyjnie, które zachowały zdolność do tego typu oddziaływań [80].

Syntaza tymidylanowa, poza zdolnością wiązania własnego mRNA, posiada także zdolność wiązania mRNA czynnika transkrypcyjnego c-Myc, jak i supresora nowotworu, białka p53. Obydwa białka, c-Myc i p53, pełnią istotną rolę w regulacji procesów wzrostu i śmierci komórek [90-93]. Ich ekspresja ulega zmianom w wyniku działania inhibitorów aktywności syntazy tymidylanowej. Pod wpływem fluorodezoksyurydyny następuje spadek ekspresji c-Myc, natomiast pod wpływem D1694 wzrost ekspresji p53 w ludzkich komórkach nowotworu jelita grubego [94, 95]. Wynika to prawdopodobnie z tego, że cytotoksyczność inhibitorów syntazy tymidylanowej jest konsekwencją fragmentacji DNA, zachodzącej w wyniku zahamowania aktywności enzymu [2]. Następstwem fragmentacji DNA jest natomiast wytworzenie sygnału regulującego procesy proliferacji i/lub śmierci komórek, w przekazywaniu którego uczestniczą białka c-Myc i p53 [95, 96]. Stosując metodę RT:PCR (*reverse transcription: polymerase chain reaction*), poprzedzoną immunoprecypitacją kompleksów rybonukleoproteinowych zawierających syntazę tymidylanową wykazano, że w ludzkich komórkach raka jelita grubego białko syntazy tymidylanowej połączone jest nie tylko z własnym mRNA lecz także z mRNA c-myc [63, 97]. Sekwencja 165 nukleotydów C-końcowego regionu c-myc mRNA odpowiedzialna jest za identyfikację i utworzenie kompleksu z białkiem syntazy tymidyla-

nowej. Jednocześnie sekwencja ta koduje istotny dla funkcji c-Myc, jako czynnika transkrypcyjnego, region zasadowy oraz motywy heliks-pętla-heliks. Obecność egzogennej syntazy tymidylanowej w systemie translacji *in vitro* mRNA c-myc specyficznie hamuje jej inicjację. Tak więc translacja mRNA c-myc jest regulowana w sposób negatywny przez białko syntazy tymidylanowej [97]. Przy zastosowaniu wyżej wspomnianej metody, wykazano także obecność mRNA białka p53 w rybonukleoproteinowych kompleksach syntazy tymidylanowej w komórkach raka jelita grubego. Podobnie jak do mRNA c-myc, białko syntazy tymidylanowej wykazuje wysokie powinowactwo do mRNA p53, hamując także jego translację *in vitro* [98]. Modyfikując metodę RT:PCR w taki sposób, że zamiast starterów o sekwencji specyficznej odpowiednio dla syntazy tymidylanowej, c-myc czy p53, wykorzystano startery uniwersalne, zidentyfikowano w komórkach raka jelita grubego 9 różnych RNA, powiązanych w kompleksach z białkiem syntazy tymidylanowej. Należą do nich między innymi mRNA białka 15 kDa indukowanego przez interferon i mRNA białka 8 zawierającego palce cynkowe. Nie ustalono jednak żadnej sekwencji wspólnej dla RNA wiązanych przez syntazę tymidylanową [99]. Przypuszcza się, że poprzez zdolność wiązania mRNA własnego, c-myc i p53, a także ze względu na lokalizację w cytoplazmie oraz w jądrze [100] i występowanie w komórce w formie ufosforylowanej, białko syntazy tymidylanowej może mieć istotny wkład w regulację cyklu komórkowego [101].

## VI. Zakończenie

Szczegółowe poznanie mechanizmów oddziaływania białka syntazy tymidylanowej z cząsteczkami mRNA może pomóc w opracowaniu nowych strategii chemioterapii. Obecnie stosuje się specyficzne inhibitory aktywności enzymatycznej. Informacje zdobyte dotychczas na temat autoregulacji translacji mRNA ludzkiej syntazy tymidylanowej pozwalają sądzić, że zniesienie ekspresji tego enzymu w komórce można uzyskać również (i) hamując aktywność enzymatyczną białka przy pomocy oligonukleotydów (ii) blokując inicjację translacji w wyniku utworzenia stabilnych kompleksów pomiędzy mRNA i białkiem enzymu lub syntetycznym peptydem, lub też cząsteczką symulującą działanie białka [102]. Interwencji farmakologicznej mogłby także podlegać proces oddziaływania mRNA syntazy tymidylanowej z jej mRNA antysensownym, który może występować w ludzkich komórkach nowotworowych. Na razie jednak dane o tym oddziaływaniu są niewystarczające by określić jego rolę w regulacji ekspresji genu syntazy tymidylanowej [103].

### Podziękowania

Autor wyraża podziękowanie prof. dr hab. Wojciechowi R o d e m u za ukierunkowanie i dyskusje przy przygotowa-

niu treści niniejszej pracy, dr Barbarze Gołos za cenę uwagi oraz mgr Marii Buszkowskiej za wykonanie rysunków.

Praca finansowana z grantu KBN nr 4 PO5F005 13.

Artykuł otrzymano 20 października 1998 r.

Zaakceptowano do druku 20 kwietnia 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Carreras CW, Santi DV (1995) *Annu Rev Biochem* **64**: 721-763
2. Rode W (1986) *Post biochem* **32**: 401-420
3. Rode W (1996) *Post Biochem* **42**: 133-140
4. Verweij J (1996) *Cancer Chemother Pharmacol* **38** (supl): S3-S10
5. Rustum YM, Harstrick A, Cao S, Vanhoefer U, Yin M-B, Wilke H, Seeber S (1997) *J Clin Oncol* **15**: 398-400
6. Alberts B, Bray D, Lewis J, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York, str 403
7. Pardee AB (1994) *J Cell Biochem* **54**: 375-378
8. Johnson LF (1994) *J Cell Biochem* **54**: 387-392
9. Chu E, Allegra CJ (1995) *BioEssays* **18**: 191-197
10. Navalgund LG, Rossana C, Muench AJ, Johnson LF (1980) *J Biol Chem* **255**: 7386-7390
11. Rode W, Scanlon KJ, Morson BA, Bertino JR (1980) *J Biol Chem* **255**: 1305-1311
12. Farnham PJ, Slansky JE, Kollmar R (1993) *BBA Rev Cancer* **1155**: 125-131
13. Burger C, Wick M, Brusselbach S, Muller R (1994) *J Cell Sci* **107**: 241-252
14. Wahl AF, Geis AM, Spain BH, Wong SW, Korn D, Wang TS-F (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 5016-5025
15. Keyomarsi K, Samet J, Molnar G, Pardee AB (1993) *J Biol Chem* **268**: 15142-15149
16. Pestalozzi BC, McGinn CJ, Kinsella TJ, Drake JC, Glennon MC, Allegra CJ, Johnston PG (1995) *British J of Cancer* **71**: 1151-1157
17. Rode W, Jastreboff MM, Bertino JR (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **128**: 345-351
18. Reddy GPV, Pardee AB (1983) *Nature (Lond)* **304**: 86-88
19. Boorstein RJ, Pardee AB (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **117**: 30-36
20. Reddy GPV, Pardee AB (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3312-3316
21. Carpenter NJ (1973) *Genetics* **75**: 113-122
22. Rode W, Szymanowska H (1976) *Insect Biochem* **6**: 333-337
23. Yasumasu I, Saitoh M, Fujimoto N, Kusunoki S (1979) *Develop Growth and Differ* **21**: 237-243
24. Dąbrowska M, Zieliński Z, Wrancisz M, Michalski R, Pawełczak K, Rode W (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **228**: 440-445
25. Jasmer DP (1993) *J Cell Biol* **121**: 785-793
26. Slansky JE, Farnham PJ (1996) *BioEssays* **18**: 55-62
27. Wells JM, Illenye S, Magae J, Wu C-L, Heintz NH (1997) *J Biol Chem* **272**: 4483-4492
28. Coppock DL, Pardee AB (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 2925-2932
29. Li L-J, Naeve GS, Lee AS (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3554-3558
30. Dou Q-P, Zhao S, Levin AH, Wang J, Helin K, Pardee AB (1994) *J Biol Chem* **269**: 1306-1313
31. Pearson BE, Nasheuer HP, Wang SF (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 2081-2095
32. Nevins JR (1992) *Science* **258**: 424-429
33. Taya Y (1995) *Mol Cells* **5**: 191-195
34. Weinberg RA (1995) *Cell* **81**: 323-330
35. Zetterberg A, Larson O, Wiman KG (1995) *Current Opinion in Cell Biology* **7**: 835-842
36. Ash J, Liao W-C, Ke Y, Johnson LF (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 4649-4656
37. Lee Y, Chen Y, Chang L-S, Johnson LF (1997) *Exp Cell Res* **234**: 270-276
38. Li W, Fan J, Hochhauser D, Banerjee D, Zielinski Z, Almasan A, Yin Y, Kelly R, Wahl GM, Bertino JR (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10436-10440
39. Li W, Fan J, Hochhauser D, Bertino JR (1997) *Cancer Res* **57**: 2193-2199
40. Fan J, Bertino JR (1997) *Oncogene* **14**: 1191-1200
41. Deng T, Li Y, Jolliff K, Johnson LF (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 4079-4082
42. Joliff K, Li Y, Johnson LF (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 2267-2274
43. Horie N, Takeishi K (1997) *J Biol Chem* **272**: 18375-18381
44. Jenh CH, Geyer PK, Johnson LF (1985) *Mol Cell Biol* **5**: 2527-2532
45. Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, Kaneda S, Takeishi K, Seno T (1986) *J Mol Biol* **190**: 559-567
46. Chang CD, Ottavio L, Travali S, Lipson KE, Baserga R (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 3289-3296
47. Chu E, Koeller DM, Johnston PG, Zinn S, Allegra CJ (1993) *Mol Pharmacol* **43**: 527-533
48. Berger SH, Jenh CH, Johnson LF, Berger FG (1985) *Mol Pharmacol* **28**: 461-467
49. Jenh CH, Geyer PK, Baskin F, Johnson LF (1985) *Mol Pharmacol* **28**: 80-85
50. Cieśla J, Weiner KXB, Weiner RS, Reston JT, Maley GF, Maley F (1995) *Biochim Biophys Acta* **1261**: 233-242
51. Perryman SM, Rossana C, Deng T, Vanin EF, Johnson LF (1986) *Mol Biol Evol* **3**: 313-321
52. Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, Shimizu K, Goth O, Seno T, Ayusawa D (1990) *J Biol Chem* **265**: 20277-20284
53. Deng T, Li D, Jenh CH, Johnson LF (1986) *J Biol Chem* **261**: 16000-16005
54. Ash J, Ke Y, Korb M, Johnson LF (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 1565-1571
55. Ke Y, Ash J, Johnson LF (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 376-383
56. Takayangi A, Kaneda S, Ayusawa D, Seno T (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 4021-4025
57. Li Y, Li D, Osborn K, Johnson LF (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 1023-1029
58. Ottavio L, Chang C-D, Rizzo M-G, Travali S, Casadevall C, Baserga R (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 303-309
59. Takeishi K, Kaneda S, Ayusawa D, Shimizu K, Gotoh O, Seno T (1985) *Nucleic Acids Res* **13**: 2035-2043
60. Takeishi K, Kaneda S, Ayusawa D, Shimizu K, Gotoh O, Seno T (1989) *J Biochem* **106**: 575-583
61. Kaneda S, Takeishi K, Ayusawa D, Shimizu K, Seno T, Altman S (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 1259-1270
62. Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood D, Zinn S, Allegra CJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8977-8981
63. Chu E, Voeller DM, Jones KL, Takechi T, Maley GF, Maley F, Segal S, Allegra CJ (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 207-213
64. Chu E, Voeller D, Koeller DM, Drake JC, Takimoto CH, Maley GF, Maley F, Allegra CJ (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 517-521
65. Voeller DM, Changchien L, Maley GF, Maley F, Takechi T, Turner RE, Montfort WR, Allegra CJ, Chu E (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 869-875
66. Andrade M, Guild N, Hsu T, Gold L, Tuerk C, Karam J (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7942-7946
67. Yates JL, Arfsten AE, Nomura M (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1837-1841
68. Chu E, Takimoto CH, Voeller D, Grem JL, Allegra CJ (1993) *Biochemistry* **32**: 4756-4760
69. de Melo Neto OP, Standart N, de Sa CM (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 2198-2205
70. Bag J, Wu J (1996) *Eur J Biochem* **237**: 143-152
71. Romaniuk PJ, Uhlenbeck OC (1985) *Biochemistry* **24**: 4239-4244
72. Starzyk RM, Koontz SW, Schimmel P (1982) *Nature (Lond)* **298**: 136-140
73. Klausner RD, Harford JB (1989) *Science* **246**: 870-872

74. Theil BC (1990) *J Biol Chem* **265**: 4771-4774
75. Haile DJ, Hentze MW, Rouault TA, Harford JB, Klausner RD (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 5055-5061
76. Chu E, Voeller DM, Morrison PF, Jones KL, Takechi T, Maley GF, Maley F, Allegra CJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 20289-20293
77. Sherley JL, Kelly TJ (1988) *J Biol Chem* **263**: 8350-8358
78. Ito M, Conrad SE (1990) *J Biol Chem* **265**: 6954-6960
79. Hentze MW (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 101-103
80. Kyrpides NC, Ouzounis CA (1995) *J Mol Evol* **40**: 564-569
81. Sirover MA (1996) *Life Sciences* **58**: 2271-2277
82. Elzinga SDJ, Berdnarz AL, Oosterum KV, Dekker PJT, Grivell LA (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 5328-5331
83. Menzel R, Roth J (1981) *J Mol Biol* **148**: 21-44
84. Preiss T, Hall AG, Lightowers RN (1993) *J Biol Chem* **268**: 24523-24526
85. Kennedy MC, Mueller-Mende L, Blondin GA, Beinert H (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11730-11734
86. Kornberg A (1980) *W: DNA Replication*, WH Freeman and Company, San Francisco, str 39-85
87. Gilbert W (1986) *Nature (Lond)* **319**: 618
88. White HB III (1976) *J Mol Evol* **7**: 101-104
89. Melcher G (1974) *J Mol Evol* **3**: 121-140
90. Cox LS, Lane DP (1995) *Bio Assays* **17**: 501-508
91. Lemaitre JM, Buckle RS, Mechali M (1996) *Adv Cancer Res* **70**: 95-144
92. Ryan KM, Birnie GD (1996) *Biochem J* **314**: 713-721
93. White E (1996) *Genes Dev* **10**: 1-15
94. Li Z-R, Yin M-B, Arredondo MA, Schober C, Rustum YM (1994) *Biochem Pharmacol* **48**: 327-334
95. Yin MB, Voigt W, Panadero A, Vanhoefer U, Frank C, Pajovic S, Azizkhan J, Rustum YM (1997) *Mol Pharmacol* **51**: 630-636
96. Matsui S-i, Arredondo MA, Wrzosek C, Rustum YM (1996) *Cancer Res* **56**: 4715-4723
97. Chu E, Takechi T, Jones KL, Voeller DM, Copur SM, Maley GF, Maley F, Segal S, Allegra CJ (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 179-185
98. Chu E, Copur S, Jones KL, Khleif S, Voeller D, Maley GF, Maley F, Allegra CJ (1995) *Proc Am Ass Cancer Res* **36**: 536
99. Chu E, Cogliati T, Copur SM, Borre A, Voeller DM, Allegra CJ, Segal S (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 3222-3228
100. Reddy GPV (1982) *Biochem Biophys Res Commun* **109**: 908-915
101. Samsonoff WA, Reston J, McKee M, O'Connor B, Galivan J, Maley G, Maley F (1997) *J Biol Chem* **272**: 13281-13285
102. Chu E, Grem JL, Johnston PG, Allegra C (1996) *Stem Cells* **14**: 41-46
103. Dolnick BJ (1997) *Pharmacol Ther* **75**: 179-184

## 7th Symposium of the European Society for the Study of Purine & Pyrimidine Metabolism in Man

Gdańsk (Poland)  
14—18 September, 1999

---

### Organized for ESSPPMM

by the Faculty of Biotechnology University of Gdańsk & Medical University of Gdańsk and the Gdańsk Branch of the Polish Biochemical Society.

**Chairman of the Organizing Committee: Prof. Dr Wiesław Makarewicz**

The principal aim of the Symposium is to provide forum for interdisciplinary presentation of current research in both basic and clinical aspects of purine metabolism in man. Every effort will be made to ensure a good blend of interests, with metabolism, enzymology, biochemical pathology, receptor signalling & regulation, molecular biology and clinical and therapeutic aspects receiving similar coverage.

---

#### Information and inquiries:

PP'99  
Dr. A.C. Składanowski  
Department of Biochemistry  
Medical University of Gdańsk  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland  
Tel/fax: (+ 48 58) 3021386  
e-mail: pp99@amedec.amg.gda.pl.

See also at the Internet page: <http://www.amg.gda.pl/~pp99>

# W jaki sposób aneksyny, rozpuszczalne białka wiążące wapń, tworzą w błonie kanały jonowe?

## How annexins, soluble calcium-binding proteins, may form ion channels in the membrane?

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA<sup>1</sup>,  
SŁAWOMIR PIKUŁA<sup>2</sup>

*Transmembrane protein evolution presents problems for Darwinians.  
There is no use in a pump that only partially penetrates a bilayer.  
Peter Nicholls i wsp., 1992 [1]*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa aneksyn i ich oddziaływanie z błoną
- III. Kanały jonowe tworzone przez aneksyny
  - III-1. Kanały wapniowe zależne od potencjału błonowego
  - III-2. Kanały anionowe
- IV. Regulacja aktywności kanałów jonowych przez aneksyny
- V. Uwagi końcowe

### I. Wstęp

Białka transportujące, które występują w komórkach współcześnie żyjących organizmów tworzą ze względu na swe funkcje i właściwości rodziny, takie jak: permeazy bakteryjne, mitochondrialne białka nośnikowe, główne integralne białka błonowe, uniportery, symportery i antyportery, kanały jonowe zależne od potencjału błonowego i ATPazy [1-3]. Wszystkie wymienione białka są białkami integralnymi błony. Często dane na temat mechanizmów transportu różnych substancji uzyskuje się w badaniach kanałów tworzonych przez peptydy. Struktura wielu z nich, np. alametycyny z grzyba *Trichoderma viride* [5,6], lub toksyn bakteryjnych, jak  $\alpha$ -hemolizyna czy kolicyna [7], dzięki metodom krystalograficznym, została opisana z rozdzielczością pozwalającą na identyfikację poszczególnych atomów [4]. Toksyny bakteryjne z nieszkodliwych, rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek, przekształcają się w śmiertelnie niebezpieczne dla komórki czynniki (w wyniku związania z błoną plazmatyczną, agregacji na jej powierzchni, nagromadzenia się w dwuwarstwę lipidową i ostatecznie wytworzenia kanału w błonie) [7]. Niektóre z tych

### Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of annexins and their interaction with the membrane
- III. Ion channels formed by annexins
  - III-1. Voltage-dependent calcium channels
  - III-2. Anion channels
- IV. Regulation of anionic channels activity by annexins
- V. Concluding remarks

toksyn, określane jako  $\beta$ -CFT (*ang.*  $\beta$ -barrel channel-forming toxins), ulegają oligomeryzacji, a inne, określane jako  $\alpha$ -CFT ( *$\alpha$ -helical channel-forming toxins*), nie tworzą oligomerów. Znane są również peptydy lub białka (np. prion,  $\beta$ -amyloid), o strukturze  $\alpha$ -helikalnej, które destabilizują błony głównie w wyniku oddziaływań hydrofobowych. Destabilizacja ta może mieć duże znaczenie w procesach fuzji komórek, np. podczas zapłodnienia, w egzocytocie i w transporcie białek, ale także w niektórych stanach patologicznych, takich jak zakażenie wirusem, choroba Alzheimera lub choroba Creutzfeldta-Jakoba [8, 9].

Inne białka, którym przypisuje się aktywność kanałową, aneksyny, nie są białkami błonowymi. Białka te tylko w określonych warunkach oddziałują z lipidami błon biologicznych, zmieniając przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej dla jonów. Analizując strukturę tych białek, spróbujemy w niniejszym artykule znaleźć odpowiedź na pytanie, w jaki sposób rozpuszczalne białka mogą tworzyć kanały jonowe, i jakie to ma znaczenie dla funkcjonowania komórek.

### II. Budowa aneksyn i ich oddziaływanie z błoną

Aneksyny tworzą rodzinę homologicznych białek wiążących wapń, które wiążą się z błonami zawierającymi obdarzone ładunkiem ujemnym cząsteczki fosfolipidów w sposób zależny od stężenia jonów wapnia,

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

a proces ten ulega odwróceniu w obecności chelatorów wapnia, takich jak EGTA. Istnieją także izoformy aneksyn, które pozostają związane z błoną nawet w obecności EGTA, ale ich rozmieszczenie w komórce i struktura nie są dobrze poznane [10]. Ostatnio wysunięto przypuszczenie, że mechanizm niezależnego od  $\text{Ca}^{2+}$  wiązania aneksyn z błonami polega na oddziaływaniu aneksyn z ufosforylowanymi białkami błonowymi, regulowanemu przez procesy fosforylacji i defosforylacji [11]. W cząsteczce aneksyny II wykryto również specyficzną domenę, dzięki której białko w sposób niezależny od wapnia oddziałuje ze swoim receptorem na błonie [12]. Dodatkowo zaobserwowano, że wzrost poziomu peroksydacji lipidów może wpływać na odwiązywanie aneksyn od błon, czemu towarzyszy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  [13].

W komórkach ssaków aneksyny są kodowane przez 10 genów; ponadto występuje wiele specyficznych tkankowo lub gatunkowo izoform (aneksyny ssaków oznaczone są cyframi rzymskimi I-VIII, XI i XIII) [14]. Jakkolwiek właściwości biochemiczne i struktura molekularna aneksyn były bardzo intensywnie badane, dane na temat ich funkcji *in vivo* są nadal nieliczne [15-17]. Dzięki zdolności do oddziaływania *in vitro* z białkami cytoszkieletu oraz wywoływania agregacji i fuzji błon, aneksynom przypisuje się rolę w endo- i egzocytozie [18]. Ponieważ aneksyny modulują aktywność fosfolipazy  $A_2$ , stąd przypuszczenie, że mogą odgrywać rolę w procesach zapalnych [15, 16, 19]. Zaobserwowano również, że aneksyny są substratami różnych kinaz białkowych, a także oddziałują z białkami biorącymi udział w mitozie, co może sugerować ich udział w różnicowaniu się i proliferacji komórek [20]. Niektóre z nich tworzą kanały jonowe w błonach sztucznych oraz wiążą się z błonami organelli wydzielniczych lub magazynujących wapń w komórce [21-24]. Różnorodność funkcjonalna aneksyn jest dla wielu badaczy trudna do zrozumienia, do tego stopnia, że zadają pytanie, po co aneksyny istnieją w komórce? [25]. Niedawno przedstawiono dowody doświadczalne, że aneksyny można zaliczać do zróżnicowanej rodziny białek wiążących ATP/GTP [26-31], co tym bardziej rozszerza listę procesów, na które białka te mogą wpływać *in vivo*.

W cząsteczkach aneksyn wyróżnia się część N-kończową i część rdzeniową. Część rdzeniowa zbudowana jest z czterech (aneksyny, I-V, VII-XIII) lub ośmiu (aneksyna VI) powtarzających się domen składających się z 72 reszt aminokwasowych, wykazujących wysokie wzajemne podobieństwo: w obrębie tych domen zlokalizowane są miejsca wiązania jonów wapnia i cząsteczek fosfolipidów [10, 15, 32-35]. W odróżnieniu od części rdzeniowej białka, rejon N-końcowy jest bardziej zróżnicowany, od 11 do 196 reszt aminokwasowych, gra rolę regulatorową i odpowiada prawdopodobnie za specyficzne funkcje różnych aneksyn [33-35].

Najlepiej zbadaną aneksyną pod względem struktury krystalicznej jest aneksyna V z tkanek człowieka, szczura i kury. Poznano również strukturę krystaliczną aneksyn I, II, IV i VI z tkanek człowieka, wołu i kury, oraz aneksyny XII ze stulbi *Hydra vulgaris* (Tab. 1). Ze względu na duże podobieństwo struktury pierwszorzędowej aneksyny te mają podobną strukturę trzecio- i czwartorzędową. Na podstawie pomiarów dichroizmu kołowego [47] stwierdzono, że przeważająca część łańcucha peptydowego aneksyn ma strukturę  $\alpha$ -helikalną. Jak wspomniano, w cząsteczkach aneksyn występuje cztery lub osiem wydzielonych domen (oznaczonych odpowiednio cyframi rzymskimi I-IV lub I-VIII) (Ryc. 1). Każda z nich składa się z pięciu  $\alpha$ -helis (oznaczanych literami A-E), układających się dodatkowo w prawoskrętną superhelisę o dwóch skrętach. Cztery z wymienionych  $\alpha$ -helis (A-D) są ułożone w stosunku do siebie antyrównolegle, podczas gdy piąta (E) prostopadle do pozostałych. Cząsteczka białka jest płaska, lekko zakrzywiona, z dwiema hydrofilowymi powierzchniami, wklęsłą i wypukłą. Na wypukłej powierzchni znajdują się miejsca wiążące wapń. Domeny II i III oraz I i IV (a także VI i VII oraz V i VIII w aneksynie VI) są ze sobą ściśle połączone oddziaływaniami hydrofobowymi w dwa (lub cztery) symetryczne moduły. Pomiedzy modułami przeważają oddziaływania polarne i jonowe [48, 49]. Aneksyna VI jest prawie dwukrotnie większa od pozostałych i składa się z ośmiu domen (Ryc. 1) [48, 49]. Każda z dwóch 4-domenowych części aneksyny VI przypomina jednak inne aneksyny. Połówki białka są położone prostopadle względem siebie i połączone 49-aminokwasowym odcinkiem  $\alpha$ -helikalnym. Pomiedzy nimi tworzą się cztery mostki siarczkowe [49], dzięki czemu prawie 11% powierzchni białka jest izolowane od środowiska zewnętrznego.

Aneksyny zdolne są do oddziaływania ze sobą i tworzenia dimerów (aneksyna VII z *Dictyostelium discoideum* [35], trimerów (aneksyna V [40]), heksamerów (aneksyna XII z *Hydra vulgaris* [46]) i większych agregatów, co udowodniono z zastosowaniem chemicznego sieciowania i mikroskopii elektronowej [44, 50, 51].

Miejsca wiążące wapń w cząsteczce aneksyny tworzy pętla o sekwencji Gly-dowolny aminokwas-Gly-Thr i dodatkowo oddzielona od niej o 38 reszt aminokwasowych reszta Asp (lub Glu). Jon wapnia jest koordynowany przez trzy atomy tlenu z grup karbonylowych w pętli i grupę karboksylową reszty kwasu asparaginowego (lub kwasu glutaminowego), a także cząsteczki wody. Sfera koordynacyjna kationu ma kształt pięciobocznej piramidy, w której odległości pomiędzy atomami wapnia i tlenu wynoszą 2,4-2,7 Å. Takie miejsca wiązania kationów, charakteryzujące się stałą powinowactwa w stosunku do  $\text{Ca}^{2+}$  w zakresie stężeń mikro-milimolarnych, określa się miejscem typu II [35], w odróżnieniu od miejsc typu I o strukturze "EF hand", występujących w kalmoduli-



Tabela 1.

Krystalizacja aneksyn.

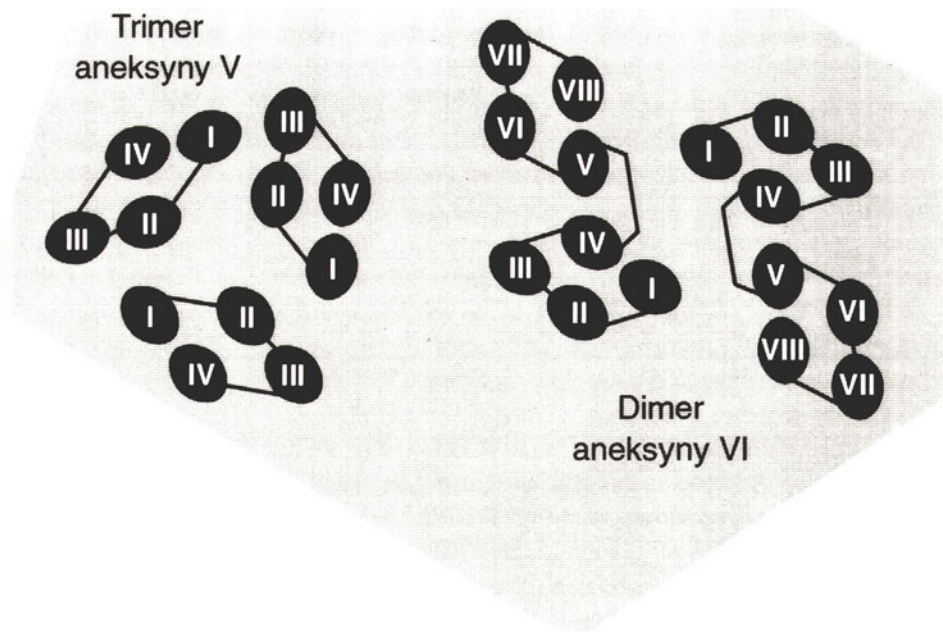
A	Tkanka	Układ kryształu	Parametry sieciowe komórki elementarnej kryształu (Å)			Symetria kryształu	A na A.C.U.	Rozdzielczość dyfrakcji (Å)
			<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>			
I	produkt genu*	b.d.	139,4	67,5	42,1	P <sub>2</sub> <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1	2,5
II	produkt genu*	b.d.	124,7	64,5	49,4	P <sub>2</sub> <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1	2,3
IV	łożysko ludzkie	ortorombowy	105,4	115,7	80,7	C222 <sub>1</sub>	1 lub 2	2,5
	wątroba wołowa	heksagonalny	121,0	121,0	83,0	R3	1	2,5
		wydłużony rombony	33,1	123,7	48,9	P <sub>2</sub> <sub>1</sub>	1	b.d.
	wątroba kurza	trygonalny	99,4	99,4	96,2	R3	1	2,2
V	produkt genu*	izomorficzny	99,3	99,3	129,9	P6 <sub>3</sub>	1	3,0
	naczyniówka ludzka	wydłużony rombony	83,9	80,9	71,4	P <sub>2</sub> <sub>1</sub>	2	2,2-2,4
	łożysko ludzkie	heksagonalny	98,6	98,6	129,6	P6 <sub>3</sub>	2	2,5
		romboedralny	99,6	99,6	97,2	P3	1	2,5
	nerka szczurza	heksagonalny	156,8	156,8	36,9	R3	1	2,2
		heksagonalny	93,0	93,0	125,0	P6 <sub>3</sub> 22	1	b.d.
wątroba kurza	trygonalny	99,4	99,4	96,2	R3	1	2,25	
VI	łożysko ludzkie	tetragonalny	68,1	68,1	256,0	P4 <sub>1</sub>	1	6,0
	wątroba wołowa	tetragonalny	68,4	68,4	209,6	P4 <sub>1</sub>	1	< 10,0
XII	<i>Hydra vulgaris</i>	b.d.	71,2	179,2	100,7	P <sub>2</sub> <sub>1</sub>	6	2,8

Dane dotyczące 3-wymiarowych kryształów aneksyn zaczerpnięto z następujących prac: aneksyna I [36]; aneksyna II [37]; aneksyna IV [38]; aneksyna V [39-43]; aneksyna VI [44, 45]; aneksyna XII [46]. Skróty: A—aneksyna; A.C.U. (ang. *asymmetric crystal unit*) — asymetryczna komórka sieciowa kryształu; b.d. — brak danych. \*Produkt ekspresji genu *ANXI*, *ANXII* i *ANXV* z tkanek ludzkich w bakteriach.

nie, troponinie C i parwalbuminie (Ryc. 2) [33, 52]. Miejsca wiążące wapń w cząsteczkach aneksyn przypominają miejsce wiążące wapń w centrum katalitycznym fosfolipazy A<sub>2</sub> [53].

Miejsca wiążące wapń typu II okazały się być też miejscami wiążącymi fosfolipidy, biorącymi udział w tworzeniu mostków wapniowych w trakcie powierzchniowego oddziaływania aneksyn z błonami [54, 55]. Mechanizm wiązania aneksyn z błonami polega na tym, że jedna z cząsteczek wody w sferze koordynacyjnej kationu ulega zastąpieniu przez atom tlenu pochodzący z grupy fosforanowej cząsteczki fosfolipidu. Większe powinowactwo aneksyn w stosunku do fosfatydoseryny niż do innych klas fosfolipidów wynika

prawdopodobnie z faktu, że atom tlenu w grupie karboksylowej seryny może brać udział w koordynacyjnym wiązaniu dodatkowego jonu wapnia, co wzmacnia oddziaływanie aneksyny z błoną. Mogłoby to tłumaczyć wzrost powinowactwa białka w stosunku do Ca<sup>2+</sup> [54]. W cząsteczce aneksyny występuje jeszcze jedna klasa miejsc wiążących wapń zwanych miejscami typu III, które w odróżnieniu od typu II, wykazują wyższe powinowactwo do jonów lantanu [39]. W przypadku aneksyny V stwierdzono, że w niskim stężeniu jonów wapnia kationy ulegają wiązaniu w domenach I, II i IV [40]. Wraz ze wzrostem stężenia wapnia, dodatkowy jon ulega wiązaniu w domenie III aneksyny, dochodzi do zmiany konformacyjnej, w wy-



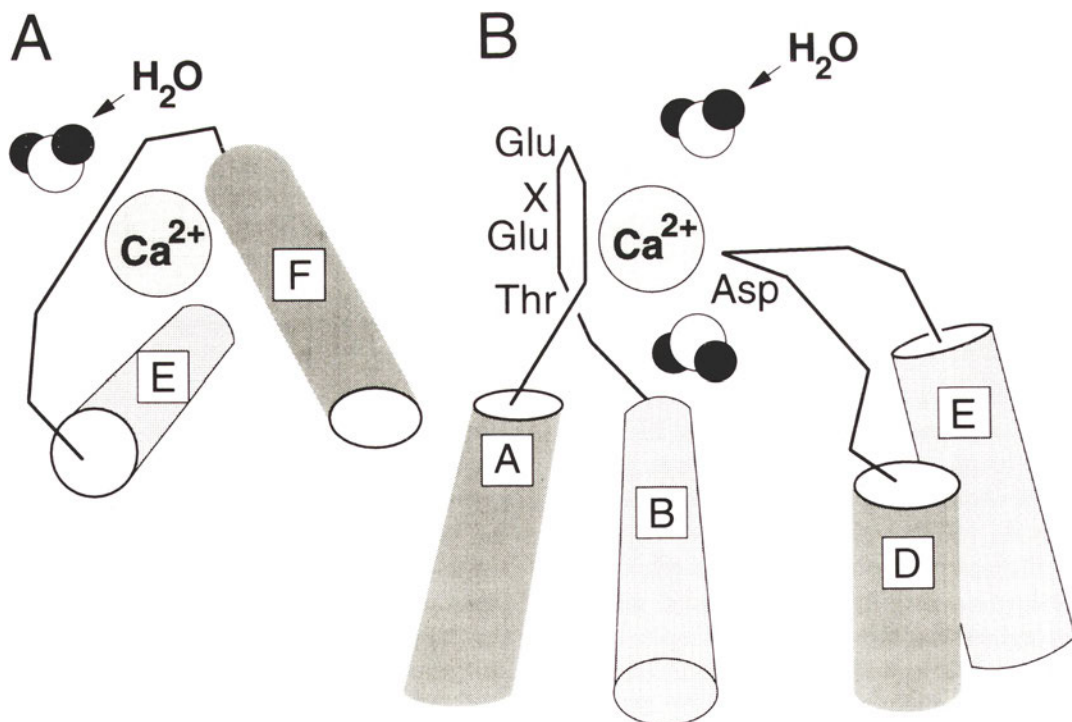
**Ryc. 1.** Domenowa budowa cząsteczek aneksyn. Organizacja domen w cząsteczkach aneksyny V (trimer) i aneksyny VI (dimer) związanych z błoną. Cyframi rzymskimi oznaczono domeny, w obrębie których znajdują się miejsca wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  (typu II) i fosfolipidów [wg 48, 49].

niku której pojedyncza reszta tryptofanu znajdująca się wewnątrz cząsteczki zmienia swoje położenie o 18 Å, ulegając ekspozycji do środowiska zewnętrznego [56].

Oddziaływanie aneksyn z błoną zachodzi bez penetracji białka w głąb dwuwarstwy lipidowej [30, 51, 57], a towarzyszą mu zmiany w powierzchniowej warstwie błony [58]. W przypadku aneksyny VI łącznik pomiędzy dwoma połówkami cząsteczki zapewnia odpowiednią giętkość białku [29, 59], ułatwiającą prawdopodobnie udział tej aneksyny i fuzji pęcherzyków wy-

dzielniczych [18, 45].

Aneksyny zmieniają swoje rozmieszczenie w komórce, wiążąc się z błoną plazmatyczną lub błonami organelli wewnątrzkomórkowych w odpowiedzi na zmiany cytosolowego [60-64] lub jądrowego [65] stężenia wapnia, w wyniku pobudzenia komórki. W niektórych przypadkach jest to związane z fosforylacją określonych białek błonowych [11]. Przypomina to zachowanie kaleksycyny. Kaleksycyna jest białkiem wiążącym GTP i wapń (zawiera miejsca wiązania wapnia o strukturze "EF-hand");



**Ryc. 2.** Czwartorzędowa struktura miejsc wiążących jony wapnia w cząsteczce kalmoduliny (A) i aneksyny V (B). W strukturze „EF-hand” kalmoduliny, wiązania koordynacyjne dla  $\text{Ca}^{2+}$  pochodzą z jednego azotu tlenu głównego łańcucha polipeptydowego, pięciu atomów tlenu łańcuchów bocznych i atomu tlenu z cząsteczki wody. Pętla pomiędzy  $\alpha$ -heliksami E i F w cząsteczce kalmoduliny ma strukturę  $\beta$ -zgięcia. W miejscu wiążącym  $\text{Ca}^{2+}$  aneksyny (pętla AB), wiązania koordynacyjne pochodzą z trzech atomów tlenu (reszty Glu-X-Glu-Thr pętli pomiędzy  $\alpha$ -heliksami A i B) i grupy karboksylowej (reszta Asp pętli pomiędzy  $\alpha$ -heliksami C i D) oraz atomów tlenu z dwóch cząsteczek wody [wg 33, 52].

stanowi również substrat kinazy białkowej C. Ulega translokacji do błon w wyniku fosforylacji, a jednocześnie okazała się wpływać na aktywność kanałów potasowych w błonie fibroblastów oraz zmieniać przepuszczalność błon dla wapnia w komórkach Purkiniego [66].

### III. Kanały jonowe tworzone przez aneksyny

#### III-1. Kanały wapniowe zależne od potencjału błonowego

W centrum cząsteczki aneksyn znajduje się hydrofilowy kanał, którego wnętrze zbudowane jest między innymi z obdarzonych ładunkiem reszt aminokwasowych. W kanale tym związane są również cząsteczki wody [48, 67]. Pomiary z zastosowaniem metody "patch-clamp" i sond fluorescencyjnych świadczą, że kanał ten wykazuje selektywność w stosunku do jonów wapnia [24, 68]. Ostatnio badania te znalazły potwierdzenie dzięki uzyskaniu kryształów aneksyny V w kompleksie z pochodną benzotioazepiny, K201 [42]. Związek ten hamuje aktywność kanału wapniowego tworzonego przez aneksynę w błonie [69].

Ponieważ zebrane dotąd informacje tworzą obraz aneksyn jako białek oddziałujących na powierzchni błony [17], to rodzi się pytanie, w jaki sposób jony mogą być transportowane przez aneksyny. W przypadku izoform kinazy białkowej C zależne od wapnia wiązanie się z błoną wywołuje znaczny wzrost powinowactwa enzymu do  $Ca^{2+}$  i reguluje aktywność kinazy [70]. Podobny mechanizm aktywacji jest proponowany dla cytosolowych proteinaz, kalpain [71].

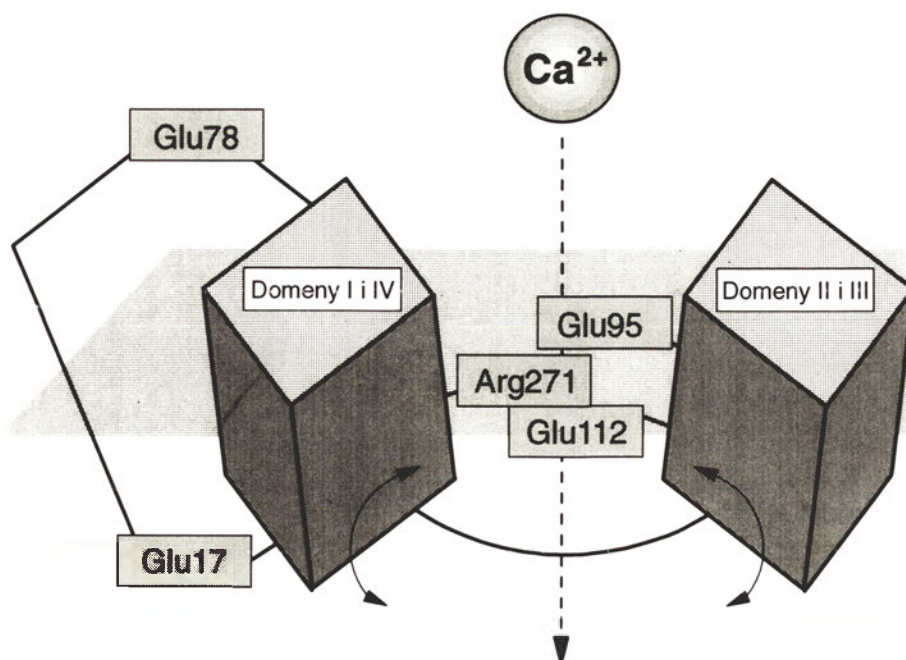
W przypadku aneksyny V badania z zastosowaniem mutacji punktowych i pomiaru aktywności pojedynczych kanałów pozwoliły stwierdzić, że mutacja Glu112→Gly112 wywołuje zanik mechanizmu bramkowania kanału przez zmiany potencjału błonowego

oraz utratę przez aneksynę selektywności w stosunku do  $Ca^{2+}$  na rzecz kationów jednowartościowych [72]. Podobne skutki wywołała mutacja Glu95→Ser95, co sugeruje, że filtr selektywności kanału jest umiejscowiony w jego części hydrofilowej [68]. Elementem czujnika potencjału błonowego jest także reszta Arg271, zaś reszty Glu17 i Glu78, kontrolując kąt nachylenia poszczególnych domen, regulują przepływ kationów przez kanał hydrofilowy w białku (Ryc. 3) [67, 73].

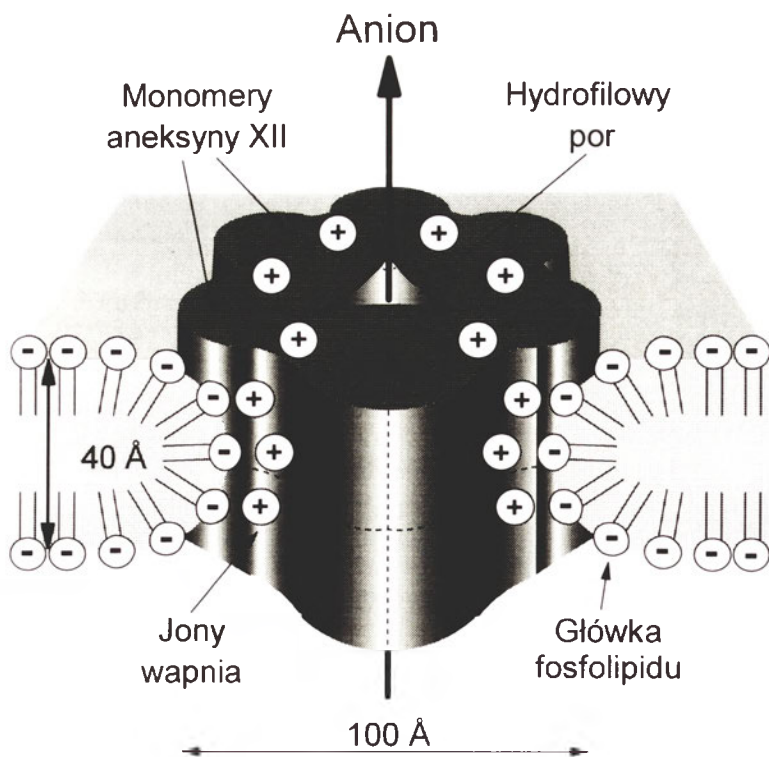
Próbując wyjaśnić tworzenie porów w błonie pod wpływem wiązania się aneksyny V z dwuwarstwą lipidową proponowano pogląd, że aneksyna ze związanymi jonami wapnia jest mikroskopijnej wielkości elektroporatorem, działającym dzięki dużej lokalnie różnicy potencjałów pomiędzy białkiem a powierzchnią dwuwarstwy [74, 75]. Dodatkowo zaobserwowano, że nie tylko tworzenie kanałów przez aneksynę, ale również adsorpcja białka na błonie zależy od potencjału błonowego [23].

#### III-2. Kanały anionowe

W przypadku aneksyny XII z *Hydra vulgaris*, na podstawie analizy kryształów tego białka, zaproponowano inny model oddziaływania aneksyn z błoną. Według tego modelu monomeryczna aneksyna nie penetruje błony. Dopiero większe agregaty, np. heksamery, stabilizowane przez jony wapnia (Ryc. 4), mogą wbudowywać się w błonę [46]. Zmieniają one lokalnie strukturę błony z dwuwarstwowej w micelarną, dzięki obecności osiemnastu jonów wapnia na obrzeżu heksameru, które oddziałują z polarnymi główkami fosfolipidów błonowych. W centrum heksameru o średnicy 100 Å i grubości 70 Å znajduje się hydrofilowy por w kształcie lejka (o średnicy w największym miejscu 8 Å i całkowitej długości 70 Å). Do wnętrza pora wyeksponowane są reszty Lys132,



Ryc. 3. Aneksyna V jako kanał wapniowy zależny od potencjału błonowego [wg 67, 73].



Ryc. 4. Heksamer aneksyny XII tworzy kanał anionowy w błonie liposomów. Oddziaływanie aneksyny z błoną reprezentuje nowy mechanizm wbudowania białek w dwuwarstwę lipidową, któremu towarzyszy lokalna zmiana struktury błony z dwuwarstwowej w micellarną. Hydrofilowy por w cząsteczce aneksyny tworzą reszty Lys132, Lys122 i Lys137 z każdego monomeru [46]. Linie przerywane oznaczają granice monomerów.

Lys128 i Lys137 (z każdego monomeru białka), co warunkuje selektywność kanału dla anionów. Podobny kanał, utworzony w wyniku molekularnego modelowania z cząsteczek aneksyny V, wykazywałby selektywność w stosunku do kationów [46]. Reszty lizyny w heksamerze XII biorą także udział w zależnym od potencjału błonowego bramkowaniu kanału [46]. Tworzenie heksameru aneksyny XII mogłoby być ułatwione w czasie fuzji błon [76].

Analizując teoretycznie przepływ jonów przez kanał w aneksynie stwierdzono, że średnica pora w monomerze białka jest zbyt mała (1 Å) w porównaniu z jego długością (15 Å), by wyjaśnić zmierzone doświadczalnie przewodnictwo pojedynczego kanału (2,8 pA, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 90 mV) [73]. Średnica ta powinna mieć teoretycznie 15 Å [46]. W przypadku heksameru aneksyny XII długość pora jest zbyt duża (70 Å), chociaż jego średnica (8-10 Å) jest zbliżona do wartości domyślnej wyliczonej teoretycznie [46]. Mimo tej niezgodności faktem jest, że aneksyny *in vitro* tworzą w błonach sztucznych i naturalnych, wyizolowanych z komórki, kanały jonowe o podobnej charakterystyce [21-24, 34, 73, 77].

#### IV. Regulacja aktywności kanałów jonowych przez aneksyny

Niektóre z aneksyn zmieniają przepuszczalność błon dla jonów pośrednio, wpływając na inne układy transportujące zlokalizowane w błonie plazmatycznej lub w błonach sarkoplazmatycznego retikulum. Receptory rianodyny (RyR) tworzą rodzinę wewnątrzkomórkowych kanałów uwalniających wapń z błon endo(sarko)plazmatycznego retikulum. W organizmach ssaków występują trzy izoformy tych kanałów:

RyR1 przeważa w mięśniach szkieletowych, RyR2 w mięśniu sercowym, a RyR3 w mózgu. W większości tkanek ekspresji ulega więcej niż jedna izoforma RyR [78]. RyR1, podobnie jak inne izoformy kanału, jest homotetramerem o masie cząsteczkowej 4 × 564 kDa, z czterema ściśle związanymi cząsteczkami immunofiliny (FKBP12), białka o masie cząsteczkowej 12 kDa [79]. Kanał ten selektywnie przepuszcza jony wapnia. W obecności rianodyny dochodzi do zmiany kanału z formy o wysokiej przepuszczalności w formę o niskiej przepuszczalności dla kationów. Większość ligandów, które regulują aktywność RyR, takich jak Ca<sup>2+</sup>, rianodyna, fosforan, kofeina, suramina, kalmodulina, FKBP12, ATP, adenozylna i cADP-ryboza, oddziałuje z domeną cytosolową kanału [10, 80]. Jedynym znanym dotąd wyjątkiem jest aneksyna VI, która wiążąc się z białkiem kanałowym od strony eksponowanej do wnętrza cysterny sarkoplazmatycznego retikulum wywołuje w stężeniach nanomolowych prawie 3-krotny wzrost prawdopodobieństwa otwarcia kanału i ponad 80-krotny wzrost średniego czasu otwarcia kanału [81-83].

Cząsteczki aneksyn odznaczają się częściową homologią do regulatora przewodnictwa błonowego, białka CFTR [26]. Białko CFTR jest kanałem chlorkowym, którego funkcja regulowana jest przez dwie domeny wiążące nukleotydy (NDB1 i NDB2) oraz domenę regulatorową. Przepływ jonów chlorkowych zachodzi tylko wtedy, gdy domeny NDB zwiążą ATP, który ulega następnie hydrolizie. Białko CFTR współdziała z kanałem sodowym. Funkcja CFTR jest modulowana przez cAMP, który powoduje otwarcie kanału chlorkowego, co wpływa na częściowe zahamowanie przepływu jonów sodu [84]. W przypadku aneksyny IV zaobserwowano, że wiąże się ona do błony komó-

rek nabłonkowych, gdzie występują kanały chlorkowe zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  i prawdopodobnie zmienia płynność i strukturę błony, hamując aktywność tych kanałów [85, 86].

## V. Uwagi końcowe

W niniejszym artykule przeglądowym zostały zebrane dane świadczące o tym, że aneksyny, rozpuszczalne białka wiążące wapń i fosfolipidy, są zdolne do zmiany przepuszczalności błon dla jonów. Mimo, że analiza teoretyczna wydaje się wskazywać, że zarówno charakter tych białek (rozległe powierzchnie hydrofilowe), jak i ich budowa ( $\alpha$ -heliksy w cząsteczce aneksyny są zbyt krótkie, by całkowicie przechodzić przez dwuwarstwę lipidową), nie pozwalają aneksynom tworzyć w błonie kanałów jonowych w klasycznym rozumieniu tego terminu. Potwierdzają ten pogląd pewne dane doświadczalne, określające charakter oddziaływań aneksyn z błoną, jako powierzchniowy. Z drugiej strony, dobrze udokumentowane obserwacje uzyskane z zastosowaniem metody „patch-clamp” i sond fluorescencyjnych do badania transportu kationów, metody mutacji punktowych i analizy krystalograficznej białek, prowadzą do przeciwnych wniosków.

Czy zatem aneksyny są białkami rozpuszczalnymi, które uzyskały pewne cechy białek błonowych? Wewnątrzkomórkowa lokalizacja aneksyn i zdolność do jej zmiany w wyniku pobudzenia komórki świadczy, że oddziaływanie z błoną plazmatyczną i błonami organeli komórkowych ma znaczenie funkcjonalne. Zdolność oddziaływania z różnymi ligandami, od białek cytoszkieletu i transportowych, po fosfolipidy i nukleotydy, rozszerza listę procesów, w których aneksyny mogą być zaangażowane *in vivo*. Aneksyny oddziałują specyficznie przede wszystkim z fosfatydyloseryną, fosfolipidem, który odgrywa rolę w fuzji błon biologicznych. Aneksyny tworzą także na powierzchni błony oligomery i większe agregaty, które szczególnie w momencie lokalnej zmiany struktury błony, np. w trakcie fuzji błon, mogą tworzyć kanały jonowe, jak to opisano dla aneksyny XII. Przyszłe badania powinny rozstrzygnąć, jaki jest mechanizm tworzenia przez aneksyny kanałów jonowych w błonach i jakie jest znaczenie tego procesu w komórce.

## Podziękowanie

Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego nr 6 P04A 027 14 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Artykuł otrzymano 9 lutego 1998 r.

Zaakceptowano do druku 6 kwietnia 1998 r.

## Piśmiennictwo

- Nicholls P, Rand RP, Fuller N, Butko P (1992) *Biochem Soc Trans* **20**: 583-589
- Walker JE, Saraste M (1996) *Curr Opin Struct Biol* **6**: 457-459

- Saier MH Jr (1993) *BioEssays* **16**: 23-29
- Marsh D (1996) *Biochem J* **315**: 354-361
- Bechinger B (1997) *J Membr Biol* **156**: 197-211
- Breed J, Kerr ID, Molle G, Duclouhier H, Sanson MSP (1997) *Biochim Biophys Acta* **1330**: 103-109
- Goaux E (1997) *Curr Opin Struct Biol* **7**: 566-573
- Brasseur R, Pillot T, Lins L, Vandekerckhove J, Rosseneu M (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 167-171
- Liberski PP (1997) *Post Biochem* **43**: 229-230
- Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1997) *Post Biochem* **43**: 111-119
- Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH (1997) *Biochem J* **328**: 447-452
- Jost M, Zeuschner D, Seemann J, Weber K, Gerke V (1997) *J Cell Sci* **110**: 221-228
- Hoyal CR, Thomas AP, Forman HJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 29205-29210
- Morgan RO, Fernandez MP (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**: 508-515
- Raynal P, Pollard HB (1994) *Biochim Biophys Acta* **1197**: 63-93
- Bandorowicz-Pikuła J (1997) *Post Biol Kom* **23**: 151-167
- Gerke V, Moss SE (1997) *Biochim Biophys Acta* **1357**: 129-154
- Litwa M, Bandorowicz-Pikuła J (1997) *Kosmos* **46**: 587-594
- Bandorowicz-Pikuła J (1997) *Kosmos* **46**: 625-633
- Rothhut B (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**: 522-526
- Chen JM, Sheldon A, Pincus MR (1993) *J Biomol Struct Dyn* **10**: 1067-1089
- Voges D, Berendes R, Demange P, Benz J, Göttig P, Liemann S, Huber R, Burger A (1995) *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **71**: 209-239
- Hofmann A, Benz J, Liemann S, Huber R (1997) *Biochim Biophys Acta* **1330**: 254-264
- Matsuda R, Kaneko N, Horikawa Y (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **237**: 499-503
- Mollenhauer J (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**: 506-507
- Cohen BE, Lee G, Arispén, Pollard HB (1995) *FEBS Lett* **377**: 444-450
- Caohuy H, Srivastava M, Pollard HB (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10797-10802
- Bandorowicz-Pikuła J, Awasthi YC (1997) *FEBS Lett* **409**: 300-306
- Bandorowicz-Pikuła J, Wrzosek A, Pikuła S, Awasthi YC (1997) *Eur J Biochem* **248**: 238-244
- Bandorowicz-Pikuła J, Wrzosek A, Makowski P, Pikuła S (1997) *Mol Membr Biol* **14**: 179-186
- Bandorowicz-Pikuła J (1998) *Molec Cell Biochem* **181**: 11-20
- Bandorowicz J, Pikuła S (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 281-293
- Swairjo MA, Seaton BA (1994) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**: 193-213
- Benz J, Hofmann A (1997) *Biol Chem* **378**: 177-183
- Liemann S, Huber R (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**: 516-521
- Weng X, Luecke H, Song IS, Kang DS, Kim S-H, Huber R (1993) *Protein Sci* **2**: 448-458
- Burger A, Berendes R, Liemann S, Benz J, Hofmann A, Göttig P, Huber R, Gerke V, Thiel C, Römisch J, Weber K (1996) *J Mol Biol* **257**: 839-847
- Newman R, Tucker A, Ferguson C, Tsernoglou D, Leonard K, Crumpton MJ (1989) *J Mol Biol* **206**: 213-219
- Huber R, Römisch J, Pâques E-P (1990) *EMBO J* **9**: 3867-3874
- Huber R, Schneider M, Mayr I, Römisch J, Pâques E-P (1990) *FEBS Lett* **275**: 15-21
- Lewit-Bentley A, Morera S, Huber R, Bodo G (1992) *Eur J Biochem* **210**: 73-77
- Kaneko N, Ago H, Matsuda R, Inagaki E, Miyano M (1997) *J Mol Biol* **274**: 16-20
- Hofmann A, Escherich A, Lewit-Bentley A, Benz J, Ragueneau-Nicol C, Russo-Marie F, Gerke V, Moroder L, Huber R (1998) *J Biol Chem* **273**: 2885-2894

44. Driessen HPC, Newman RH, Freemont PS, Crumpton MJ (1992) *FEBS Lett.* **306**: 75-79
45. Kawasaki H, Avila-Sakar A, Creutz CE, Kretsinger RH (1996) *Biochim Biophys Acta* **1313**: 277-282
46. Luecke H, Chang BT, Mailliard WS, Schlaepfer DD, Haigler HT (1995) *Nature (Lond)* **378**: 512-515
47. Sopkova J, Gallay J, Vincent M, Pancoska P, Lewit-Bentley A (1994) *Biochemistry* **33**: 4490-4499
48. Demange P, Voges D, Benz J, Liemann S, Göttig P, Berendes R, Burger A, Huber R (1995) W: Papa S, Tager JM (red) *Biochemistry of Cell Membranes. A Compendium of Selected Topics*. Birkhäuser Verlag, Basel, str. 311-325
49. Benz J, Bergner A, Hofmann A, Demange P, Göttig P, Liemann S, Huber R, Voges D (1996) *J Mol Biol* **260**: 638-643
50. Zaks WJ, Creutz CE (1991) *Biochemistry* **30**: 9607-9615
51. Voges D, Berendes R, Burger A, Demange P, Baumeister W, Huber R (1994) *J Mol Biol* **238**: 199-213
52. Tufty RM, Kretsinger RH (1975) *Science* **187**: 167-169
53. Dijkstra BW, Kalk KH, Hol WGJ, Drenth J (1981) *J Mol Biol* **147**: 97-123
54. Swairjo MA, Concha NO, Kaetzel MA, Dedman JR, Seaton DA (1995) *Nature Struct Biol* **2**: 968-974
55. Lambert O, Gerke V, Bader M-F, Port F, Brisson A (1997) *J Mol Biol* **272**: 42-55
56. Arboledas D, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J (1997) *FEBS Lett* **416**: 217-220
57. Swairjo MA, Roberts MF, Campos MB, Dedman JR, Seaton DA (1994) *Biochemistry* **33**: 10944-10950
58. Goossens ELJ, Reutelingsperger CPM, Jongsmma FHM, Kraayenhof R, Hermes WT (1995) *FEBS Lett* **359**: 155-158
59. Favier-Perron B, Lewit-Bentley A, Russo-Marie F (1996) *Biochemistry* **35**: 1740-1744
60. Melki V, Hullin F, Fauvel J, Ragab-Thomas JMF, Chap H (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 813-819
61. Mohiti J, Caswell AM, Walker JH (1995) *Mol Membr Biol* **12**: 321-329
62. Barwise JL, Walker JH (1996) *J Cell Sci* **109**: 247-255
63. Kaufman M, Leto T, Levy R (1996) *Biochem J* **316**: 35-42
64. Sagot I, Regnouf F, Henry JP, Pradel LA (1997) *FEBS Lett* **410**: 229-234
65. Raynal PR, Kuipers G, Rojas E, Pollard HB (1996) *FEBS Lett* **392**: 263-268
66. Nelson TJ, Cavallaro S, Yi C-L, McPhie D, Schreurs BG, Gusev PA, Favit A, Zohar O, Kim J, Beushausen S, Ascoli G, Olds J, Neve R, Alkon DL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13808-13813
67. Demange P, Voges D, Benz J, Liemann S, Göttig P, Berendes R, Burger A, Huber R (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 272-276
68. Berendez R, Voges D, Demange P, Huber R, Burger A (1993) *Science* **262**: 427-430
69. Kaneko N, Matsuda R, Toda M, Shimamoto K (1997) *Biochim Biophys Acta* **1330**: 1-7
70. Mosior M, Epand RN (1997) *Mol Membr Biol* **14**: 65-70
71. Molinari M, Carafoli E (1997) *J Membr Biol* **156**: 1-8
72. Liemann S, Benz J, Burger A, Voges D, Hofmann A, Huber R, Göttig P (1996) *J Mol Biol* **258**: 555-561
73. Burger A, Voges D, Demange P, Perez CR, Huber R, Berendes R (1994) *J Mol Biol* **237**: 479-499
74. Karshikov A, Berendes R, Burger A, Cavalié A, Lux H-D, Huber R (1992) *Eur Biophys J* **20**: 337-344
75. Tonsing K, Kakorin S, Neumann E, Liemann S, Huber R (1997) *Eur Biophys J* **26**: 307-318
76. Leckband DE, Israelachvili JN, Schmitt F-J, Knoll W (1992) *Science* **255**: 1419-1421
77. Arispe N, Rojas E, Genge BR, Wu LN, Wuthier RE (1996) *Biophys J* **71**: 1764-1775
78. Sutko JL, Aircy JA (1996) *Physiol Rev* **76**: 1027-1071
79. Leśniak W (1997) *Kosmos* **46**: 515-522
80. Szewczyk A, Pikuła S (1998) *Biochim Biophys Acta* **1365**: 333-353
81. Diaz-Muñoz M, Hamilton SL, Kaetzel MA, Hazarika P, Dedman JR (1990) *J Biol Chem* **265**: 15894-15899
82. Hazarika P, Kaetzel MA, Sheldon A, Karin NJ, Fleischer S, Nelson TE, Dedman JR (1991) *J Cell Biochem* **46**: 78-85
83. Hazarika P, Sheldon A, Kaetzel MA, Diaz-Muñoz M, Hamilton SL, Dedman JR (1991) *J Cell Biochem* **46**: 86-93
84. Frizzel RA (1995) *Am J Respir Crit Care Med* **151**: S54-S58
85. Chan HC, Kaetzel MA, Gotter AL, Dedman JR, Nelson DJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 32464-32468
86. Kaetzel MA, Dedman JR (1995) *News Physiol Sci* **10**: 171-176



## 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”.

# Proteoglikany agregujące z kwasem hialuronowym

## Hyaluronan aggregating proteoglycans

RAFAŁ BOBIŃSKI<sup>1</sup>,  
KRYSTYNA OLCZYK<sup>2</sup>,  
EWA KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa białka rdzeniowego
- III. Struktura genów PAKH
- IV. Funkcje PAKH
- V. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Core protein structure
- III. PAKH gene structure
- IV. PAKH functions
- V. Summary

**Wykaz stosowanych skrótów:** PG — proteoglikany; PAKH — proteoglikany agregujące z kwasem hialuronowym; pz — pary zasad; kpz — tysiąc par zasad; N-CAM (ang. *neural cell adhesion molecule* — kadheryny z tkanki nerwowej; Ng-CAM (ang. *neuroglial cell adhesion molecule*) — kadheryny z tkanki neuroglejowej.

### I. Wstęp

Proteoglikany (PG) są heterogenną grupą glikoprotein, zbudowanych z białka rdzeniowego, do którego przyłączony jest łańcuch lub łańcuchy glikoaminoglikanowe. Glikoaminoglikany natomiast, są liniowymi, nierozgałęzionymi heteropolisacharydami, zbudowanymi z powtarzających się disacharydowych jednostek, złożonych z N-acetylowanej heksozoaminy, związanej wiązaniem glikozydowym z kwasem heksuronowym bądź galaktozą [1-3]. Dodatkowo, oprócz glikoaminoglikanów, do białka rdzeniowego proteoglikanów mogą być przyłączone łańcuchy oligosacharydowe. Zarówno składnik białkowy jak i cukrowy odgrywają ważną rolę w oddziaływaniach PG z otaczającym je środowiskiem. Jest to związane z silnie anionowym charakterem glikoaminoglikanów [4], oraz bardzo zróżnicowaną budową białek rdzeniowych. Struktury PG omówiono szczegółowo w ostatnio opublikowanych artykułach przeglądowych [3-5]. Dzięki swoim właściwościom, proteoglikany wpływają na organizację macierzy pozakomórkowej. Biorą udział we wzajemnym oddziaływaniu komórek [5-7], a także oddziałują z czynnikami wzrostowymi, regulując tym samym szereg procesów biochemicznych [8-

-11]. Proteoglikany występują zarówno w obrębie komórek, jak i w przestrzeni pozakomórkowej [12-18]. Wewnątrzkomórkowo znajduje się je zarówno w ziarnistościach wydzielniczych jak i w błonach komórkowych (tzw. proteoglikany transmembranowe). Pozakomórkowo, proteoglikany stanowią istotny składnik substancji podstawowej macierzy zewnątrzkomórkowej i błon podstawnych [12]. PG produkowane są prawdopodobnie przez wszystkie rodzaje komórek zwierzęcych [19-23].

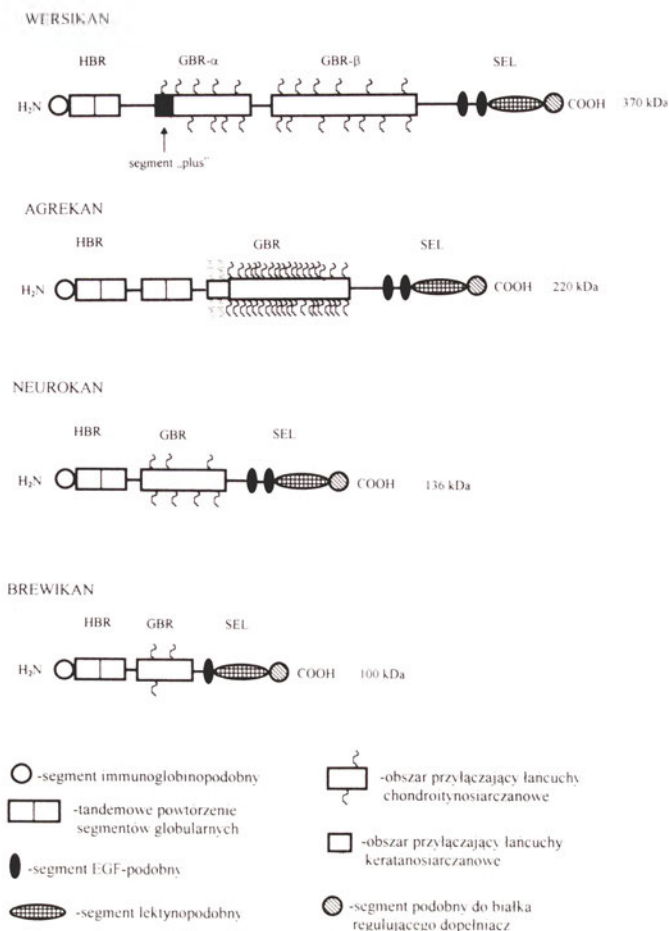
Grupa proteoglikanów agregujących z kwasem hialuronowym (PAKH), wykazuje znaczne zróżnicowanie. Zróżnicowanie to spowodowane jest różnym rozmieszczeniem tych molekuł w organizmie, różną wielkością białka rdzeniowego, oraz ilością i rodzajami przyłączonych do białka rdzeniowego łańcuchów glikoaminoglikanowych oraz oligosacharydowych. Istnieje jednak szereg cech wspólnych dla PAKH. Do cech tych zalicza się:

1. agregację białka rdzeniowego z kwasem hialuronowym za pośrednictwem końca aminowego wspomnianego białka.
2. konserwatywną budowę domeny C- i N-końcowej białka rdzeniowego.
3. przyłączanie łańcuchów chondroitynosiarczanowych do domeny centralnej białka rdzeniowego.

### II. Budowa białka rdzeniowego

Wspólną cechą PAKH jest trójdomenowa budowa białka rdzeniowego [4] (Ryc. 1). Pierwsza z wymienionych domen, zwana HBR (ang. *hyaluronan binding region*), znajduje się na końcu aminowym białka rdzeniowego, i to dzięki niej możliwe jest łączenie się proteoglikanów z kwasem hialuronowym [4, 24]. Środkową część omawianego białka zajmuje domena

<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> prof. nadz., Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec; <sup>3</sup> mgr, Samodzielna Pracownia Mikrobiologii, Szpital Górniczy, 41-200 Sosnowiec

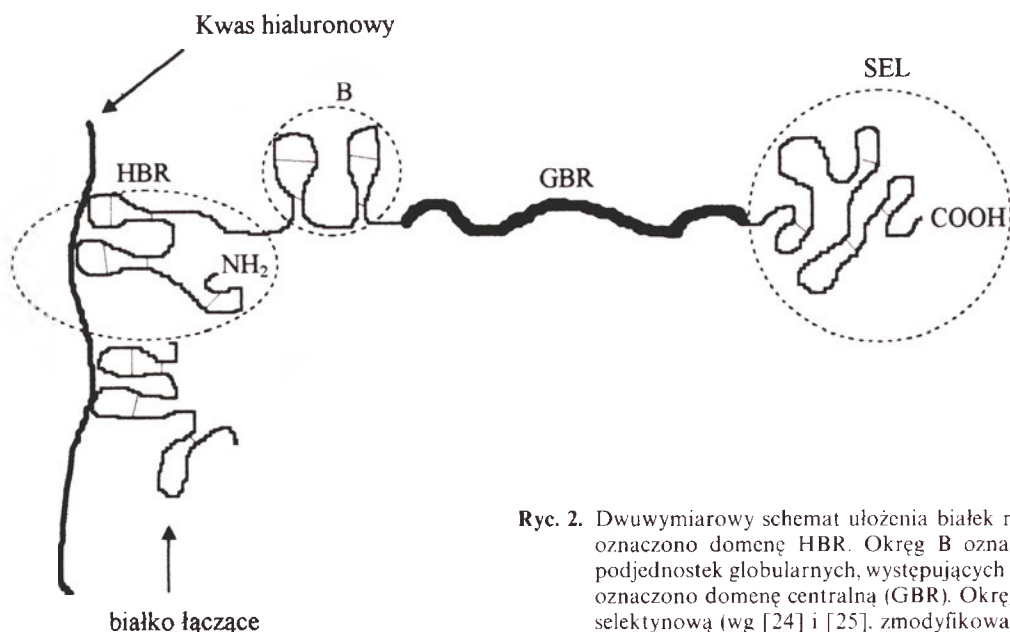


**Ryc. 1.** Schemat budowy proteoglikanów agregujących z kwasem hialuronowym. Symbol HBR oznacza N-kończącą domenę białka rdzeniowego, agregującą z kwasem hialuronowym. GBR oznacza domenę centralną, do której przyłączone są łańcuchy glikoaminoglikanowe, natomiast SEL oznacza domenę selektynową. W wersikanie, czarnym kwadratem zaznaczono występujący u kur segment „plus” (wg [4] i [24], zmodyfikowany).

GBR (ang. *glycosaminoglycans binding region*), do której przyłączają się łańcuchy glikoaminoglikanowe oraz łańcuchy oligosacharydowe. Trzecia i ostatnia domena — zwana selektynową — znajduje się na

końcu karboksylowym białka rdzeniowego [4]. Wszystkie domeny, za wyjątkiem środkowej agrekanu, neurokanu i brewikanu, zbudowane są z mniejszych, strukturalnie i funkcjonalnie różnych segmentów [4]. I tak, HBR — pierwsza domena PAKH, złożona jest z trzech segmentów. Licząc od końca aminowego, kolejno ułożone są: segment o budowie podobnej do nadrodziny immunoglobulin, oraz dwa po nim następujące segmenty globularne, które łączą proteoglikany z kwasem hialuronowym [4]. Na wysokości N-końcowej domeny HBR, występuje dodatkowe białko, tzw. białko łączące (ang. *link protein*), którego rolą jest stabilizacja wiązania proteoglikanów z kwasem hialuronowym [24, 25] (Ryc. 2). Wszystkie segmenty domeny HBR tworzą charakterystyczne pętle [24] (Ryc. 2). Domena centralna proteoglikanów agregujących z kwasem hialuronowym utworzona jest z jednego segmentu, z wyjątkiem wersikanu, którego domena GBR dzieli się na dwa segmenty: GBR- $\alpha$  i GBR- $\beta$ . Taka budowa domeny GBR wersikanu występuje jednak tylko w pełnej izoformie wspomnianego białka, o której będzie mowa w dalszej części pracy. C-końcowa domena, w zależności od rodzaju proteoglikanu, składa się z trzech lub czterech segmentów. Licząc od końca aminowego wspomnianej domeny, jako pierwszy występuje segment o budowie podobnej o naskórkowego czynnika wzrostowego (EGF). W białku rdzeniowym wersikanu, agrekanu i neurokanu segment ten występuje podwójnie. W dalszej kolejności usytuowany jest segment lektynopodobny, natomiast na końcu karboksylowym domeny selektynowej oraz całej nici białkowej leży — jako ostatni — segment o budowie podobnej do białka regulującego dopełniacz [4, 24] (Ryc. 1).

Z czterech proteoglikanów grupy PAKH, wersikan posiada największe białko rdzeniowe. Masa tej struktury waha się w granicach 74—370 kDa i zależna jest od izoformy, w jakiej omawiane białko występuje. Dotychczas odkryto cztery izoformy białka rdzenio-



**Ryc. 2.** Dwuwymiarowy schemat ułożenia białek rdzeniowych PAKH. Okręgiem HBR oznaczono domenę HBR. Okrąg B oznacza drugie tandemowe powtórzenie podjednostek globularnych, występujących tylko w agrekanie. Grubą czarną linią oznaczono domenę centralną (GBR). Okrąg SEL obejmuje C-kończącą domenę selektynową (wg [24] i [25], zmodyfikowany).



wego wersikanu: V0, V1, V2, V3 [26]. Różnice pomiędzy nimi wynikają z obecności lub nieobecności segmentów GBR- $\alpha$  i GBR- $\beta$  w domenie GBR białka rdzeniowego [4, 26-29]. Pełne białko rdzeniowe, bez jakichkolwiek delecji, określone jest jako izoforma V0 (370 kDa). Brak segmentu GBR- $\alpha$  w domenie GBR, obniża masę białka rdzeniowego do 263 kDa i wtedy izoforma ta określona jest symbolem V1. Z kolei, symbol V2 oznacza, iż białko rdzeniowe pozbawione jest segmentu GBR- $\beta$  w domenie środkowej i wówczas jego masa zmniejsza się do 180 kDa. Izofoma V3, której masa wynosi 70 kDa, pozbawiona jest całkowicie domeny centralnej, wobec czego wersikan istniejący w izoformie V3 jest samym białkiem rdzeniowym, ewentualnie glikoproteiną, lecz nie proteoglikanem ponieważ nie posiada wówczas sekwencji mogących przyłączyć łańcuchy glikozoaminoglikanowe. Z a k o i w s p. [27] odkryli u kur dodatkowy segment domeny centralnej wersikanu, który nazwali segmentem „plus” (Ryc. 1). Struktura ta, usytuowana jest na N-końcu domeny GBR. Badania wykazały, iż segment „plus” istnieje u kur w okresie embrionalnym, we wszystkich izoformach białka rdzeniowego wersikanu. U dojrzałych osobników segment „plus” występuje tylko w izoformach V0 i V2 [27]. Omawiany segment wykazuje duże podobieństwo strukturalne do obszaru wiążącego łańcuchy keratanowe w domenie GBR agrekanu [27]. Białko rdzeniowe wersikanu przyłącza w obrębie domeny GBR około 30 łańcuchów glikozoaminoglikanowych (siarczanu chondroityny i/lub siarczanu dermatanu). Oprócz wymienionych rodzajów glikozoaminoglikanów, do białka rdzeniowego mogą być przyłączone wiązaniem O- lub N-glikozydowym łańcuchy oligosacharydowe, zarówno w obrębie domeny GBR jak i poza nią [4, 26, 27]. Kolejną charakterystyczną cechą białka rdzeniowego wersikanu jest nieobecność reszt cysteinowych oraz duża zawartość reszt aminokwasowych o charakterze kwasowym w obrębie domeny centralnej [4].

Drugim po wersikanie PAKH, z uwagi na masę cząsteczkową białka rdzeniowego wynoszącą 220 kDa

jest agrekan (Ryc. 1). Jednak ze względu na dużą zawartość składnika cukrowego, PG ten posiada największą masę [4, 24, 30, 31]. Ponad 100 łańcuchów glikozoaminoglikanowych przyłączonych jest do domeny GBR agrekanu, z czego przytłaczającą większość stanowią łańcuchy chondroitynosiarczanowe, reszta zaś — łańcuchy keratanosiarczanowe (Tab. 1). Te ostatnie występują przy końcu aminowym domeny centralnej. Dodatkowo, w obrębie domeny GBR i poza nią, mogą być przyłączone łańcuchy oligosacharydowe. Najbardziej zauważalną różnicą w budowie agrekanu w stosunku do innych PAKH, jest obecność drugiego dubletu segmentu globularnego domeny HBR (Ryc. 1). Nie jest znana funkcja wspomnianej struktury, lecz wiadomo, iż nie łączy się ona z kwasem hialuronowym [4, 24]. Domena centralna białka rdzeniowego agrekanu jest w znacznym stopniu zbliżona wielkością do segmentu GBR- $\beta$  wersikanu, z tą tylko różnicą, że w pierwszym z wymienionych PG występuje więcej sekwencji Ser-Gly, do których przyłączane są łańcuchy glikozoaminoglikanowe. Kolejną charakterystyczną cechą białka rdzeniowego agrekanu jest możliwość niewystępowania jednego z dwóch segmentów EGF-podobnych w C-końcowej domenie selektywnej, co jest związane ze zjawiskiem alternatywnego składania mRNA (ang. *alternative splicing*). Zjawisko to nie dotyczy pozostałych proteoglikanów omawianej grupy [32, 33].

Kolejnym proteoglikanem z grupy PAKH jest występujący w układzie nerwowym neurokan (Ryc. 1). Masa cząsteczkowa białka rdzeniowego tego PG wynosi 136 kDa (Tab. 1). Neurokan posiada dużo mniejszą domenę centralną białka rdzeniowego w porównaniu z wcześniej opisanymi proteoglikanami. Domena ta może przyłączyć do siedmiu łańcuchów chondroitynosiarczanowych [25, 34]. W miarę dojrzenia organizmu, białko rdzeniowe neurokanu ulega przebudowie. Enzymy proteolityczne stopniowo skracają domenę N-końcową (obejmującą segment immunoglobulinopodobny oraz tandemowe powtórzenie segmentów globularnych) tak, iż u dojrzewają-

### Tabela 1.

Charakterystyka proteoglikanów agregujących z kwasem hialuronowym. CS — siarczan chondroityny, DS — siarczan dermatanu, KS — siarczan keratanu

PG	Białko rdzeniowe (kDa)	Rodzaj łańcucha GAG	Liczba łańcuchów GAG	Lokalizacja genu	Występowanie
Wersikan	74-370	CS DS	10-30	5q12-5q14	naczynia krwionośne, tkanka nerwowa, chrząstka
Agrekan	220	CS KS	~ 100	15q26	chrząstka, tkanka nerwowa, naczynia krwionośne
Neurokan	136	CS	3-7	—	tkanka nerwowa
Brewikan	100	CS	1-3	—	tkanka nerwowa

cych osobników domena ta już nie występuje. Nie wyjaśniono dotąd przyczyn tego zjawiska [35].

Najmniejszym oraz najpóźniej i najslabiej poznany PAKH jest brewikan (Ryc. 1). Dwie charakterystyczne cechy budowy wyróżniają białko rdzeniowe brewikanu (m.cz. 100 kDa) spośród innych PG omawianej grupy. Molekuła ta posiada bardzo krótką domenę centralną oraz tylko jeden segment EGF-podobny w domenie selektynowej. W obrębie domeny GBR przyłącza się 1-3 łańcuchów glikozoaminoglikanowych (chondroitynosiarczanowych). Domena GBR charakteryzuje się dużą zawartością reszt aminokwasowych o charakterze kwasowym, szczególnie kwasu glutaminowego, który może służyć jako miejsce przyłączenia substancji o charakterze kationowym [4, 36].

### III. Struktura genów PAKH

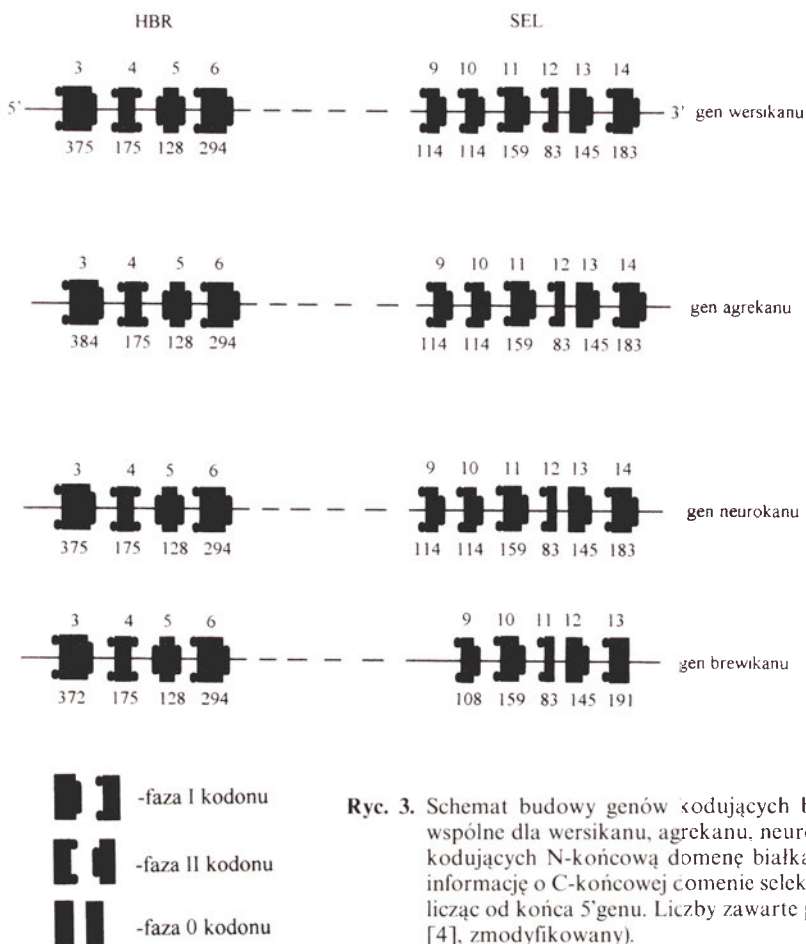
Geny kodujące białka rdzeniowe omawianej grupy proteoglikanów charakteryzują dużo większe wzajemne różnice w porównaniu z rozbieżnościami, jakie występują w budowie genów małych proteoglikanów śródmiażdżowych [37]. W grupie PAKH istnieją rozbieżności, zarówno co do wielkości genów, jak i ilości i rozmieszczenia sekwencji kodujących i niekodujących. Największym genem kodującym białko rdzeniowe PAKH jest gen kodujący białko wersikanu. Gen ten znajduje się w długim ramieniu chromosomu 5, locus 5q12-5q14 [38]. W jego skład wchodzi ponad 90 kpz, z czego blisko 12 kpz zajmują sekwencje kodujące, które rozmieszczone są na 15 eksonach. Pozostałe 78 kpz stanowi 14 intronów [38]. Promotor genu zawiera sekwencje TATA w pozycji — 16 pz, licząc od miejsca początku transkrypcji, oraz szereg cis-aktywnych sekwencji, leżących w kierunku 5' w stosunku do sekwencji TATA [39]. Ekson 1 i część eksonu 15-go nie kodują informacji o białku rdzeniowym, natomiast w pozostałych eksonach zapisana jest skomplikowana, modułowa struktura komponentu białkowego wersikanu [38, 39]. Opisany wcześniej segment „plus”, występujący w wersikanie, kodowany jest przez ten sam ekson, na którym zapisana jest informacja o segmencie GBR- $\alpha$  (ekson 7). Choć sugerowałoby to, iż segment „plus” będzie występował tylko w izoformach V0 i V2, to stwierdzono, że omawiana struktura występuje we wszystkich izoformach wersikanu [27]. Ekson, na którym zapisana jest sekwencja segmentu „plus” oraz segmentu GBR- $\alpha$  białka rdzeniowego, zachowuje się częściowo jak „pseudo intron”. W trakcie modyfikacji potranskrypcyjnych, wycinana zostaje z eksonu siódmego ta jego część, na której zapisana jest informacja o segmencie GBR- $\alpha$ . Powstają wówczas dodatkowo izoformy V1 i V3 białka rdzeniowego, zawierające segment „plus” [27].

Gen kodujący białko agrekanu, jest mniejszy od genu kodującego białko rdzeniowe wersikanu. Struktura ta znajduje się na długim ramieniu chromosomu

15 locus q26 [4]. Wielkość genu w przybliżeniu wynosi 52.8 kpz, z czego 7.8 kpz zajmuje 19 eksonów, pozostałe 45 kpz dzieli między siebie 18 intronów [40]. Z przytoczonych danych wynika, że zarówno cały gen agrekanu jak i suma wielkości poszczególnych eksonów, są blisko o połowę mniejsze niż analogiczne sekwencje w genie wersikanu. Większa natomiast liczba sekwencji kodujących w genie agrekanu, koreluje z bardziej skomplikowaną budową białka rdzeniowego tego PG. Dwa skrajne eksony końca 5' i 3' — podobnie jak w wersikanie — nie noszą informacji o białku rdzeniowym [38-40]. W regionie promotora genu agrekanu brak jest sekwencji TATA, za to obszar ten bogaty jest w sekwencje GC, które stanowią aż 65% regionu promotora [41]. Oprócz tego, promotor genu posiada tylko trzy miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne: dwa dla glikokortykosteroidów i jeden dla Spl [41]. Różnice w budowie genu dla białka rdzeniowego agrekanu pomiędzy genem ludzkim a kurzym, szczurzym, mysim i wołowym, są stosunkowo niewielkie. Podobieństwo tych struktur waha się w granicach 70-90% [30, 40-47]. Wiedza na temat budowy genów kodujących białka rdzeniowe dla pozostałych dwóch proteoglikanów — neurokanu i brewikanu — jest uboższa. Gen dla pierwszego z wymienionych PG został dobrze poznany jedynie u myszy [34]. Zbudowany jest on z 25 kpz i zawiera 15 eksonów czyli tyle ile gen kodujący białko rdzeniowe wersikanu. Podobieństwo obu wymienionych genów dotyczy także wielkości sekwencji kodujących, wśród których aż osiem eksonów ma identyczną ilość par zasad [34, 48]. Pomimo tych podobieństw, różnica w wielkości pomiędzy obydwoma genami jest znacząca. Spowodowane jest to znaczną różnicą wielkości intronów genów wersikanu i neurokanu. Region promotora genu kodującego białko rdzeniowe neurokanu zbudowany jest z około 1000 pz, i zawiera ramkę TATA w pozycji -26 pz, oraz szereg miejsc cis-aktywnych, do których przyłączane są czynniki transkrypcyjne [34].

Gen białka rdzeniowego brewikanu myszy zbudowany jest z 13.7 kpz, w skład których wchodzi 14 eksonów. Otwarta ramka odczytu mRNA, posiada 2649 pz, kodując 883 reszty aminokwasowe [49]. W regionie promotora genu brewikanu brak jest sekwencji TATA, lecz z kolei obszar ów bogaty jest w sekwencje GC [49]. Y a m a d a i w s p. [50] zsekwencjonowali cDNA brewikanu wołu, który to cDNA składa się 3300 pz, z czego 2736 pz stanowi otwarta ramka odczytu, kodująca 912 aminokwasów. Komplementarny DNA, podobnej wielkości, znaleziono także w mózgu szczura [50].

Geny kodujące białka rdzeniowe PAKH przeszły proces ewolucji. Ich eksony zostały bądź to przetasowane, bądź duplikowane lub też amplifikowane. Dzięki temu powstały nowe, hybrydowe białka, czasem z odmiennymi właściwościami [4]. Różnice w lokalizacji chromosomalnej wskazują na wczesne „rozbiegnięcie” się genów po chromosomach [4]. Analiza



**Ryc. 3.** Schemat budowy genów kodujących białko rdzeniowe PAKH. Zaznaczono obszary podobne, wspólne dla wersikanu, agrekanu, neurokanu i brewikanu. Symbol HBR oznacza grupę eksonów kodujących N-kończącą domenę białka rdzeniowego. Symbol SEL oznacza eksony, które niosą informację o C-końcowej domenie selektywnej. Numery ponad eksonami określają ich kolejność, licząc od końca 5' genu. Liczby zawarte pod eksonami określają ilość par zasad danego eksonu (wg [4], zmodyfikowany).

rozmieszczenia i wielkości sekwencji kodujących i niekodujących w genach wersikanu, agrekanu, neurokanu i brewikanu, ukazuje ściśle podobieństwo końców 5' i 3', co oczywiście wiąże się także z bardzo podobną budową C- i N-końcowych obszarów białek rdzeniowych wymienionych PG. Z sześciu eksonów kodujących N-kończący region HBR, eksony 3-6 mają jednakową ilość par zasad oraz są w tych samych fazach kodonu (Ryc. 3). Wyjątkiem są geny agrekanu i brewikanu. Trzeci ekson wymienionych struktur posiada — w przypadku agrekanu — o dziewięć nukleotydów więcej niż pozostałe, natomiast w przypadku brewikanu o dwa nukleotydy mniej w stosunku do wersikanu i neurokanu. Jednak struktura ta zachowuje wspólną wszystkim czterem eksonom fazę kodonu. Środkowe eksony 4 i 5 wymienionego obszaru genu, kodują dwa powtórzenia (ok. 100 aminokwasów), które łączą PG z kwasem hialuronowym. Druga faza kodonu, występująca między eksonami 4 i 5, uniemożliwia alternatywne składanie (ang. *alternative splicing*) lub duplikację wymienionych eksonów niezależnie od siebie [4, 40]. Kolejną, wspólną cechą omawianej grupy genów jest obecność I fazy kodonu pomiędzy skrajnymi eksonami spośród trzech zespołów eksonów, kodujących poszczególne domeny białka rdzeniowego (HBR, GBR, selektynowa) (Ryc. 3). Dzięki temu skrajne eksony mogą ulegać zjawisku alternatywnego składania [4]. Sytuacja taka może zaistnieć w genie kodującym białko rdzeniowe wer-

sikanu, w którym to segment GBR- $\alpha$  domeny GBR często jest alternatywnie składany z segmentem GBR- $\beta$  [21, 29]. W brewikanie, występująca pomiędzy 13 i 14 eksonem 0 faza kodonu, uniemożliwia zaistnienie wspomnianego zjawiska. Obszar obejmujący koniec 3' nici DNA, kodujący białko rdzeniowe omawianych PG, także cechuje duże podobieństwo. Sześć eksonów wchodzących w skład tej części omawianej grupy genów, jest identycznych pod względem ilości par zasad oraz faz kodonów (Ryc. 3). Wyjątkiem tutaj jest znowu gen brewikanu. Pomimo zachowania tych samych faz kodonu (wyłączając ekson 13), struktura ta różni się ilością sekwencji kodujących oraz ilością par zasad dwóch skrajnych eksonów omawianego obszaru genu [49]. Brak jednego eksonu w obszarze końca 3' genu, powoduje brak jednego z dwóch segmentów EGF-podobnego w białku rdzeniowym brewikanu (Ryc. 1 i 3). Stąd — w genie kodującym białko rdzeniowe brewikanu — brak jest pokrycia numeru eksonu z ilością par zasad omawianego obszaru genu w stosunku do innych genów PAKH (Ryc. 3). Dla pozostałych PAKH, dwa pierwsze eksony, licząc od końca 5' wspomnianego obszaru, kodują dwa segmenty EGF-podobne. W agrekaniu, eksony kodujące wymienione moduły mogą ulegać procesowi alternatywnego składania [33]. Możliwości takiej nie ma w wersikanie i neurokaniu [29, 35]. Kolejne trzy eksony końca 3' kodują segmenty lektynopodobne. Segment ten występuje także w selektynach i jest

kodowany przez pojedynczy ekson, który wielkością jest równy sumie wielkości trzech wspomnianych eksonów. W ostatnim, szóstym eksonie końca 3' genów kodujących białko rdzeniowe PAKH, zapisana jest struktura segmentu podobnego do białka regulującego dopełniacz. Wspomniany ekson zbudowany jest z 186 pz i wykazuje duże podobieństwo do piątego eksonu, występującego w P- i E-selektynach [4].

#### IV. Funkcje PAKH

Każdy z grupy proteoglikanów agregujących z kwasem hialuronowym posiada swoje charakterystyczne miejsce występowania w organizmie. Często jednak się zdarza, że dany PAKH występuje dodatkowo — choć w mniejszych ilościach — w miejscu typowym dla innego PG. Związane jest to z tkankowo specyficzną regulacją ekspresji genów [4]. Dziś wiadomo, że PAKH spełniają rolę „pomostu” pomiędzy obszarem przypowierzchniowym komórki (bogatym w kwas hialuronowy) a molekułami macierzy pozakomórkowej [4]. Najmniej zrozumiała jest funkcja domeny centralnej PAKH, bowiem region ów jest bardzo heterogenny, przyłączający przy tym różną liczbę łańcuchów glikozoaminoglikanowych. W skrajnych przypadkach liczba wspomnianych łańcuchów glikanowych waha się w granicach od 3 (brewikan) do 100 i więcej (agrekan). Znaczna ilość ujemnie naładowanych łańcuchów glikozoaminoglikanowych agrekanu przyciąga dużo jonów dodatnich, a wraz z nimi wodę [24]. W związku z tym, tkanka w której ten PG występuje, jest silnie nawodniona i posiada dużą elastyczność oraz oporność na działanie sił kompresyjnych [51-53]. Gdy na chrząstkę (gdzie agrekan występuje w największych ilościach) zadziała siła ścisniająca, woda podlega wypieraniu spomiędzy cząsteczek agrekanu po czym, równomiernemu rozmieszczeniu w obrębie całej chrząstki, przeciwdziałając wspomnianym siłom ścisniającym [32, 53-60]. Podobną rolę pełni w chrząstce oraz w ścianach naczyń krwionośnych wersikan, gdzie w drugim przypadku równoważy on ciśnienie, wywołane skurczem mięśnia sercowego [4]. Tkanką bogatą w wersikan jest skóra. Występuje on głównie w naskórku, wzdłuż stref proliferacji keratynocytów. Z kolei w skórze właściwej, rolą wersikanu jest wiązanie się z włóknami elastynowymi [61]. W przerosłych bliznach, które charakteryzują się zaburzonym układem przestrzennym włókien kolagenowych (włókna kolagenowe przebiegają wielokierunkowo) stwierdzono zwiększoną zawartość wersikanu [62]. Scott i wsp. [62] sugerują, że zwiększona zawartość wspomnianego PG w bliznach skórnych może wpływać na przestrzenną aranżację włókien kolagenowych. Jednakże w ostatnich latach tematem większości publikacji dotyczących wersikanu, jest jego rola w układzie nerwowym i mózgu [38, 63-68]. Izoforny V0 i V1 znaleziono w obrębie oligodendrocytów, komórek Schwanna oraz fibroblastów opo-

nowych [26]. Nie jest jednak znana rola wersikanu w oddziaływaniach z wymienionymi komórkami. Wiadomo natomiast, że obecność wspomnianego PG wpływa na proces mielinizacji aksonów rdzenia kręgowego u szczura [26, 69]. Wersikan, oddziałując wspólnie z tenascyną, hamuje proces adhezji komórek w układzie nerwowym, co ma wpływ na różnicowanie się komórek [70]. Wszystkie izoforny wersikanu występują także w obwodowym układzie nerwowym, w przewężeniach Ranviera, lecz ich rola nie została poznana [71]. Rozwój systemu nerwowego związany jest z migracją neuronów oraz wzrostem aksonów, co bezpośrednio jest zależne od oddziaływań komórka — komórka oraz komórka — macierz pozakomórkowa. Za regulację tych procesów w układzie nerwowym odpowiedzialny jest między innymi neurokan [25, 72-74] jak również tenascyna i kadheryny: wapniowo zależna N-CAM oraz wapniowo niezależna Ng-CAM. Neurokan, łącząc się z kadherynami N-CAM i Ng-CAM, hamuje zarówno wzrost aksonów [72] jak i proces adhezji neuronów [25, 74]. Brak jest jednakże w literaturze szczegółowych informacji dotyczących biologicznej roli brewikanu. Niemniej jednak wiadomo, że PG ten odkryto dotychczas tylko w tkance nerwowej i przypisuje mu się podobne znaczenie co neurokanowi [50, 75]. Pomimo różnic w budowie i rozmieszczeniu tkankowym, główną funkcją biologiczną wszystkich PAKH jest udział w organizacji macierzy pozakomórkowej [4, 24, 26, 48].

#### V. Podsumowanie

PAKH są dużymi cząsteczkami macierzy pozakomórkowej, złożonymi z składnika białkowego i cukrowego. Obydwie składowe odpowiadają za oddziaływanie proteoglikanów z otaczającymi je cząsteczkami. PAKH różnią się wielkością białka rdzeniowego oraz ilością i rodzajami przyłączonych łańcuchów glikozoaminoglikanowych i oligosacharydowych. Jednak o przynależności omawianych PG do jednej grupy stanowi podobieństwo strukturalne N- i C-końcowych domen białka rdzeniowego a także możliwość tworzenia agregatów z kwasem hialuronowym. Mnogość funkcji jakie pełnią PG (w większości zapewne jeszcze nie poznanych) oraz skomplikowana, zmienna budowa, czynią je ciekawym przedmiotem badań wielu renomowanych placówek naukowych na świecie.

*Artykuł otrzymano 22 stycznia 1998 r.  
Zaakceptowano do druku 27 kwietnia 1998 r.*

#### Piśmiennictwo

1. Scott JE (1988) *Biochem J* **252**: 313-325
2. Głowacki A, Koźma EM, Olczyk K, Kucharz EJ (1995) *Post Biochem* **41**: 139-148
3. Koźma EM, Głowacki A, Olczyk K, Jaźwiec M (1997) *Post Biochem* **43**: 158-172
4. Iozzo RV, Murdoch AD (1996) *FASEB J* **10**: 598-614

5. Hardingham TE, Fosang AJ (1992) *FASEB J* **6**: 861-870
6. Umbreit JN (1996) *Anticancer Res* **16**: 3013-3030
7. Esko JD (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 805-816
8. Netfield JJ, Huber-Bruning O, Bylsma JWJ (1994) W: Jolles P (red) *Proteoglycans* Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, str 215-242
9. Mulhauser J, Marzioni D, Morroni M, Vukovic M, Crescimanno C, Castellucci M (1996) *Cell Tiss Res* **285**: 101-107
10. Kimura F, Suzu S, Nakamura Y, Wakimoto N, Kanatani Y, Yanai Y, Nagata N, Motoyoshi K (1994) *J Biol Chem* **269**: 19751-19756
11. Gressner AM (1996) *Hepato-Gastroenterol* **43**: 92-103
12. Kjellen L, Lindahl U (1991) *Annu Rev Biochem* **60**: 443-475
13. Fansson LA (1987) *TIBS* **12**: 406-411
14. Kato M, Saunders S, Nguyen H, Bernfield M (1995) *Molec Biol Cell* **6**: 559-576
15. Liebersbach BF, Sanderson RD (1994) *J Biol Chem* **269**: 20013-20019
16. Spring J, Goldberg OA, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Bernfield M (1994) *Genomics* **21**: 597-601
17. Baciu PC, Goetinck PF (1995) *Molec Biol Cell* **6**: 1503-1513
18. Numa F, Hirabayashi K, Tsunaga N, Kato H, O'Rourke K, Shao H, Stechmann-Lebakken C, Varani J, Rapraeger A, Dixit VM (1995) *Cancer Res* **55**: 4676-4680
19. Li H, Schwartz NB (1995) *J Mol Evol* **41**: 878-885
20. Chandrasekaran L, Tanzer ML (1992) *Biochem J* **288**: 903-910
21. Grover J, Roughley PJ (1993) *Biochem J* **291**: 361-367
22. Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD (1994) *Biochem J* **302**: 625-639
23. Dodge GR, Boesler EW, Jimenez SA (1995) *Lab Invest* **73**: 649-657
24. Vertel BM (1995) *Trends Cell Biol* **5**: 458-464
25. Retzler C, Göhring W, Rauch U (1996) *J Biol Chem* **271**: 27304-27310
26. LeBaron RG (1996) *Perspect Develop Neurobiol* **3**: 261-271
27. Zako M, Schinomura T, Kimata K (1997) *J Biol Chem* **272**: 9325-9331
28. Paulus W, Baur I, Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR (1996) *J Neuropathol Exp Neurol* **55**: 528-533
29. Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR (1994) *J Biol Chem* **269**: 32992-32998
30. Li H, Schwartz NB (1995) **41**: 878-885
31. Lohmander LS, Neame PJ, Sandy JD (1993) *Arthr Rheum* **36**: 1214-1222
32. Roughley PJ, Lee ER (1994) *Micro Res Technique* **28**: 385-397
33. Fülöp C, Walcz E, Valuon M, Glant TT (1993) *J Biol Chem* **268**: 17377-17383
34. Rauch U, Grimpe B, Kulbe G, Arnold-Ammer I, Beier DR, Fässler R (1995) *Genomics* **28**: 405-410
35. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK (1992) *J Biol Chem* **267**: 19536-19547
36. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y (1994) *J Biol Chem* **269**: 10119-10126
37. Bobiński R, Olczyk K, Krzyżowska-Bobińska E. (1998) *Post Biochem* **44**: 64-71
38. Iozzo RV, Naso MF, Cannizzaro LA, Wasmuth JJ, McPherson JD (1992) *Genomics* **14**: 845-851
39. Naso MF, Zimmermann DR, Iozzo RV (1994) *J Biol Chem* **269**: 32999-33008
40. Valhmu WB, Palmer GD, Rivers PA, Ebara S, Cheng JF, Fischer S, Ratcliffe A (1995) *Biochem J* **309**: 535-542
41. Watanabe H, Gao L, Sugiyama S, Doege K, Kimata K, Yamada Y (1995) *Biochem J* **308**: 433-440
42. Walcz E, Deák F, Erhardt P, Coulter SN, Fülöp C, Doege K J, Glant TT (1994) *Genomics* **22**: 364-371
43. Chandrasekaran L, Tanzer ML (1992) *Biochem J* **288**: 903-910
44. Doege K, Sasaki M, Yamada Y (1989) *Biochem Soc Transact* **261**: 200-202
45. Li H, Domowicz M, Hennig A, Schwartz NB (1996) *Mol Brain Res* **36**: 309-321
46. Mok SS, Masuda K, Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJMA (1994) *J Biol Chem* **52**: 33021-33027
47. Doege KJ, Garrison K, Coulter SN, Yamada Y (1994) *J Biol Chem* **269**: 29232-29240
48. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK (1992) *J Biol Chem* **267**: 19536-19547
49. Rauch U, Meyer H, Brakebusch C, Seidenbecher C, Gundelfinger ED, Beier DR, Fässler R (1997) *Genomics* **44**: 15-21
50. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y (1994) *J Biol Chem* **269**: 10119-10126
51. Hardingham TE, Fosang AJ (1992) *FASEB J* **6**: 861-870
52. Morgelin M, Heinegard D, Engel J, Paulsson M (1994) *Biophys Chem* **50**: 113-128
53. Barry FP, Rosenberg LC, Gaw JU, Koob TJ, Neame PJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 20516-20524
54. Malemud CJ, Goldberg VM (1995) *J Rheumatol* **22**: 91-93
55. Deutsch AJ, Midura RJ, Plaas AHK (1995) *Orthop Res Soc* **13**: 230-239
56. Lundberg C, Asberg I, Ionescu M, Reiner A, Smedegard G, Poole AR (1996) *Ann Rheum Dis* **55**: 525-534
57. Lowe GN, Fu YH, McDougall S, Polendo R, Williams A, Benya PD, Hahn TJ (1996) *Endocrinol* **137**: 2208-2217
58. Calabro A, Hascall VC, Caterson B (1992) *Arch Biochem Biophys* **298**: 349-360
59. Arner EC, Deccio CP, Cherney R, Tortorella MD (1997) *J Biol Chem* **272**: 9294-9299
60. Fosang AJ, Last K, Neame PJ, Murphy G, Knäuper V, Tschesche H, Hughes CE, Caterson B, Hardingham TE (1994) *Biochem J* **304**: 347-351
61. Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmermann T, Odermatt BF, Briner J, Heitz PU, Zimmermann DR (1996) *J Histochem Cytochem* **44**: 303-312
62. Scott PG, Dodd CM, Tredget EE, Ghahary A, Rahemtulla F (1995) *Clin Sci* **26**: 423-431
63. Margolis RK, Margolis RU (1993) *Experientia* **49**: 429-446
64. Lander AD (1993) *Curr Opin Neurobiol* **3**: 716-723
65. Oohira A, Katoh-Semba R, Watanabe E, Matsui F (1994) *Neurosci Res* **20**: 195-207
66. Kiang WL, Margolis RU, Margolis RK (1981) *J Biol Chem* **265**: 10529-10537
67. Tona A, Perides G, Rahemtulla F, Dahl D (1993) *J Histochem Cytochem* **41**: 593-599
68. Nara Y, Kato Y, Torii Y, Tsuji Y, Nakagaki S, Goto S, Isobe H, Nakashima N, Takeuchi J (1997) *Histochem J* **29**: 21-30
69. Bignami A, Perides G, Rahemtulla F (1993) *J Neurosci Res* **34**: 97-106
70. Perides G, Erickson HP, Rahemtulla F, Bignami (1993) *Anat Embriol* **188**: 467-479
71. Apostolski S, Sadiq SA, Hays A, Cobro M, Suturkova-Milosevic L, Chaliff P, Stefansson K, LeBaron RG, Ruoslahti E, Hays AP, Latov N (1994) *J Neurosci* **38**: 134-141
72. Watanabe E, Sachiko A, Matsui F, Yamada Y, Naruse I, Oohira A (1995) *Eur J Neurosci* **7**: 547-554
73. Retzler C, Wiedeman H, Kulbe G, Rauch U (1996) *J Biol Chem* **271**: 17107-17113
74. Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU (1996) *Perspect Develop Neurobiol* **3**: 273-290
75. Seidenbecher CI, Richter K, Rauch U, Fässler R, Garner CC, Gundelfinger ED (1995) *J Biol Chem* **270**: 27206-27212

# Apoptoza: nukleaza, kaspazy, cytochrom c\*

## Apoptosis: nuclease, caspases, cytochrome c

PIOTR WIDŁAK<sup>1</sup>

Jednym z „gorących” tematów badań biologii molekularnej i biologii komórki jest w ostatnich latach apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki. Apoptoza jest indukowanym przez szereg sygnałów pochodzących z innych komórek (lub środowiska) aktywnym procesem metabolicznym, prowadzącym do usunięcia z organizmu komórek zbytecznych, szkodliwych lub uszkodzonych. Z zaburzeniami apoptozy wiąże się szereg chorób będących wynikiem albo jej zbyt wysokiego, albo zbyt niskiego poziomu. W procesie apoptozy można wyróżnić trzy główne etapy: przesyłanie sygnału, fazę efektorową (proces wspólny dla różnych sygnałów inicjujących apoptozę, decydujący o nieodwracalności zmian) oraz zmiany strukturalne prowadzące do śmierci komórki. W piśmiennictwie polskim opublikowano do tej pory liczne artykuły przeglądowe opisujące proces zaprogramowanej śmierci komórki [m.in. 1-4]. Rok 1997 i początek roku 1998 przyniósł wyjaśnienie wielu mechanizmów dotyczących fazy efektorowej i końcowej apoptozy. Między innymi wyjaśniono mechanizm działania białek ced-9, ced-4 i ced-3 w komórkach *C. elegans*, oraz białek homologicznych z komórek ludzkich. Opisano również nukleazę aktywowaną w trakcie apoptozy. Poniższa nota dotyczy tego właśnie etapu badań nad apoptozą i jest niejako dodatkiem do wyczerpujących prac przeglądowych opublikowanych wcześniej w *Postęпах Biochemii*.

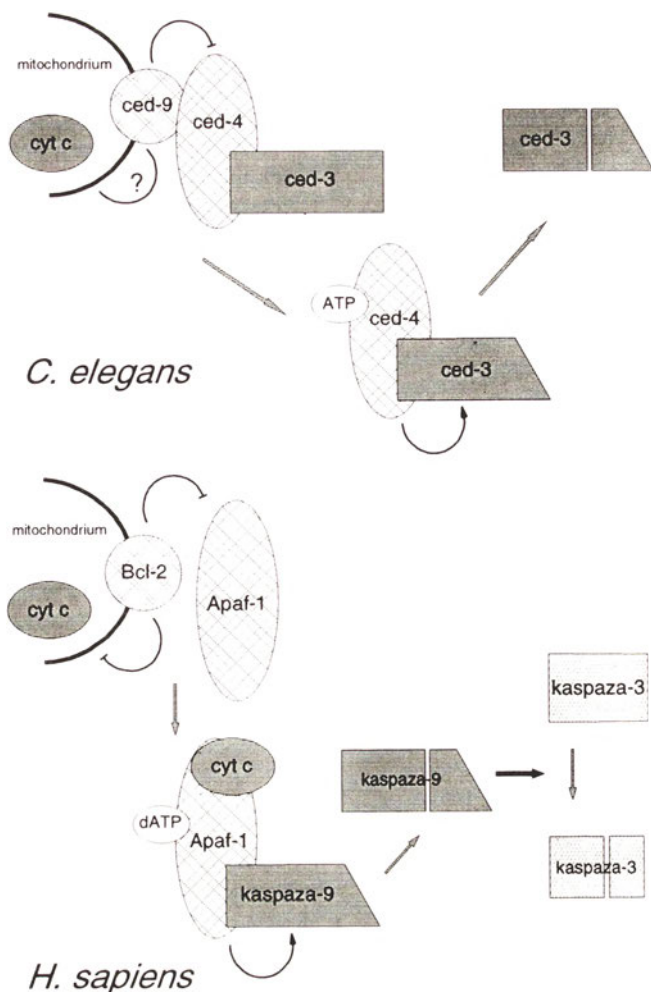
Jednym z organizmów, u których mechanizmy apoptozy poznane są najlepiej jest nicien *Caenorhabditis elegans*. Spośród kilkunastu genów *C. elegans* biorących udział w regulacji apoptozy, geny CED 4, CED 3 i CED 9 wydają się być najistotniejsze (dwa pierwsze są aktywatorami, a trzeci inhibitorem śmierci) [5]. Białko ced-3 *C. elegans* jest kaspazą (ang. *caspase*, *aspartate-specific proteinase*), proteazą cysteinową rozszczepiającą łańcuch polipeptydowy za resztą asparaginową znajdującą się w specyficznym kontekście reszt aminokwasowych. W komórkach ludzkich do tej pory wykryto 10 kaspaz biorących udział w apoptozie oraz aktywacji cytokin. Aktywacja kaspaz odbywa się w kaskadzie, w której nieaktywne zymogeny aktywowane są na drodze ograniczonej proteolizy przez inne kaspazy

(lub w wyniku autokatalizy). Substratami kaspaz są liczne białka cytoplazmatyczne i jądrowe [przeгляд: 6-8]. Białko ced-9 *C. elegans* jest białkiem błon mitochondrialnych, a homologiczne geny ludzkie należą do rodziny protoonkogenów *bcl-2* [przeгляд: 9]. Na podstawie danych genetycznych zakładano, że w trakcie apoptozy białko ced-4 jest aktywatorem białka ced-3, natomiast białko ced-9 hamuje taką aktywację [5]. Prace opublikowane w ubiegłym roku potwierdziły prawdziwość tej hipotezy. Stwierdzono, że białko ced-4 może tworzyć kompleksy z białkiem ced-9 (oraz z ludzkim białkiem Bcl-x<sub>L</sub>) lub z prekursorem kaspazy ced-3 (oraz z ludzkimi kaspazami zawierającymi tzw. dużą prodomenę, m.in. kaspazą-8 i kaspazą-1). Możliwe jest również powstanie kompleksu ced-9/ced-4/ced-3. Powstanie kompleksu ced-4/ced-3 zmienia konformację prekursora kaspazy (w procesie zależnym od ATP) i umożliwia jego autoproteolityczną aktywację. Proces ten jest zahamowany jeśli ced-4 znajduje się w kompleksie z ced-9 [10-13] (Ryc. 1).

Ludzkimi białkami o największej homologii z ced-3 są kaspaza-3 i kaspaza-7. W aktywacji kaspazy-3 biorą udział trzy czynniki cytoplazmatyczne nazwane Apaf-1 Apaf-2 i Apaf-3 (ang.: *apoptotic protease activating factors*) oraz dATP. Czynniki Apaf-2 i Apaf-3 zostały zidentyfikowane jako cytochrom c [14]. Czynniki Apaf-1 i Apaf-2 są białkami wykazującymi homologię z białkiem ced-4 *C. elegans*. Białko Apaf-1 zawiera na końcu N-terminalnym domenę CARD, umożliwiającą oddziaływanie z innymi kaspazami posiadającymi tzw. dużą prodomenę. Białko Apaf-1 zawiera również domenę umożliwiającą oddziaływanie z cytochromem c (powtórzenie motywu WD) oraz miejsce wiązania dATP [15]. Ostatni z czynników aktywujących kaspazę-3, Apaf-3, został zidentyfikowany jako prekursor kaspazy-9. Białko Apaf-1 (po uprzednim związaniu dATP i cytochromu c) wiąże się za pośrednictwem domen CARD z prekursorem kaspazy-9. Utworzenie kompleksu Apaf-1 z prekursorem kaspazy-9 prowadzi do zmiany konformacji i aktywacji kaspazy-9 (prawdopodobnie na drodze autoproteolizy). Następnie kaspaza-9 aktywuje kaspazę-3 na drodze ograniczonej proteolizy (z zymogenu o masie ok. 32 kD powstaje aktywny

<sup>1</sup> Dr, Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej Instytut Onkologii, Oddział w Gliwicach Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

\* Artykuły przeglądowe dotyczące apoptozy publikowane były wcześniej w „Postęпах Biochemii” (m.in. w numerze 1 rocznika 1998; patrz spis piśmiennictwa)



**Ryc. 1.** Schematyczne przedstawienie aktywacji kaspazy ced-3 w komórkach nicienia *Caenorhabditis elegans*, oraz kaspazy-3 w komórkach ludzkich. Dane dotyczące mechanizmu aktywacji kaspazy-3 uzyskane zostały w doświadczeniach modelowych wykorzystujących wyłącznie białka wyizolowane z komórek ludzkich (lub białka ludzkie uzyskane technikami inżynierii genetycznej). Kształt trapezu lub prostokąta mają na schemacie nieaktywne prekursor kaspaz (formy aktywne przedstawione są w postaci dimeru). Cytochrom c; cyt c.

heterodimer 12 i 20 kD) [16] (Ryc. 1).

Stwierdzono, że obecność w błonie mitochondrialnej białek Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> hamuje wpływ cytochromu c do cytoplazmy. Uważa się więc, że w komórkach kręgowców białka te są inhibitorami apoptozy poprzez regulację poziomu cytochromu c [17, 18]. W komórkach ludzkich obecnych jest kilka białek należących do rodziny Bcl-2. Część z nich funkcjonuje jako inhibitory apoptozy, inne (np. Bax i Bad) są stymulatorami procesu. Białka te tworzą homo- lub heterodimery zlokalizowane między innymi w zewnętrznej błonie mitochondrialnej; o losie komórki decydują proporcje odpowiednich dimerów. W obecności niektórych czynników wpływających na wzrost komórki (np. interleukina-3, antynowotworowy lek *taxol*) białka z rodziny Bcl-2 mogą ulegać fosforylacji. Taka modyfikacja wpływa na translokację ufosforylowanych białek i ich zdolność tworzenia dimerów. Przykładowo, fosforylacja białka Bad uniemożliwia tworzenie dimeru z Bcl-X<sub>L</sub>, a stymuluje jego nagromadza-

nie w cytoplazmie w formie związanej z białkiem 14-3-3 [przegląd: 9, 19]. Dimery białek z rodziny Bcl-2 posiadają strukturę analogiczną do struktury niektórych białek tworzących kanały błonowe. Sugeruje to, że dimery Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> mogą tworzyć kanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej stabilizujące warunki elektrochemiczne wewnątrz mitochondriów. Hipotetycznie, działanie kanałów błonowych tworzonych przez Bad czy Bax mogłoby wpływać na zmianę równowagi jonowej wewnątrz mitochondriów. Prowadziłoby to do otwierania kanałów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, utraty potencjału błonowego, zmian osmotycznych w matriks i pęcznienia mitochondriów, a w konsekwencji do rozerwania błon mitochondrialnych i uwalniania cytochromu c. Stwierdzono, że uwalnianie cytochromu c we wczesnym etapie apoptozy odbywa się bez utraty potencjału błonowego. Wskazuje to, że uwalnianie cytochromu c nie jest poprzedzone rozerwaniem wewnętrznej błony mitochondrialnej [14, 17, 18]. Inna hipoteza dotycząca roli mitochondriów w aktywacji apoptozy zakłada, że dimery Bad lub Bax mogłyby tworzyć w błonie mitochondrialnej kanały specyficzne dla cytochromu c [przegląd: 20].

Ostatnio stwierdzono, że białko Bcl-X<sub>L</sub> wiąże się z kaspazami zawierającymi dużą prodomenę (np. kaspaza-9), oraz z białkiem Apaf-1. Związanie Bcl-X<sub>L</sub> z Apaf-1 uniemożliwia utworzenie kompleksu Apaf-1 prekursor kaspazy-9 i aktywację kaspazy-9 [21]. Wskazuje to, że ludzkie białka z rodziny Bcl-2 mogą hamować apoptozę także poprzez bezpośrednie oddziaływanie z Apaf-1 i kaspazami. Potwierdzeniem takiej hipotezy są prace wykazujące, że białko Bcl-2 może hamować apoptozę w sytuacji, gdy w cytoplazmie znajduje się uwolniony cytochrom c [22, 23]. Chociaż regulacja apoptozy w komórkach *C. elegans* wydaje się być mniej skomplikowana niż w komórkach ludzkich, mechanizmy aktywacji białka ced-3 i kaspazy-3 są dość zbliżone (patrz Ryc. 1). Istotną różnicą jest to, że aktywacja kaspazy ced-3 w komórkach *C. elegans* jest niezależna od cytochromu c [13].

Jedną z charakterystycznych zmian strukturalnych mających miejsce w komórce podlegającej apoptozie jest fragmentacja DNA, dająca w trakcie rozdziału elektroforetycznego wyizolowanego DNA obraz mono- i oligonukleosomów [24]. Przez szereg lat trwały poszukiwania nukleazy odpowiedzialnej za ten proces. W ubiegłym roku w komórkach ludzkich wykryto białko, które po wprowadzeniu do jąder indukowało degradację DNA. Białko to, nazwane DFF (ang. **DNA fragmentation factor**), jest heterodimerem składającym się z podjednostek o masach 40 i 45 kDa. Podjednostka DFF45 zawiera dwa miejsca rozpoznawane przez kaspazę-3, a jej proteoliza jest niezbędna dla aktywacji białka [25]. Na początku roku 1998 ukazała się praca wskazująca, że mysie białko homologiczne z DFF jest nukleazą odpowiedzialną za fragmentację DNA w trakcie apoptozy [26]. Aktywność nukleolityczna po-

twierdzona została również w przypadku ludzkiego DFF. Podjednostką katalityczną nukleazy jest DFF40, zaś DFF45 jest podjednostką regulatorową (w formie natywnej jest inhibitorem). DFF jest endonukleazą, która preferencyjnie przecina DNA pomiędzy nukleosomami (DNA łącznikowy) i generuje końce z resztami fosforanowymi po stronie 5' i resztami hydroksylowymi po stronie 3'. Nukleolityczna aktywność DFF nie jest zależna od jonów wapnia (dotychczas sugerowano, że nukleazy aktywowane w apoptozie zależne są od wapnia) [27].

Prace opublikowane w ostatnim czasie, których część była przedmiotem powyższej noty, pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmów wiodących od zmian w mitochondriach do aktywacji kaspaz i nukleaz. Odkrycia te w istotnym stopniu uzupełniły wiedzę o przebiegu fazy efektorowej i degradacji struktur komórki w trakcie apoptozy.

Artykuł otrzymano 26 lutego 1998 r.  
Zaakceptowano do druku 25 czerwca 1998 r.

## Piśmiennictwo

- Sikora E (1994) *Post Biochem* **40**: 150-160
- Sikora E (1996) *Post Biochem* **42**: 108-112
- Grzelakowska-Sztabert B (1998) *Post Biochem* **44**: 8-21
- Bartosz G (1998) *Post Biochem* **44**: 22-31
- Hengartner MO, Horvitz HR (1994) *Curr Opin Genet Dev* **4**: 581-586
- Salvesen GS, Dixit VM (1997) *Cell* **91**: 443-446
- Nicholson DW, Thornberry NA (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 299-306
- Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 388-393
- Jacobson MD (1997) *Curr Biol* **7**: R277-R281
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM (1997) *Science* **275**: 1122-1126
- Wu D, Wallen HD, Nunez G (1997) *Science* **275**: 1126-1129
- Seshagiri S, Miller LK (1997) *Curr Biol* **7**: 455-460
- Chinnaiyan AM, Chaudhary D, O'Rourke K, Koonin EV, Dixit VM (1997) *Nature (Lond)* **388**: 728-729
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) *Cell* **86**: 147-157
- Zou H, Henzel W, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) *Cell* **90**: 405-413
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) *Cell* **91**: 479-489
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) *Science* **275**: 1129-1132
- Kluck RM, Bossy-Wetzler E, Green DR, Newmeyer DD (1997) *Science* **275**: 1132-1136
- Gajewski TF, Thompson CB (1996) *Cell* **87**: 589-592
- Reed JC (1997) *Cell* **91**: 559-562
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4386-4391
- Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, Døskeland SO (1998) *Nature (Lond)* **391**: 449-450
- Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C (1998) *Nature (Lond)* **391**: 496-499
- Wyllie A (1980) *Nature (Lond)* **284**: 555-556
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) *Cell* **89**: 175-184
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Hagata S (1998) *Nature (Lond)* **391**: 43-50
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*. w druku

# Glikoalkaloidy steroidowe rodziny *Solanaceae*

## Steroidal Glycoalkaloids (SGA) in *Solanaceae*

JAN ZIMOWSKI\*

*Spis treści:*

- I. Struktura i występowanie glikoalkaloidów steroidowych (SGA)
  - I-1. Struktura aglikonu
  - I-2. Budowa łańcuchów cukrowych SGA
  - I-3. Występowanie SGA
- II. Metabolizm
  - II-1. Biosynteza aglikonu
  - II-2. Biosynteza łańcucha cukrowego
  - II-3. Degradacja SGA

*Contents:*

- I. Structure and occurrence of steroidal glycoalkaloids (SGA)
  - I-1. Aglycon structures of SGA
  - I-2. Structure of sugar chains of SGA
  - I-3. Occurrence of SGA
- II. SGA metabolism
  - II-1. Aglycon biosynthesis
  - II-2. Biosynthesis of sugar chain of SGA
  - II-3. SGA degradation

\* Dr, Instytut Biochemii UW, 02-089 Warszawa, al. Żwirki i Wigury 93

Wykaz stosowanych skrótów: SGA — glikoalkaloid(y) steroidowy(e).



Glikoalkaloidy steroidowe (SGA) są glikozydowymi pochodnymi steroidów zawierających w cząsteczce co najmniej 1 atom azotu. Występują one w licznych roślinach należących do rodziny *Liliaceae* i ważnej ze względów gospodarczych rodziny *Solanaceae*. Do tej ostatniej należą takie rośliny jak ziemniak (*Solanum tuberosum*), pomidor (*Lycopersicon esculentum*), papryka (*Capsicum annuum*) czy bakłażan (*Solanum melongena*) [1-5].

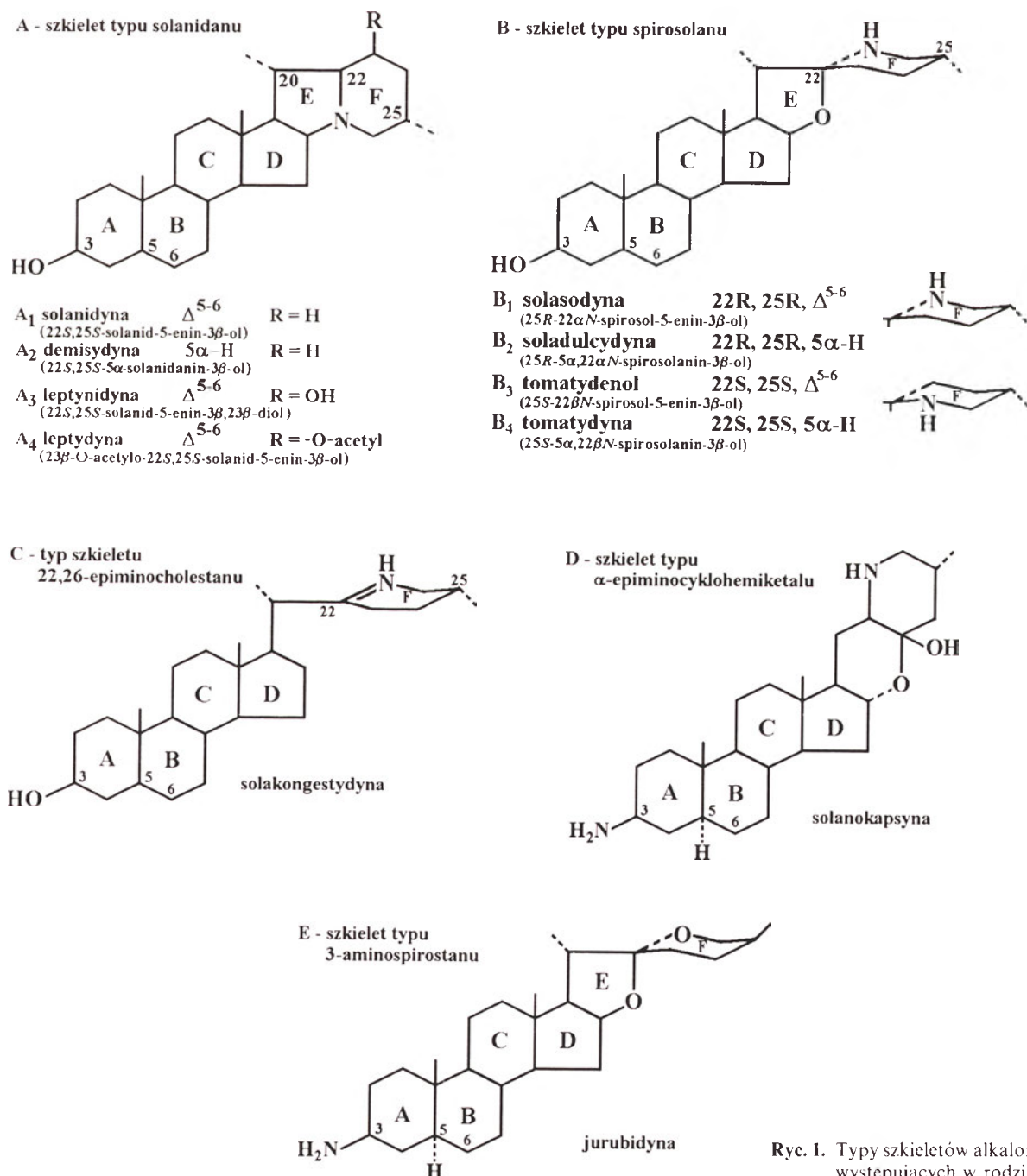
SGA w wysokich stężeniach są związkami trującymi dla ludzi i zwierząt, a także wpływają na smak wykorzystywanych w gospodarce jadalnych części roślin [4,5]. Z drugiej strony, coraz więcej obserwacji wskazuje, że związki te mogą odgrywać istotną rolę w ochronie wytwarzających je roślin przed szkodnikami [4-7]. Z obu tych względów wydaje się istotnym poznanie zarówno mechanizmów ich biosyntezy

i degradacji oraz regulacji metabolicznej i genetycznej tych procesów jak również mechanizmów ich toksycznego działania na organizmy żywe.

## I. Struktura i występowanie

### I-1. Struktura aglikonu

W skład cząsteczki SGA oprócz łańcucha cukrowego wchodzi alkaloid steroidowy (aglikon) — zawierająca atom azotu pochodna cholesterolu [1-5]. W cząsteczce alkaloidów steroidowych obecnych w rodzinie *Solanaceae* występuje charakterystyczny dla większości steroidów tetracykliczny układ 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenu (Rys. 1, pierścienie A-D) o płaskiej strukturze ( $5\alpha$ -H,  $\Delta^{5-6}$ ) i konfiguracji  $\beta$  grupy hydroksylowej przy węglu C-3. Poszczególne al-



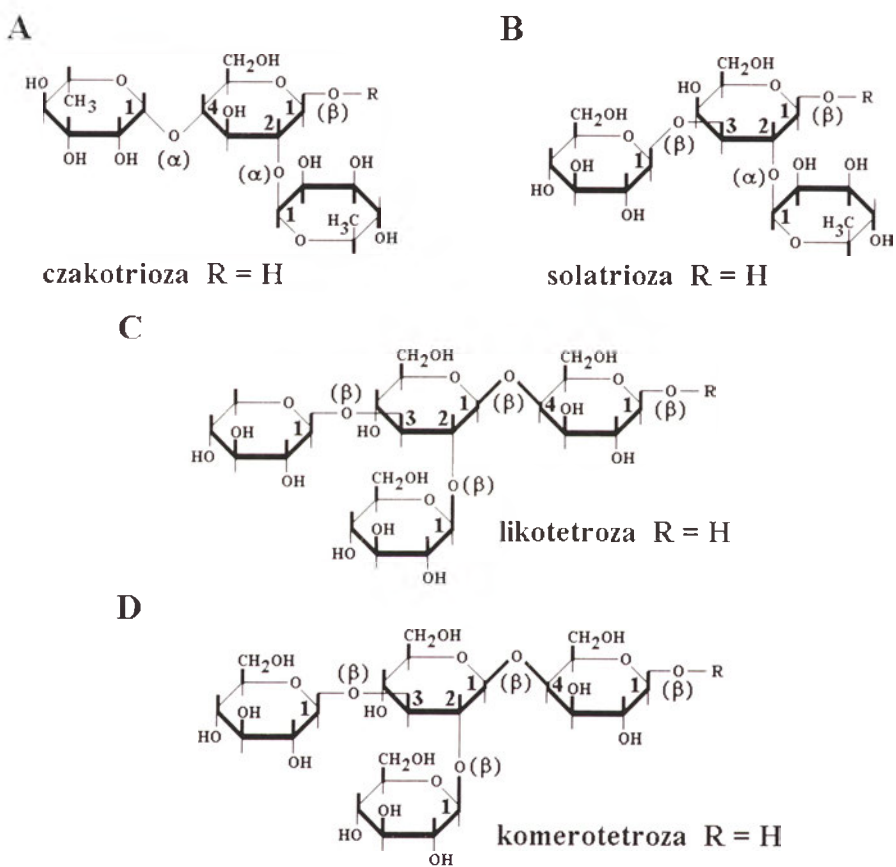
Ryc. 1. Typy szkieletów alkaloidów steroidowych występujących w rodzinie *Solanaceae*.

kaloidy steroidowe mogą różnić się między sobą obecnością w cząsteczce wiązań podwójnych, dodatkowych funkcji tlenowych, odmienną konfiguracją przy C-22, C-25 oraz obecnością dodatkowych pierścieni dołączonych do układu steranowego [1,2]. Ze względu na budowę szkieletu można wyodrębnić w rodzinie *Solanaceae* pięć głównych typów strukturalnych alkaloidów steroidowych:

— typ solanidanu (Ryc. 1A), w którym tetracykliczny układ pierścieniowy związany jest z dicyklicznym układem indolizydynowym (pierścienie E-F). Alkaloidy steroidowe należące do tej grupy posiadają konfigurację 20*S*, 22*R*, 25*S*. Najczęściej spotykanymi alkaloidami tego typu w rodzinie *Solanaceae* są solanidyna (Ryc. 1A<sub>1</sub>), główny alkaloid steroidowy ziemniaka, 5,6 dihydropochodna solanidyny — demisydy-

na (Ryc. 1A<sub>2</sub>), leptynidyna (23-hydroksysolanidyna; Ryc. 1A<sub>3</sub>) i leptydyna czyli 23-O-acetyloleptynidyna (Ryc. 1A<sub>4</sub>);

— typ spiroolanu (Ryc. 1B), w którym do układu tetracyklicznego przyłączony jest pierścień furanowy (E), z którym związany jest pierścień piperydynowy (F) o konfiguracji krzeselkowej. Pierścienie są połączone z sobą w ten sposób, że płaszczyzna pierścienia F jest odchyłona pod kątem ok. 90° w stosunku do wypadkowej płaszczyzny pierścienia E. Do alkaloidów steroidowych tego typu zalicza się solasodynę (Ryc. 1B<sub>1</sub>) i tomatydenol (Ryc. 1B<sub>3</sub>) różniące się konfiguracją przy atomach węgla C-22 i C-25 (solasodyna ma konfigurację 22*R* i 25*R*, a tomatydenol 22*S* i 25*S*) oraz ich 5,6-dehydropochodne: soladulcydynę (Ryc. 1B<sub>2</sub>) i tomatydynę (Ryc. 1B<sub>4</sub>) — główny alkaloid steroidowy



Typ łańcucha cukrowego	Rodzaj aglikonu (R = )	Nazwa glikoalkaloidu
czakotrioza	solanidyna	α-czakonina
czakotrioza	solasodyna	α-solamargina
czakotrioza	tomatydenol	α-β-solamarina
czakotrioza	23-O-acetyloleptynidyna	α-leptyna I
czakotrioza	leptynidyna	α-leptynina I
solatrioza	solanidyna	α-solanina
solatrioza	solasodyna	α-solasonina
solatrioza	tomatydenol	α-solamarina
solatrioza	23-O-acetyloleptynidyna	α-leptyna II
solatrioza	leptynidyna	α-leptynina II
likotetroza	tomatydyna	α-tomatyna
likotetroza	demisydyna	α-demisydna
komerotetroza	demisydyna	α-komersonina

Ryc. 2. Glikoalkaloidy steroidowe występujące w rodzinie *Solanaceae*.

pomidora;  
 — typ 22,26-epiminocholestanu, do którego należy solakongestydyna (Ryc. 1C) czy etiolina — metabolit pośredni w biosyntezie alkaloidów steroidowych;  
 — typ  $\alpha$ -epiminocyklohemiketalu do którego należy alkaloid papryki — solanokapsyna (Ryc. 1D);  
 — typ 3-aminospirostanu, którego przedstawicielem jest jurubidyna (Ryc. 1E) [1,5].

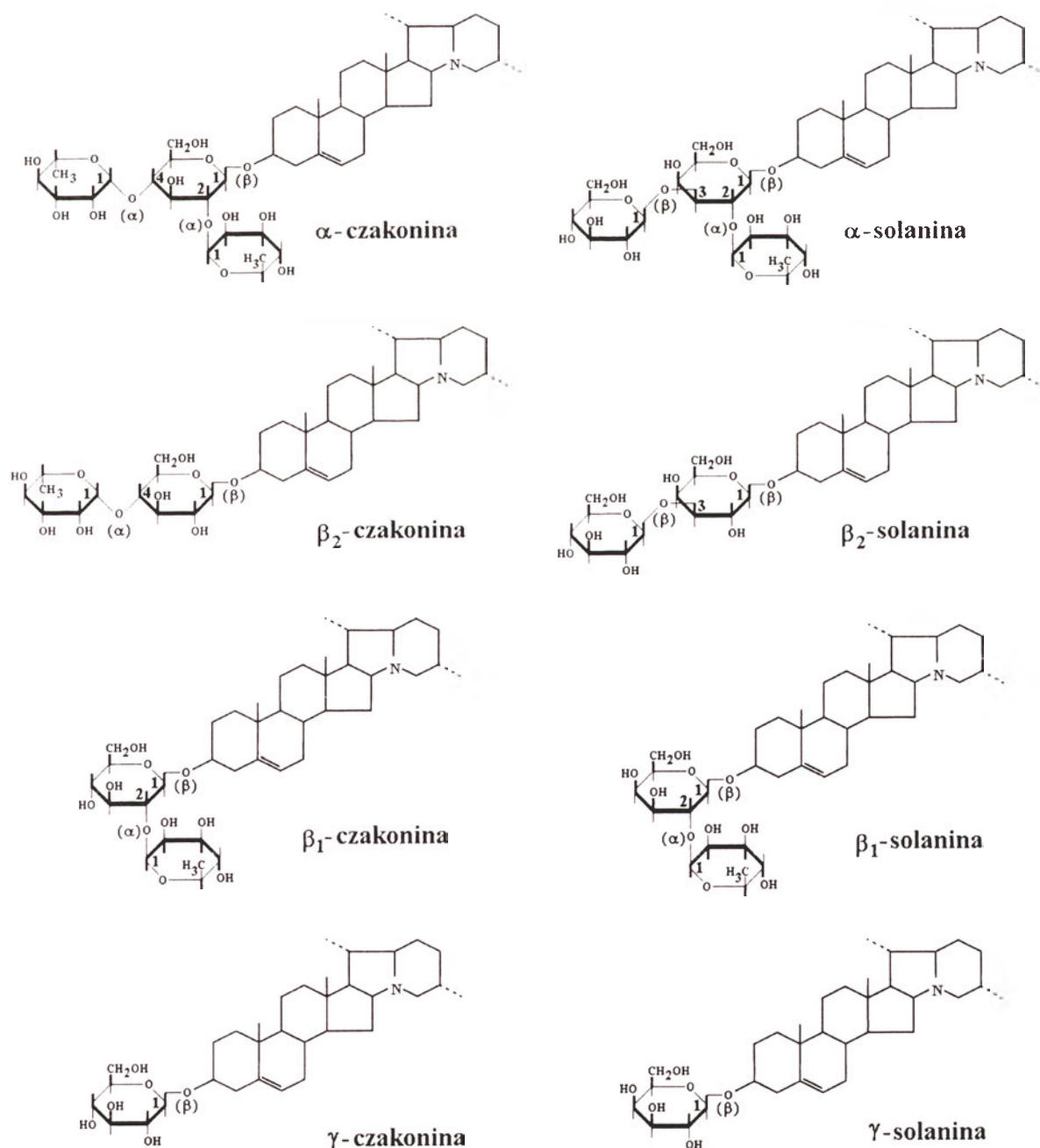
## I-2. Budowa łańcuchów cukrowych SGA

W cząsteczkach SGA syntetyzowanych przez rośliny z rodziny *Solanaceae* najczęściej występującymi aglikonami są alkaloidy steroidowe o strukturze solanidanu i spirosolanu [1-5]. W tych glikoalkaloidach łańcuchy cukrowe, zawierające do 4 reszt monosacharydowych związane są wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym z grupą OH przy C-3 aglikonu [4,5]. W skład łań-

cuchów cukrowych SGA wchodzi najczęściej D-glucoza, D-galaktoza, D-ksyloza i L-ramnoza, przy czym cukry szeregu D połączone są wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym, zaś szeregu L  $\alpha$ -glikozydowym [5].

Najczęściej spotykanymi łańcuchami cukrowymi SGA (Ryc. 2) w rodzinie *Solanaceae* są [4,5]:

- czakotrioza ([ $\alpha$ -L-ramnopiranozylo (1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-ramnopiranozylo (1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glukopiranoza; Ryc. 2A)
- łańcuch cukrowy występujący m.in. w  $\alpha$ -czakoninie, jednym z dwu głównych SGA *S. tuberosum*, a także w  $\alpha$ -solamarginie,  $\alpha$ - $\beta$ -solamarinie (w piśmiennictwie często nazywanej  $\beta$ -solamariną),  $\alpha$ -leptynie I i  $\alpha$ -leptyninie I;
- solatrioza ([ $\alpha$ -L-ramnopiranozylo (1 $\rightarrow$ 2)]-[ $\alpha$ -L-ramnopiranozylo (1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-galaktopiranoza; Ryc. 2B)
- łańcuch cukrowy występujący m.in. w  $\alpha$ -solaninie, drugim z głównych SGA *S. tuberosum*, a także w  $\alpha$ -solaninie,  $\alpha$ -solamarinie,  $\alpha$ -leptynie II czy  $\alpha$ -leptyninie II;



Ryc. 3. Wzory strukturalne  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -czakoniny i  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -solaniny.

— likotetroza ([ $\beta$ -D-ksylopiranozylo (1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\beta$ -D-glukopiranozylo (1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glukopiranozylo (1 $\rightarrow$ 4))- $\beta$ -D-galaktopiranoza; Ryc. 2C) — łańcuch ten występuje w  $\alpha$ -tomatynie, głównym SGA *L. esculentum* czy w  $\alpha$ -demisyinie;

— komerotetozę ([ $\beta$ -D-glukopiranozylo (1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\beta$ -D-glukopiranozylo (1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glukopiranozylo (1 $\rightarrow$ 4))- $\beta$ -D-galaktopiranoza; Ryc. 2D) — łańcuch ten występuje np. w  $\alpha$ -komersoninie.

W piśmiennictwie przyjęło się określanie  $\alpha$ -związki dla naturalnych glikoalkaloidów o pełnym łańcuchu cukrowym (tj. zawierających czako- czy solatriozę, liko- lub komerotetozę). Stopniowe odrywanie pojedynczych cukrów prowadzi do powstawania  $\beta$ ,  $\gamma$ -związków lub  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -związków w przypadku SGA odpowiednio z łańcuchem cukrowym trisacharydowym lub tetrasacharydowym (przykładowo strukturę  $\alpha$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, i  $\gamma$ -czakoniny oraz  $\alpha$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - i  $\gamma$ -solaniny przedstawiono na Ryc. 3).

### I-3. Występowanie SGA

Często w jednej roślinie występuje para glikoalkaloidów o wspólnym aglikonie, a różnym typie łańcucha oligosacharydowego. W wielu gatunkach z rodziny *Solanaceae* np. w *S. tuberosum*, *S. chacoense* czy *S. andigenum* parę taką tworzą  $\alpha$ -solanina i  $\alpha$ -czakonina, glikozydy solanidyny, w których jest ona połączona odpowiednio z solatriozą lub czakotriozą [8]. W przypadku *S. tuberosum* stwierdzono, że stosunek  $\alpha$ -czakoniny do  $\alpha$ -solaniny wynosi na ogół ok. 40:60, jednakże może on czasami wahać się w zakresie od 25:75 do 60:40 [9-12]. Innymi parami SGA, w których z aglikonem związana jest czako- lub solatriozę są glikozydy solasodyny —  $\alpha$ -solamargina i  $\alpha$ -solasonina występujące w *S. boerhaavii*, *S. aviculare*, *S. chlorocarpum*, *S. dulcamara*; glikozydy tomatidenolu —  $\alpha$ - $\beta$ -solamarina i  $\alpha$ -solamarina, których obecność stwierdzono m.in. w *S. dulcamara*, *S. demissum* i w *S. tuberosum*; glikozydy 23-O-acetyloleptynidyny —  $\alpha$ -leptyna I i  $\alpha$ -leptyna II czy glikozydy leptynidyny —  $\alpha$ -leptynina I i  $\alpha$ -leptynina II w *S. chacoense* [5,13-17]. W *S. demissum* i *S. polyadenium* stwierdzono występowanie  $\alpha$ -demisyiny i  $\alpha$ -komersoniny, w których odpowiednio łańcuchy cukrowe typu likotetrozy i komotetrozy związane są z demisydyną [9,18]. Natomiast w *L. esculentum* stwierdzono występowanie jako głównego SGA jedynie  $\alpha$ -tomatyny, w której z aglikonem tj. tomatydyną związana jest likotetroza [4,19].

Skład jakościowy SGA jest na ogół identyczny w całej roślinie [5]. Jednakże np. w *S. chacoense* nie stwierdzono w bulwach obecności leptyn, wykrywanych w liściach, a w *S. paniculatum* nie stwierdzono w liściach jurbiny (monoglukozydu jurubidyny) obecnej w korzeniach [20,21]. Badania nad rozmieszczeniem SGA w różnych częściach *S. tuberosum* i *L.*

*esculentum* wykazały, że występują one we wszystkich organach tych roślin, przy czym w *S. tuberosum* ich całkowita zawartość w mg/kg św. m jest najwyższa w kielkach (2750-10000), kwiatach (3000-5000) i owocach (260-1360) a w *L. esculentum* w kwiatach (1280-1310), liściach (1130-1150) i małych niedojrzałych owocach (540-550) [5,11,22-25]. Stwierdzono również, że zawartość SGA w aktywnych metabolicznie tkankach, a więc w młodych liściach, niedojrzałych owocach, młodych (małych) bulwach jest wyższa niż w starych liściach, owocach czy starych (dużych) bulwach.

W nieuszkodzonych bulwach *S. tuberosum* dystrybucja SGA nie jest równomierna [11,23,26-30]. Około 80-95% tych związków jest zlokalizowane w 1,5-2 mm warstwie pod skórą, przy czym w warstwie tej ich stężenie jest największe w obszarach „okołoczkowych”. Jednocześnie zawartość glikoalkaloidów szybko maleje w kierunku wnętrza bulwy. Natomiast w bulwach uszkodzonych, np. mechanicznie, zawartość SGA wyraźnie wzrasta w całej bulwie, co powoduje, że w warstwie pod skórą jest zlokalizowane tylko ok. 30-40% sumy glikoalkaloidów [30-32]. W przypadku *L. esculentum* stwierdzono, że w czasie dojrzewania owoców początkowo wysoka zawartość  $\alpha$ -tomatyny ulega kilkusetkrotnemu obniżeniu (z ok. 550 do 1,76-2,1 mg/kg św. m) [22,23]. Podobne zjawisko spadku zawartości glikoalkaloidów w owocach zaobserwowano w *S. laciniatum* [34].

Z drugiej strony nie obserwuje się praktycznie transportu SGA pomiędzy różnymi częściami rośliny, co wskazywałoby, że biosynteza i degradacja glikoalkaloidów zachodzi „*in situ*” [5]. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja SGA nie jest znana. Wiadomo jedynie, że związki te lokalizowano we frakcji cytosolowej podczas różnicowego wirowania homogenatu z roślin ziemniaka i pomidora, co pozwala sądzić, że są one magazynowane w wakuoli [35].

## II. Metabolizm SGA

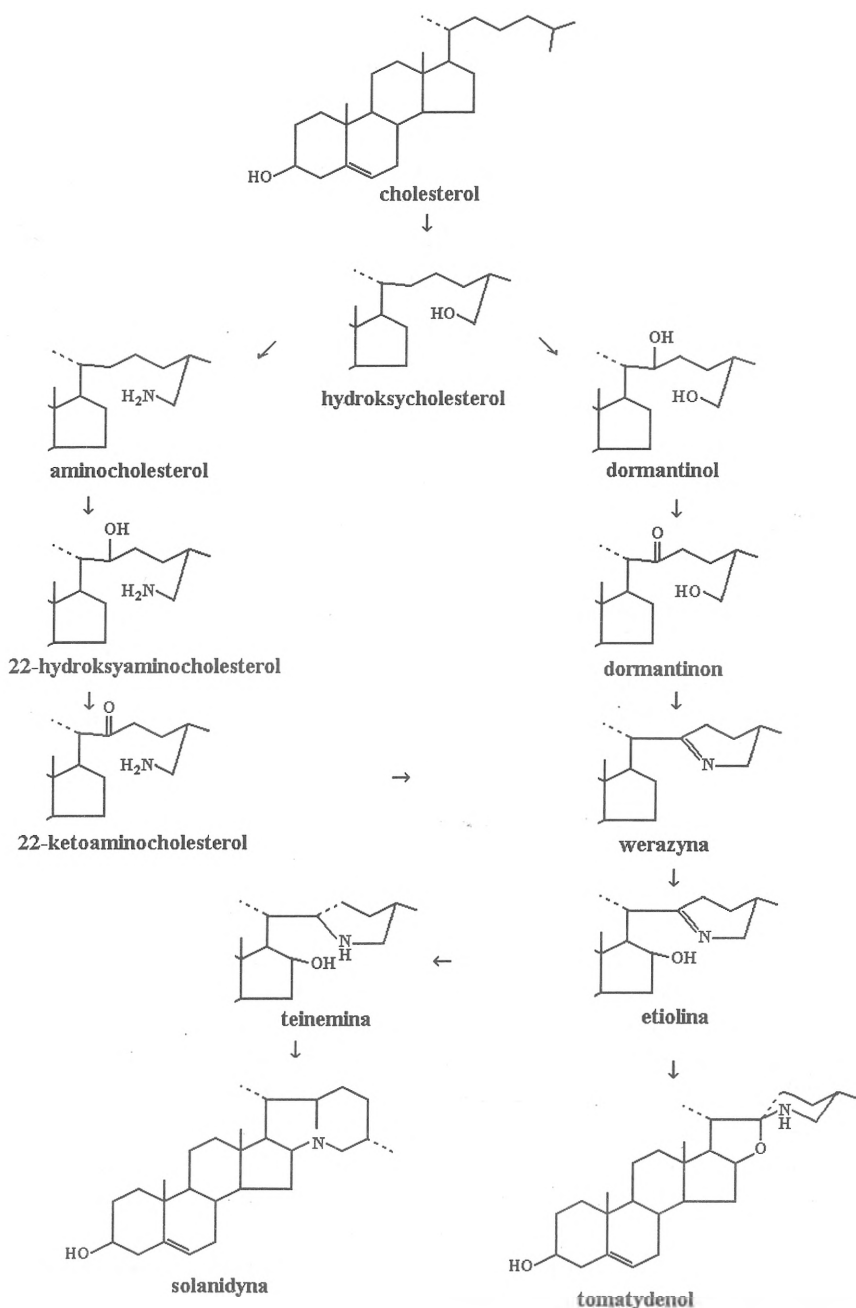
### II-I. Biosynteza aglikonu

Jak już wspomniano wyżej, główne alkaloidy steroidowe występujące w rodzinie *Solanaceae* mają strukturę solanidanu i spiroolanu. Efektywne włączanie [ $^{14}$ C]mewalonianu do obu tych typów alkaloidów steroidowych wskazuje, że powstają one na szlaku wspólnym dla terpenoidów roślinnych, zaś przekształcanie się [26,27- $^{14}$ C]cykloartenolu jak i [26,27- $^{14}$ C]lanosterolu, prekursorów cholesterolu, w solanidynę, tomatydynę czy solakapsynę odpowiednio w *S. chacoense*, *L. pimpinellifolium* czy *S. pseudocapsicum*, wskazuje na możliwość powstawania alkaloidów steroidowych ze steroli roślinnych [36,37]. Efektywne włączanie [4- $^{14}$ C]cholesterolu do tomatydyny przez *L. esculentum* i *L. pimpinellifolium* czy do solanidyny przez *S. tuberosum* sugeruje, że alkaloidy steroid-

dowe powstają w wyniku przekształcenia łańcucha bocznego cząsteczki cholesterolu [38-40]. Wykazano, że donorem grupy aminowej w syntezie alkaloidów steroidowych w *S. tuberosum* może być glicyna lub alanina, zaś dla *Veratrum grandiflorum* arginina [41,42]. Stwierdzono, że w *L. pimpinellifolium* 25S-5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ ,27-diol jest przekształcany w tomatydynę, zaś 25R-5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ ,26-diol w soladulcydynę [43]. Tschesche wykazał, że 25R-26-aminocholesterol jest wykorzystywany przez *S. dulcamara* w biosyntezie solasodyny, co wskazywałoby, że przekształcenia w pozycji C-22 mają miejsce dopiero po wprowadzeniu grupy aminowej [44]. Kenako na podstawie obecności w roślinach *Veratrum grandiflorum* dormantinolu (22,26-dihydroksycholesterol) i dormantinonu (22-keto-26-hydroksycholesterol) sugeruje, że transaminacja ma miejsce dopiero po wprowadzeniu tlenowych grup funkcyjnych w pozycje C-26 i C-22 [45]. Brak zdolności wykorzystywania 16-hydroksy-

-5 $\alpha$ -cholestanolu i 22-keto-5 $\alpha$ -cholestanolu jako prekursorów w biosyntezie alkaloidów steroidowych, wskazuje że hydroksylacja w pozycji C-26 lub C-27 poprzedza hydroksylacje w innych pozycjach [7]. Obserwowany brak możliwości wykorzystywania 22-keto-16,26-dihydroksycholesterolu, 16,22,26-trihydroksycholesterolu czy 16-hydroksy-26-aminocholesterolu jako prekursorów w biosyntezie solasodyny, soladulcydyny, tomatydyny czy tamatydenolu, jak również występowanie werazyny i etioliny w roślinach syntetyzujących alkaloidy steroidowe typu solanidanu czy spirosolanu wskazuje, że hydroksylacja w pozycji C-16 ma miejsce dopiero po uformowaniu pierścienia F [7].

Na podstawie tych obserwacji zaproponowano dwie drogi biosyntezy alkaloidów steroidowych. Ich podstawową różnicą jest moment wprowadzenia azotu do cząsteczki syntetyzowanych alkaloidów steroidowych (Ryc. 4).



Ryc. 4. Hipotetyczne szlaki biosyntezy alkaloidów steroidowych.

Pierwsza z nich, której autorem jest T s c h e s c h e i w s p ., zakłada hydroksylację cholesterolu w pozycji C-26, a następnie wymianę tej grupy na grupę aminową w wyniku czego powstaje 26-aminocholesterol. Utlenienie tej aminopochodnej cholesterolu w pozycji C-22 do formy 22-hydroksy- lub 22-ketopochodnej prowadziłoby do zamknięcia pierścienia F i powstania werazyny, a hydroksylacja werazyny w pozycji C-16 do powstania etioliny. Cyklizacja pierścienia E poprzedzona przemieszczeniem wiązania podwójnego i atomu wodoru w cząsteczce etioliny prowadziłoby do powstania cząsteczki alkaloidu steroidowego typu spiroolanu [46].

Druga z hipotez, wysunięta przez K a n e k o i w s p ., zakłada kolejne hydroksylacje w łańcuchu bocznym cholesterolu najpierw w pozycji C-26, a następnie w pozycji C-22 z wytworzeniem cząsteczki dormantinolu. Związek ten, w wyniku odwodorowania w pozycji C-22, przekształca się w dormantinon, w którego cząsteczce, w wyniku transaminacji, następuje wymiana grupy hydroksylowej w pozycji C-26 na grupę aminową. Kondensacja tej grupy z grupą ketonową w pozycji C-22 prowadzi do powstania pierścienia F. Powstająca w ten sposób werazyna ulega w wyniku hydroksylacji w pozycji C-16 przekształceniu w etiolinę, a następnie w wyniku redukcji przy C-22 w teineminę, która po cyklizacji pierścienia E zostaje przekształcona w alkaloid steroidowy o strukturze solanidanu [42].

Obserwowana w obecności NADPH hydroksylacja solanidyny do 23 $\beta$ -hydroksysolanidyny przez preparat z frakcji mikrosomalnej z *S. chacoense* wskazuje, że wprowadzanie dodatkowych grup hydroksylowych w alkaloidach sterydowych następuje już po uformowaniu danego typu szkieletu, a jeszcze przed glikozylacją [47].

## II-2. Biosynteza łańcucha cukrowego

Biosynteza łańcucha cukrowego SGA jest bardzo słabo poznana. Obserwowana biosynteza  $\alpha$ -solamarginy i  $\alpha$ -solasoniny po podaniu znakowanej solasodiny roślinom *S. laciniatum* wskazuje, że synteza łańcucha cukrowego SGA następuje po zakończeniu biosyntezy aglikonu. Stwierdzono również, że surowy preparat enzymatyczny z liści tej rośliny posiada zdolność do syntezy 3 $\beta$ -glukozydu solasodiny [48]. W 1977 r. L a v i n t m a n i w s p ., donieśli, że surowy preparat enzymatyczny z bulw *S. tuberosum* glikozyluje solanidynę, wykorzystując UDP-glukozę jako donora reszty cukrowej [49]. Preparat ten w obecności NADPH, solanidyny i UDP-glukozy posiadał zdolność do biosyntezy 6 różnych glikozydów solanidyny. W ostatnich latach częściowo oczyszczono z *S. tuberosum*, *L. esculentum* i *S. melongena* glikozytransferazy specyficzne wobec aglikonu steroidowego, odpowiedzialne za glikozylację odpowiednio solanidyny, tomatydyny i solasodyny [50-61]. I tak z frakcji cytosolowej

bulw, kielków i liści *S. tuberosum* wyizolowano glikozytransferazę UDP-glukoza : solanidyna (syntetyzującą glikozyd solanidyny — prekursora w biosyntezie  $\alpha$ -czakoniny), z liści *L. esculentum* — galaktozylotransferazę UDP-galaktoza:tomatydina (syntetyzującą glikozyd tomatydyny — prekursora  $\alpha$ -tomatyny), a z liści *S. melongena* — glikozylotransferazę UDP-glukoza : solasodina (syntetyzującą glikozyd solasodyny — prekursora  $\alpha$ -solamarginy). Udało się również wyizolować z *S. tuberosum* cDNA kodujące glikozylotransferazę UDPG : solanidyna [62]. Równocześnie stwierdzono obecność w preparatach enzymatycznych z kielków i bulw *S. tuberosum* galaktozylotransferazy, która do syntezy galaktozydu solanidyny ( $\gamma$ -solaniny), prawdopodobnego prekursora w biosyntezie  $\alpha$ -solaniny, wykorzystuje UDP-galaktozę i solanidynę [52,55]. Wskazuje to, że biosynteza łańcuchów cukrowych SGA występujących w *S. tuberosum*, tj. solatriozy i czakotriozy, jest przynajmniej na poziomie glikozylacji aglikonu katalizowana przez różne enzymy. Wszystkie opisane powyżej enzymy mają podobne właściwości. Mają zbliżoną masę cząsteczkową i optimum pH. Na ich aktywność wpływają, w podobny sposób: jony metali dwuwartościowych i związki chelatujące, UDP, czynniki zawierające grupy -SH, wysoka siła jonowa. Różnią się one natomiast wyraźnie specyficznością substratową w stosunku do akceptora reszty cukrowej, glikozylując z największą szybkością aglikon SGA charakterystycznego dla danej rośliny. Występowanie w roślinach wytwarzających SGA enzymów przenoszących reszty cukrowe z odpowiednich nukleotydocukrów na aglikon, jak również synteza mono- i diglukozydu solanidyny przez krążki i zawiesinę komórkową z bulw *S. tuberosum* w obecności [<sup>3</sup>H] solanidyny sugerują, że łańcuchy cukrowe SGA są syntetyzowane w wyniku kolejnego dołączania reszt monosacharydowych, a nie w wyniku przenoszenia na aglikon wcześniej zsyntetyzowanych łańcuchów cukrowych [63].

Badania nad regulacją biosyntezy SGA w krążkach z bulw *S. tuberosum* wykazały, że kwas absycynowy, kwas giberelinowy czy chlorowodorek (2-chloroetylo)trimetyloaminy (inhibitor biosyntezy gibereliny) nie wpływały na poziom SGA nagromadzany w krążkach, natomiast norbornadien, współzawodniczy inhibitor działania etylenu, powodował zwiększenie zawartości SGA w porównaniu z krążkami kontrolnymi [64,65]. Inkubacja krążków w obecności etylenu oraz etefonu (związek uwalniający etylen) powodowała zahamowanie biosyntezy SGA [64,65]. Jak wykazała Bergenstrahle brak biosyntezy SGA w obecności etylenu może wynikać z obniżenia aktywności glikozytransferazy UDP-glukoza : solanidyna, enzymu odpowiedzialnego za zapoczątkowanie biosyntezy łańcucha cukrowego  $\alpha$ -czakoniny i aktywacji C-24 metylotransferazy S-adenozyno-L-metionina : cykloartenol [65]. Wzrost aktywności metylotransferazy powoduje, poprzez usunięcie metabolitu pośredniego (cykloartenolu), spadek

syntezy cholesterolu, a w dalszej kolejności również solanidyny.

### II-3. Degradacja SGA

W preparatach enzymatycznych z kiełków i bulw *S. tuberosum* stwierdzono obecność enzymów hydrolitycznych o aktywności ramnozydazy, glukozydazy i galaktozydazy [66,67]. Enzymy te posiadają zdolność do hydrolizy  $\alpha$ -solaniny i  $\alpha$ -czakoniny. W pierwszym etapie tej hydrolizy, niskospecyficzna ramnozydaza, która została częściowo oczyszczona i scharakteryzowana, odszczepia resztę ramnozy zarówno z  $\alpha$ -czakoniny jak i  $\alpha$ -solaniny, w wyniku czego powstaje odpowiednio  $\beta_2$ -czakonina lub  $\beta_2$ -solanina [68]. Następnie  $\beta_2$ -czakonina jest przekształcana bezpośrednio do solanidyny, bez powstawania jako produktu pośredniego  $\gamma$ -czakoniny, natomiast w przypadku  $\beta_2$ -solaniny w wyniku działania glukozydazy powstaje  $\gamma$ -solanina, która następnie jest hydrolizowana do wolnej solanidyny [5,67]. Jednakże mimo stwierdzenia tego typu aktywności w preparatach enzymatycznych, aktywność tych hydrolaz w nienaruszonych tkankach mierzona poziomem produktów ich działania wydaje się być bardzo niska, gdyż w bulwach wykryto jedynie ślady  $\beta$ -,  $\gamma$ -związków czy solanidyny [5]. Z drugiej strony, w bulwach pewnych odmian *S. tuberosum* stwierdzono obecność znacznych ilości  $\beta_2$ -czakoniny [11,69]. Przekształcanie się  $\alpha$ -czakoniny do  $\beta_2$ -czakoniny obserwowano przy przedłużającym się przechowywaniu kiełkujących bulw *S. tuberosum* [70]. Wydaje się, że za tę hydrolizę odpowiedzialna jest odrębna specyficzna ramnozydaza, której obecność stwierdzono w bulwach i kwiatach *S. tuberosum* [71,72]. Enzym ten, w przeciwieństwie do wyżej wspomnianej niskospecyficznego ramnozydazy, nie wykazuje żadnej aktywności w stosunku do  $\alpha$ -solaniny.

Inną możliwością degradacji SGA może być metabolizm aglikonów występujących w cząsteczce SGA. Wydaje się, że opisany powyżej (pkt. I.3) spadek poziomu  $\alpha$ -tomatyny w owocach *L. esculentum* jest wynikiem degradowania tomatydyny do pregnenolonu. Heftman i Schwiimmer wykazali, że w procesie dojrzewania pomidorów zarówno [ $^{14}\text{C}$ ]tomatydyna jak i [ $^{14}\text{C}$ ] $\alpha$ -tomatyna jest przekształcana do 3 $\beta$ -hydroksy-5 $\alpha$ -pregn-16-en-20-onu [33].

Glikoalkaloidy steroidowe budzą ciągle duże zainteresowanie ze względu na przypisywane im funkcje w obronie chemicznej przed patogenami i/lub roślinożercami, a także z powodu na ciekawe z punktu widzenia medycyny i nauki o żywieniu aktywności biologiczne: hemolityczną, antyacetylocholinoesterazową, fungitoksyczną, antywirusową czy przeciwnowotworową. Wydaje się więc, że jest konieczne obok wyjaśnienia fizjologicznych funkcji tych związków, również wyodrębnienie i szczegółowe poznanie właściwości katalitycznych i molekularnych enzymów zaangażowanych w ich biosyntezę i degradację oraz

mechanizmów kontroli aktywności tych procesów. Pozwoli to w perspektywie wyhodować transgeniczne rośliny charakteryzujące się supresją (lub nadekspresją) odpowiednich genów związanych z biosyntezą i nagromadzeniem SGA. Od sukcesu tego typu badań będzie zależało, z jednej strony zwiększenie odporności roślin na patogeny i szkodniki, a z drugiej wykorzystanie roślin zawierających SGA, między innymi ziemniaka, jako wysokiej jakości pożywienia.

Artykuł otrzymano 4 września 1997 r.  
Zaakceptowano do druku 28 maja 1998 r.

### Piśmiennictwo

- Schreiber K (1968) W: The Alkaloids-Chemistry and Physiology t 10 Manske RHF (red) Academic Press, New York str 1-192
- Schreiber K (1979) W: The Biology and Taxonomy of the Solanaceae Linnean Society Symposium Series 7 Hawkes JG (red) Academic Press, New York str 193-202
- Hegenauer R (1988) *Phytochemistry* 27: 2423-2427
- Vylkonen JPT, Keskitalo M, Vasara T, Pietila L (1996) *Crit Rev Plant Sci* 16: 1-20
- Friedman M, McDonald GM (1997) *Crit Rev Plant Sci* 17: 55-132
- Roddick JG (1987) W: Ecology and Metabolism of Plant Lipids Fuller G Nes WD (red) American Chemical Society, Washington DC str 286-303
- Osman S (1984) W: Isoterpenoids in Plants Biochemistry and Function Nes WD, Fuller G, Tsai L-S (red) Marcel Dekker Inc, New York str 519-530
- Schreiber K (1963) *Die Kulturpflanze* 11: 451-501
- Ahmed SS, Müller K (1978) *Lebens-Wissen Technol* 11: 144-146
- Fitzpatrick TJ, Herb SF, Osman SF, McDermott JA *Am Potato J* 54: 539-544
- Friedman M, Dao L (1992) *J Agric Food Chem* 40: 419-423
- Morris SC, Petermann JB (1985) *Food Chem* 18: 271-282
- Schreiber K (1963) *Die Kulturpflanze* 11: 451-501
- Shih MJ, Kuč J (1974) *Phytochemistry* 13: 997-1000
- Sinden SL, Sanford LL (1981) *Am Potato J* 58: 305-325
- Kuhn R, Löw I (1961) *Chem Ber* 94: 1088-1095
- Kuhn R, Löw I (1961) *Chem Ber* 94: 1095-1103
- Osman SF (1980) W: *Recent Advances in Phytochemistry* t.14 Swain T, Kleinman R (red) Plenum Press, New York str 75-96
- Kuhn R, Löw I (1957) *Chem Ber* 90: 203-218
- Sinden SL, Sanford LL, Deahl KL (1986) *J Agric Food Chem* 34: 372-377
- Schreiber K (1974) *Biochem Soc Trans* 2: 1-25
- Friedman M, Levin CE (1995) *J Agric Food Chem* 43: 1507-1511
- Kozukue N, Kozukue E, Miozuno S (1987) *Hort Science* 22: 294-296
- Bushway RJ (1983) *Am Potato J* 60: 793-797
- Haard N (1977) *J Food Biochem* 1: 57-65
- Lampitt LH, Bushill JH, Rooke HS, Jackson EM (1943) *J Soc chem Ind* 62: 48-51
- Reeve RM, Hautala E, Weaver ML (1969) *Am Potato J* 46: 257
- Wünsch A (1989) *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 12: 69-74
- Uppal DS (1987) *Plant Foods Hum Nutr* 37: 333-340
- Verbist JF, Monnet R (1979) *Potato Res* 22: 239-244
- Zitnak A, Johnston GR (1970) *Am Potato J* 47: 256-260
- Wang SL, Bedford CL, Thompson NR (1972) *Potato Res* 22: 239-244
- Heftman E, Schwimmer S (1972) *Phytochemistry* 11: 2783-2787
- Sander H (1956) *Planta* 47: 374-400
- Roddick JG (1977) *Phytochemistry* 16: 805-817
- Gusjeva AR, Paseshnichenko VV, Borikhima MG (1961) *Biokhimiya* 26: 631-635

37. Ripperger H, Moritz W, Schreiber K (1971) *Phytochemistry* **10**: 2699-2704
38. Tschesche R, Hulpke H (1966) *Z Naturforsch* **21b**: 893-899
39. Tschesche R, Hulpke H (1967) *Z Naturforsch* **22b**: 791-797
40. Heftman E, Lieber ER, Bennet RD (1967) *Phytochemistry* **6**: 225-229
41. Heftman E (1983) *Phytochemistry* **29**: 1843-1860
42. Keneko K, Tanaka MW, Mitsuhashi H (1976) *Phytochemistry* **15**: 1391-1393
43. Heftman E (1984) W: Isopentenoids in Plants. *Biochemistry and Function* Nes WD, Fuller G, Tsai L-S (red) Marcel Dekker Inc, New York str 487-518
44. Tschesche R, Grenneche HR (1980) *Phytochemistry* **19**: 1449-1453
45. Keneko K, Tanaka MW, Mitsuhashi H (1977) *Phytochemistry* **16**: 1247-1251
46. Tschesche R, Goossens B, Töpfer A (1976) *Phytochemistry* **15**: 1387-1390
47. Osman S, Sinden SL, Deahl K, Moreau R (1987) *Phytochemistry* **26**: 3163-3165
48. Liljegren DR (1971) *Phytochemistry* **10**: 3061-3064
49. Lavintman N, Tandecarz J, Cardini CE *Plant Sci Lett* **8**: 65-69
50. Stapleton A, Allen PV, Friedman M, Belknap WR (1991) *J Agric Food Chem* **39**: 1187-1203
51. Zimowski J (1991) *Phytochemistry* **27**: 2743-1831
52. Bergensträhle A, Tillberg E, Jonnson L (1992) *Plant Sci* **84**: 35-44
53. Zimowski J (1992) *Phytochemistry* **31**: 2977-2981
54. Stapleton A, Allen PV, Tao HP, Belknap WR, Friedman M (1992) *Protein Expression and Purification* **3**: 85-92
55. Zimowski J (1997) *Acta Biochim Polon* **44**: 209-214
56. Pączkowski C, Wojciechowski ZA (1994) *Phytochemistry* **35**: 1429-1434
57. Pączkowski C, Kalinowska M, Wojciechowski ZA (1996) W: Saponins Used in Food and Agriculture G.RE. Waller GR, Yamasaki K (red) Plenum Publishing Corp, New York str 47-55
58. Pączkowski C, Kalinowska M, Wojciechowski ZA (1997) *Acta Biochim Polon* **44**: 43-53
59. Zimowski J (1994) *Acta Biochim Polon* **41**: 202-204
60. Zimowski J (1996) W: Saponins Used in Food and Agriculture G.R. Waller GR, Yamasaki K (red) Plenum Publishing Corp, New York str 71-80
61. Zimowski J (1998) *Planata Sc* praca zaakceptowana do druku
62. Moehs CP, Allen PV, Friedman M, Belknap WR (1997) *Plant J* **12**: 101-110
63. Osman SF, Zacharius RM, Naglak D (1980) *Phytochemistry* **19**: 2599-2601
64. Bergensträhle A, Tillberg E, Jonnson L (1992) *J Plant Physiol* **140**: 269-275
65. Bergensträhle A, Tillberg E, Jonnson L (1993) *Physiol Plantarum* **89**: 301-308
66. Gusjeva AR, Paseshnichenko VV (1957) *Biokhimiya* **22**: 843-848
67. Swain AP, Fitzpatrick TJ, Talley EA, Herb SF, Osman SF (1978) *Phytochemistry* **17**: 800-801
68. Bushway AA, Bushway RJ, Kim CH (1990) *Am Potato J* **67**: 233-238
69. Morris SC, Petermann JB (1985) *Food Chem* **18**: 271-282
70. Friedman M, McDonald GM (1995) *J Agric Food Chem* **18**: 271-282
71. Filadelfi MA, Zitnak A (1982) *Phytochemistry* **21**: 250-251
72. Zitniak A, Filadelfi-Koszi MA (1988) *J Food Biochem* **12**: 183-190

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



## Udział endosomu w transmisji sygnału insulinowego

### Role of the endosome in insuling signaling

MARTA BOBESZKO<sup>1</sup>  
JOLANTA BARAŃSKA<sup>2</sup>

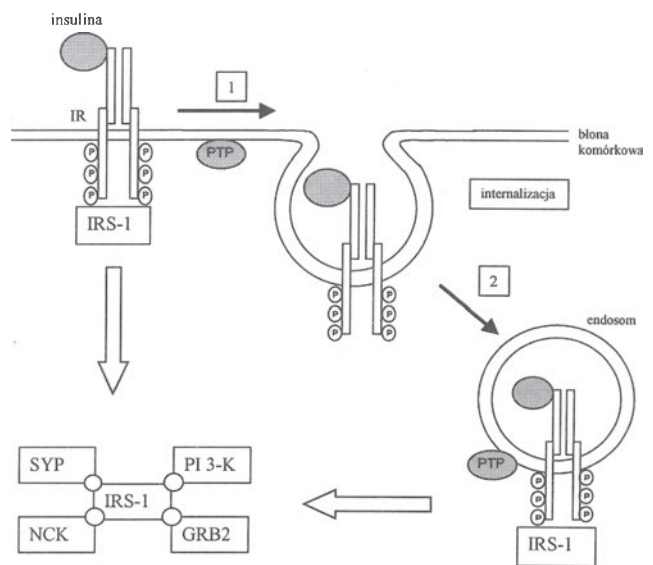
W komórkach eukariotycznych przekazywanie sygnału zewnątrzkomórkowego odbywa się poprzez związanie liganda, pierwotnego przekaźnika sygnału, ze specyficznym receptorem znajdującym się na powierzchni błony komórkowej. Dochodzi wówczas do aktywacji receptora i przekazania wzbudzenia na wtórne przekaźniki sygnału (elementy „down stream signaling”). Pojawia się kaskada sygnałowa w cytoplasmie, wywołująca specyficzne reakcje.

W latach 80-tych stwierdzono, że hormony polipeptydowe, takie jak np. insulina i prolaktyna, oraz czynniki wzrostu, jak np. nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF), wiążą się ze swoim receptorem, a następnie po przekazaniu sygnału taki kompleks ulega endocytozie [1, 2]. Najwięcej badań przeprowadzono na modelach komórek wrażliwych na insulinę, takich jak adipocyty, hepatocyty i komórki mięśniowe [2].

Receptor insuliny (IR) jest heterotetrameryczną glikoproteiną złożoną z dwóch podjednostek  $\alpha$  i dwóch podjednostek  $\beta$ . Zewnątrzkomórkowe podjednostki  $\alpha$  wiążą insulinę, a transbłonowe podjednostki  $\beta$  mają domenę o aktywności kinazy tyrozynowej (IRK). Po związaniu insuliny dochodzi do autofosforylacji podjednostek  $\beta$  na resztach tyrozynowych i aktywacji kinazy tyrozynowej, a następnie przyłączenia głównego cytoplazmatycznego substratu receptora insulinowego — białka IRS-1. Aktywacja tego białka powoduje transmisję sygnału na inne białka cytosolowe, takie jak np. GRB2, SYP, PI 3-K czy NCK (Ryc. 1). Wszystkie one zawierają domenę SH2, poprzez którą wiążą się z białkiem IRS-1. Ich aktywacja zapoczątkowuje różne szlaki przekazywania informacji w komórce, wywołując specyficzne odpowiedzi biologiczne [2].

Liczba receptorów na powierzchni komórek docelowych dla insuliny, tj. komórek wątroby, tkanki tłuszcz-

cowej i mięśni, wynosi około 200 000 na komórkę. W komórkach wątroby sama insulina wiążąc się



Ryc. 1. Udział endosomu w przekazywaniu sygnału insulinowego z czynnego, zaktywowanego receptora (wg Bevan i wsp. [4], rycina zmodyfikowana).

Na schemacie pokazano związanie insuliny z tetramerycznym receptorem (IR) znajdującym się w błonie komórkowej. Receptor zawierający w części cytoplazmatycznej kinazę tyrozynową, po związaniu insuliny ulega autofosforylacji i internalizacji. Internalizacja składa się z etapu: 1) zagęszczenia receptorów w zagłębieniu utworzonym przez część błony komórkowej oplaszczonej przez białko klatrynę (nie pokazana na rysunku) i 2) wnikania pęcherzyków do wnętrza komórki. Powstały, nieopłaszczony klatryną endosom zawiera ufosforylowane podjednostki receptora wyeksponowane na zewnątrz, podczas gdy insulina znajduje się w jego wnętrzu. Zarówno receptory insuliny znajdujące się w błonie komórkowej, jak i te w endosomie mają zdolność do fosforylacji i aktywacji białka IRS-1. Z białka IRS-1 następuje przekazanie sygnału na inne białka cytoplazmatyczne, a mianowicie: białko NCK, fosfatazę tyrozynową 2 (SYP), fosfotydyloinozytylo 3-kinazę (PI 3-K) i białko GRB2, przez które insulina reguluje ekspresję genów zapoczątkowując kaskadę kinaz MAP. (Dla jasności obrazu białko IRS-1 aktywujące wymienione powyżej białka narysowano obok receptora, w istocie jednak białko to nie oddysocjuje od czynnego receptora). Aktywacja IRS-1 przez receptor zachodzi tak długo, jak długo pozostaje on w czynnej, ufosforylowanej formie. Defosforylacja regulująca ten proces zachodzi w wyniku działania fosfatazy fosfotyrozynowej (PTP).

<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> prof. dr hab., Pracownia Przekazników Informacji, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

z receptorami reguluje ich liczbę powodując natychmiastową internalizację zaktywowanych, ufosforylowanych receptorów w kompleksie ze związaną insuliną. Po internalizacji, znajdujące się na zewnątrz powstałych endosomów podjednostki  $\beta$  receptora ulegają defosforylacji w wyniku działania specyficznej fosfotazy fosfotyrozynowej (PTP), co powoduje odszczepienie insuliny. Insulina ulega teraz degradacji, a nieaktywny, nieufosforylowany receptor ulega bądź degradacji, bądź w procesie egzocytozy jest przenoszony z powrotem do błony komórkowej [2]. Dlatego też uważano, i taki pogląd występuje w wielu podręcznikach akademickich, że proces internalizacji służy wyłącznie do dezaktywacji receptora (*down-regulation*) i degradacji związanego z receptorem liganda, jak też do potencjalnego uzupełnienia liczby receptorów na powierzchni komórek na drodze ich recyklicacji [2].

Jednak fakt, że receptor w endosomie, póki nie zostanie zdefosforylowany, występuje w postaci czynnej sugerował, że być może i w tych strukturach bierze on udział w przekazywaniu sygnału hormonalnego. Były to jednak jedynie przypuszczenia. Dopiero badania, opublikowane w roku 1995 przez Bevana i w s p. [3] wykazały po raz pierwszy, że receptor insulinowy w endosomie jest zdolny do transmisji sygnału, aktywacji substratu IRS-1 i wywoływania określonej odpowiedzi metabolicznej komórki. W niniejszym artykule pragniemy omówić te właśnie badania, oraz przedstawić wyniki badań Bevana i w s p. [4] opublikowane w roku 1997. Te bowiem prace, wśród wielu innych ostatnio opublikowanych [5-9], wydają się nam najistotniejsze.

Badania wcześniejsze tej samej grupy badaczy wykazały, że pochodne peroksywanadu (nadtlenki wanadu), w tym anion biperoksy(1,10-fenantrolino)-oksywanadowy (bpV(phen)), zastępuje działanie insuliny aktywując receptory insulinowe i wywołując hypoglikemię [10]. Bevan i w s p. [3] wykazali, że działanie tego związku podawanego szczurowi w różnym czasie przed podaniem insuliny polega na wnikaniu do wnętrza komórki i specyficznym, bezpośrednim hamowaniu fosfatazy PTP związanej z endosomami wątroby. Powodowało to przedłużoną do 45 min. aktywację receptorów insulinowych w tych strukturach. W komórkach wątroby, nawet w nieobecności insuliny, występuje niska, bazalna aktywność kinazy tyrozynowej receptorów insulinowych, będąca wypadkową procesów fosforylacji i defosforylacji [3, 10]. Podanie bpV(phen) zakłóca tę homeostazę i powoduje w efekcie uczynienie receptora.

Wyjaśnienie na czym polega działanie bpV(phen) pozwoliło autorom na wykonanie niezwykle pomysłowych doświadczeń [3]. Szczurowi podawano powyższy związek i w różnym czasie po podaniu uzyskiwano wątrobową frakcję błon plazmatycznych i endosomów. Receptory insulinowe tych struktur poddawano następnie częściowemu oczyszczeniu. Zdolność wiązania insuliny do białka receptorowego mie-

rzono poprzez inkubację z  $^{125}\text{I}$ -insuliną, a miarą aktywności receptorów była ich zdolność do fosforylacji podawanego egzogenego substratu. Wykazano, że aktywacja receptorów insulinowych w endosomach zachodzi szybciej i znacznie przewyższa tę odpowiadającą błonie komórkowej. I tak, aktywacja IRK w endosomach następowała 5 minut wcześniej, a 15 minut po podaniu szczurowi bpV(phen) aktywność IRK w endosomach i błonie plazmatycznej wyrażona była stosunkiem 7:1. Ponieważ używana w doświadczeniach pochodna peroksywanadu działa wyłącznie na PTP związaną z endosomami można było założyć, że w tych warunkach doświadczalnych cała obserwowana aktywność IRK jest pochodzenia endosomalnego, a nieznaczna aktywność znajdująca w błonie plazmatycznej pochodzi z recyklicacji do tej błony aktywnych endosomalnych receptorów. Hipotezę tę sprawdzono podając zwierzęciu kolchicynę, a następnie dopiero bpV(phen). Kolchicina, będąc inhibitorem białek cytoszkieletu, wstrzymuje recyklicację receptora z endosomu do błony plazmatycznej. Istotnie, w tego typu doświadczeniach obserwowano wyłącznie aktywację receptorów w endosomach. Uzyskano zatem unikalny model doświadczalny, w którym w warunkach *in vivo* można było badać właściwości receptorów w endosomach, z wyłączeniem tych znajdujących się w błonie plazmatycznej [3]. Wykazano, że wraz z ich aktywacją w cytosolu wątroby pojawia się ufosforylowany substrat receptorów insulinowych, białko IRS-1, a także, że traktowanie szczurów kolchicyną i pochodną peroksywanadu indukuje u tych zwierząt hypoglikemię. Bevan i w s p. [3] udowodnili zatem w sposób niebudzący wątpliwości, że aktywne receptory insulinowe w endosomach oddziałują nie tylko z egzogenym lecz i endogenym substratem, a więc są zdolne do przekazywania sygnału insulinowego i wywoływania specyficznej odpowiedzi biologicznej.

Dalsze badania potwierdziły słuszność powyższych wniosków [4-9]. Na uwagę zasługuje praca Bevana i w s p. [4], w której badano *in vivo* wpływ związku hamującego dysocjację i degradację insuliny w receptorach endosomów, a mianowicie leku przeciwmalarycznego — chlorokwininy. Lek ten podawano szczurowi przed podaniem insuliny. Związek ten nie powodował żadnych widocznych zmian w wiązaniu insuliny do receptorów występujących w błonie komórkowej, nie następowało zwiększenie ich fosforylacji, czy aktywności kinazy, podczas gdy w endosomie ilość receptorów związanych z insuliną i aktywność kinazy tyrozynowej zwiększała się. U zwierząt kontrolnych, które otrzymywały samą insulinę, 5 min. po jej podaniu ilość receptorów w endosomach wątroby podwajała się, a po 18 minutach wracała do normy. Także w podobnym czasie wzrastała i wracała do stanu początkowego aktywność IRK wobec egzogenych substratów [4]. Należy dodać, że porównanie aktywności IRK w błonie plazmatycznej i endosomach (w 2 minuty po podaniu samej insuliny) wykazywało duże podobieństwo

wo [3]. Kiedy zwierzę dostawało przed insuliną chlo-  
rokwininę, w endosomach wątroby następował wzrost  
ilości receptorów o 31%, oraz zwiększenie aktywności  
kinazy tyrozynowej aż o 96%, w stosunku do wartości  
kontrolnych [4]. Jednocześnie, wraz ze wzrostem  
aktywności endosomalnego IRK obserwowano zwięks-  
zoną aktywność substratu IRS-1 i pojawienie się  
zwiększonej ilości ufosforylowanych białek w cytosolu  
(*down stream signaling*) [4].

Te wszystkie dane pozwoliły autorom na wysunięcie  
wniosku, że w przypadku receptorów insulinowych  
w wątrobie ich internalizacja i występowanie w postaci  
zagęszczonej w endosomie odgrywa niezwykle ważną  
rolę w procesie przekazywania sygnału [4]. Uważają  
endosom jako istotne miejsce w komórce (wg autorów  
— centralne), z którego następuje proces przekazywa-  
nia informacji, najpierw na substrat IRS-1, a potem  
dalej na inne białka sygnałowe (Ryc. 1). Proces ten jest  
regulowany przez związaną z endosomem fosfotazę  
fosfotyrozynową. Należałoby zatem przyjąć, że recep-  
tor związany z insuliną w błonie plazmatycznej, po  
aktywacji i autofosforylacji kinazy tyrozynowej, prze-  
kazuje bądź sygnał na substrat znajdujący się w blisko-  
ści błony, bądź ulega od razu internalizacji i znajdując  
się w endosomie ma możliwość dotarcia do odległych  
od błony plazmatycznej rejonów komórki i inicjowa-  
nia w nich transdukcji sygnału insulinowego (Ryc. 1).  
Należy dodać, że istnieją poszlaki pozwalające sądzić,  
że podobny proces występuje w przypadku receptorów  
związanych z EGF, o których również wiadomo, że  
ulegają internalizacji [11]. Internalizacji ulega także  
kompleks insulina/receptor w adipocytach i komór-  
kach mięśni [10].

Bez względu jednak na to jakie rozmiary osiągnię-  
cia na temat internalizacji receptorów zawierają-  
cych kinazę tyrozynową, już obecne, podane powyżej  
informacje zmieniają nasz dotychczasowy pogląd na  
mechanizm transmisji sygnału w komórce. Pokazują,  
że nie zawsze błona komórkowa, jako bariera od-  
graniczająca komórkę od przestrzeni pozakomórko-  
wych, lecz znacznie bardziej skomplikowany mecha-  
nizm powodujący wnikanie fragmentów tej błony do  
wnętrza komórki może niejednokrotnie odpowiadać  
za szlaki przekazywania informacji i odpowiedź meta-  
boliczną. Wydaje się bardzo istotne, że mechanizm ten  
pozwala na współdziałanie czynnego receptora z róż-  
nymi, znacznie nieraz odległymi od błony, kompart-  
mentami komórki.

*Artykuł otrzymano 19 marca 1998 r.*

*Zaakceptowano do druku 23 kwietnia 1998 r.*

## Piśmiennictwo

1. Davies PJA, Devies DR, Levitzky A, Maxfield FR, Milhaud P, Willingham MC, Pastan IH (1980) *Nature* (Lond) **283**: 162-167

2. Konarska L, Porembka Z W: „Molekularne mechani-  
zmy przekazywania sygnałów w komórce” (red. L. Konarska)  
PWN, Warszawa, 1995, str. 77-104
3. Bevan AP, Burgess JW, Drake PG, Shaver A,  
Bergeron JJM, Posner BI (1995) *J Biol Chem* **270**:  
10784-10791
4. Bevan AP, Krook A, Tikerpae J, Seabright PJ,  
Siddle K, Smith GD (1997) *J Biol Chem* **272**: 26833-26840
5. Bevan AP, Christensen JR, Tikerpae J, Smith  
GD (1995) *Biochem J* **311**: 787-795
6. Bevan AP, Drake PG, Yale J-F, Shaver A, Po-  
sner BI (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 49-58
7. Drake PG, Bevan AP, Burgess JW, Bergeron  
JJM, Posner BI (1996) *Endocrinology* **137**: 4960-4968
8. Bevan AP, Drake PG, Bergeron JJM, Posner BI  
(1996) *Trends Endocrinol Metab* **7**: 13-21
9. Bevan AP, Smith GD (1997) *Biochem Soc Trans* **25**: 462S
10. Posner BI, Faure R, Burgess JW, Bevan AP,  
Lachance D, Zhang-Sun G, Fantus IG, Ng JB,  
Hall DA, Lum BS, Shaver A (1994) *J Biol Chem* **269**:  
4596-4604
11. Khan MN, Lai WH, Burgess JW, Posner BI,  
Bergeron JJM (1993) *Subcell Biochem* **19**: 223-254

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

Minęły kolejne dwa lata i w Szczecinie ponownie spotkali się badacze zainteresowani naukowo problematyką metabolizmu i toksykologią fluoru. W dniach 23-24 kwietnia 1998 r. na terenie Pomorskiej Akademii Medycznej odbyło się VIII Sympozjum Fluorowe pt.

## „Fluor i biopierwiastki w biologii i medycynie”

Wzorem lat ubiegłych Sympozjum zostało zorganizowane dzięki współpracy kadry naukowo-dydaktycznej Zakładu Biochemii i Chemii PAM oraz członków szczecińskich oddziałów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i podkomisji nauk chemicznych PAN.

W Sympozjum wzięli udział badacze reprezentujący różne dyscypliny naukowe i wszystkie większe ośrodki akademickie w Polsce. Obok biochemików prace przedstawili lekarze, biologowie, chemicy, farmaceuci, rolnicy, technolodzy, toksykolodzy i specjaliści z zakresu ochrony środowiska. W czasie obrad wygłoszono 5 referatów i 32 streszczenia prac doświadczalnych. Prace w pełnej wersji, wykonane przez 77 autorów, po recenzji i korektach, zostały opublikowane w ósmej edycji wydawnictwa *Metabolizm Fluoru '98*, objętego patronatem JM Rektora PAM, wydanego w nakładzie 120 egzemplarzy, w oparciu o środki finansowe uzyskane z Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej oraz od firmy Perkin-Elmer. Tematyka opublikowanych prac koncentruje się wokół zagadnień określonych tytułem Sympozjum i w szczególności dotyczy badań w dziedzinie metabolizmu podstawowego, metabolizmu kości i zębów, enzymologii, toksykologii i analityki związków fluoru. Wydawnictwo jest dostępne w bibliotekach naukowych wszystkich Akademii Medycznych, większości bibliotek uniwersyteckich oraz w Bibliotece Narodowej.

Liczba oraz wysoki poziom przedstawionych prac jest, zdaniem organizatorów, oznaką ciągłego postępu w dziedzinie badań nad metabolizmem i toksykologią fluoru w Polsce i jednocześnie zwiastunem następnych, równie wartościowych, wystąpień tym razem w czasie XXIII Światowej Konferencji Międzynarodowego Towarzystwa Badań Fluorków (ISFR – *International Society for Fluoride Research*), która odbędzie się w Szczecinie i Krakowie w dniach 11–16 czerwca 2000 r.

W trakcie obrad podjęta została decyzja o powołaniu Polskiego Towarzystwa Fluorowego. Siedziba Zarządu w I kadencji znajdowała się będzie w Szczecinie.

*Dr chem. Tadeusz Ogoński  
Przewodniczący szczecińskiego  
oddziału PTBioch.*

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

# Recenzja książki

## Review of a book

Uwagi i refleksje na temat niektórych rozdziałów podręcznika, pt. „Diagnostyka Laboratoryjna z Elementami Biochemii Klinicznej”, pod redakcją: prof. dr hab. Aldony Dembińskiej-Kieć i prof. dr hab. Jerzego W. Naskalskiego, VOLUMED, Wrocław, 1998

Na początku bieżącego roku, na rynku księgarskim, pojawił się nowy podręcznik pod interesującym tytułem „Diagnostyka Laboratoryjna z Elementami Biochemii Klinicznej”. Duże zapotrzebowanie na nowoczesny podręcznik z tej dziedziny medycyny, budzący zaufanie zespół autorski, wielki autorytet uczelni w której powstał, pompatyczny wstęp, wskazujący na niezwykle wiarygodne i nowoczesne źródła prezentowanej w nim wiedzy oraz ciekawa szata graficzna sprawiły, iż wymienione dzieło (pomimo wysokiej ceny) niemal natychmiast znikło z półek księgarskich. Należę do tych, którzy jako pierwsi nabyli wspomnianą książkę i zapoznali się z jej treścią. Wielodyscyplinarny charakter poruszanych tam zagadnień nie pozwala mi na kompleksową ocenę całego podręcznika, dlatego moje uwagi i refleksje koncentrują się niemal wyłącznie wokół zagadnień biochemicznych. Po bezowocnej wymianie korespondencji z redaktorami (równocześnie współautorami), recenzentem i wydawcą postanowiłem podzielić się moimi smutnymi przemyśleniami z czytelnikami *Postępów Biochemii*.

**I. Uwagi ogólne.** Z przykrością stwierdzam, iż rozdziały podręcznika poświęcone biochemii klinicznej i zagadnieniom pokrewnym, obfitują w liczne, niekiedy wręcz niewiarygodne błędy merytoryczne i językowe. Niektóre z nich urągają elementarnej wiedzy biochemicznej i ogólnolekarskiej. Autorzy posługują się niekiedy anachroniczną, często błędną terminologią, której student po odbyciu kursu biochemii, po prostu nie zna. Nie potrafią poprawnie nazwać podstawowych procesów metabolicznych, głównych metabolitów i enzymów, zdefiniować podstawowych pojęć, etc. Podręcznik ten jest źródłem dezinformacji. Wprowadza zamęt w głowie czytelnika i niweczy niemały przecież wysiłek, włożony w nauczanie studentów biochemii, fizjologii, patofizjologii, a nawet przedmiotów klinicznych. Przyswojenie przez lekarza niektórych (wymienionych w uwagach szczegółowych) elementów tej „wiedzy” zagraża życiu i zdrowiu ludzkiemu.

**II. Uwagi szczegółowe.** Bezmiar błędów i wąskie ramy niniejszego opracowania pozwalają mi jedynie na wymienienie szczególnie rażących uchybień, które dyskwalifikują cały podręcznik.

Autorzy utożsamiają ciężar właściwy z gęstością względną, syntazy z syntetazami, glukokinazę z glukozo-6-fosfatazą, keratynę z kreatyniną, izomery z izoenzymami, wodorowęglany z węglowodanami. Przekonują, iż w układzie naczyniowym krąży surowica. Uważają osocze za mieszaninę surowicy z fibrynogenem. Zapewniają, iż istnieje fosforan kreatyniny, który uczestniczy w fosforylacji ADP do ATP. Uczą, iż kreatyna powstaje z argininy lub glicyny. Odłączanie jodu od hormonów tarczycowych uważają za dejonizację, a NADH za enzym. Adrenalinie przypisują nowy wzór strukturalny (Ryc. 17.4). Rozpad wiązań amidowych w glutaminy nazywają „dezaminacją”. ACTH, niewielkiemu peptydowi, złożonemu z 39 reszt aminokwasowych, przypisują masę cząsteczkową 39 kDa. Uważają, iż istnieje enzym o nazwie fruktozo-1,5 difosfataza oraz hormony o nazwie monojodotyrozyna i dijonotyrozyna. Twierdzą, iż XIII czynnik krzepnięcia jest transglutaminazą i przenosi grupę aminową glutaminy na lizynę. Flawoproteiny uważają za białka hemowe. Twierdzą, że połowa enzymów i kofaktorów cyklu Krebsa zawiera żelazo. Uważają, że istnieje ferrytyna krążąca w nie istniejącej w organizmie surowicy krwi. Ferrytyna ta wiąże do 250 atomów żelaza, a 1 g żelaza wiąże do 2500 atomów tego pierwiastka.

Nauczają, iż międzynarodowa jednostka enzymatyczna i katal są jednostkami ilości enzymu, amoniak jest produktem końcowym metabolizmu aminokwasów w cyklu mocznikowym, kwasy tłuszczowe są substratami w procesie glukoneogenezy a mleczan, alanina i glicerol są zapasowymi materiałami energetycznymi.

Uważają insulinę za transporter glukozy. Informują, iż w wyniku deaminacji guaniny powstaje hipoksanina. Zapewniają, iż jednym z produktów reakcji aldolazowej jest „trójfosforan gliceroaldehydu”. Rozkład AMP ma być dziełem nie istniejącego enzymu 5' nukleozydazy. Przekonują, iż istnieje związek o wzorze  $HPO_4$  oraz jon o wzorze  $PO_4^{2-}$ . Przedstawiają zupełnie niezrozumiały schemat rozpadu glikogenu do glukozy + 2

ADP + 2 HPO<sub>4</sub> oraz rozpadu glukozy do 2 cząsteczek mleczanu + 2H<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O (Ryc. 10.2). Z tej samej ryciny uważny czytelnik dowie się, iż istnieją nukleozydy guanozynowe (sama guanozyna jest nukleozydem), natomiast koenzym A<sub>2</sub>, mioglobina, troponina, tropomiozyna i łańcuch lekki miozyny są nukleotydami adeninowymi (Ryc. 10.2). W wyniku rozpadu AMP i GMP do odpowiednich nukleozydów uwalnia się tajemnicza substancja o wzorze P<sub>3</sub>. Dowiedzieć się można, iż NMN, powstały z rozpadu NAD<sup>+</sup>, jest rybozydem amidu kwasu nikotynowego.

Proponuję pomiar aktywności disacharydazy poprzez ocenę ilości zhydrolizowanego enzymu, natomiast aktywności laktazy poprzez podanie choremu znakowanej (radioaktywnej?) laktozy i ocenę ilości wydychanego H<sub>2</sub>.

Ryc. 11.11, 11.12 i 11.13, legendy do tych rycin oraz opisy zawarte w tekście to zbiór sprzeczności i fałszywych informacji. Niektóre z nich brzmią wręcz humorystycznie. Oto jedno z nich: „jon wodorowy jest wydalany z moczem w postaci wolnej (śladowe ilości, oznaczane jako pH nich): „jon wodorowy jest wydalany z moczem w postaci wolnej (śladowe ilości, oznaczane jako pH moczu), w postaci kwaśności miareczkowej i amoniaku”. Z ryciny 11.12 i 11.13 wynika natomiast, iż jony wodorowe wydala się w postaci NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i amonowych. Wodorowęglan po przejściu przez błonę komórki nabłonka nerkowego ulega przedziwnej metamorfozie. Staje się węglowodanem.

Przerażającej informacji dostarcza opis testu Hama na str. 348. Czytelnik dowiaduje się, iż pH (krwi) około 6,7 to łagodna kwasica. A przecież jest to stan głębokiej kwasicy, pH 6,7 to wartość letalna. Przyniesienie przez lekarza tej „wiedzy” zagraża życiu ludzkiemu.

Opis ciężaru właściwego moczu na str. 226 to zbiór nonsensownych, wzajemnie sprzecznych informacji. Oby nie trafił do świadomości lekarza i nie wyrządził krzywdy choremu. Jak wynika z rozważań Autorów ciężar właściwy moczu zdrowych ludzi waha się od 1,001 do 1,035 g/ml. Gdyby tę dolną wartość przyjąć za prawdziwą, mocz zdrowego człowieka miałby ciężar właściwy niższy od moczu chorego z izostenurią, niższy niż ciężar właściwy odbiałzonego osocza. Mocz pierwotny musiałby być nie zagęszczany (jak uczy fizjologia) lecz rozcieńczany. Humorystycznie brzmi informacja, iż ciężar właściwy odbiałzonego osocza wynosi 1010-1012 g/ml.

Smutnymi refleksjami napawa moja korespondencja z redaktorami (współautorami) i wydawcą. Żadnego poczucia winy. Moje uwagi to osobista napaść, szczególnie na jednego ze współredaktorów (i współautorów). Głównym winowajcą jest komputer, chociaż nie jest on wymieniany wśród autorów. Większość kontrargumentów nie zasługuje na polemikę.

**III. Wnioski.** Uważam, iż podręcznik w jego obecnym kształcie, nie powinien być polecany nikomu, jako źródło rzetelnej wiedzy. Nie przeczę iż pewne jego fragmenty mogą być wartościowe, ale skąd wiadomo, którym informacjom można zaufać? Wyrządza on krzywdę przede wszystkim nauczycielom akademickim — nauczającym biochemii, których wysiłek dydaktyczny został zmarnotrawiony, nieświadomym studentom — bezgranicznie ufającym informacjom podręcznikowym oraz analitykom-praktykom, którzy nawet nie podejrzewają, iż nowoczesny podręcznik wprowadza ich w błąd i to w sprawach fundamentalnych dla ich specjalności. Dzieło to powinno być wycofane z bibliotek, a nieświadomi nabywcy powinni uzyskać zwrot kwoty wydanej na jego zakup.

*Prof. dr hab. n. med. Edward Bańkowski*

P.S. Zespół autorski podręcznika kandyduje do nagrody Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej.  
Z pewnością ją otrzyma.

### *Badawcze Laboratoria Usługowe Uniwersytetu Jagiellońskiego*

**Szanowni Państwo,**

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

**Oferujemy nasze usługi w zakresie:**

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

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

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

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

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

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



# Krajowa Nagroda Naukowa z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego

Rada Naukowa Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu ustanowiła Krajową Nagrodę Naukową z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego.

Ideą nagrody jest wyróżnianie młodych naukowców zajmujących się genetyką roślin i promowanie osiągnięć będących rezultatem badań prowadzonych w warunkach krajowych laboratoriów.

Nagroda przyznawana jest od 1994 roku corocznie, przez Kapitułę Nagrody, za oryginalne prace badawcze udokumentowane publikacją w krajowym lub zagranicznym czasopiśmie w okresie ostatnich trzech lat, dotychczas nienagradzane.

**W roku 1998 Kapituła przyznała:  
nagrodę I stopnia — dr ANNIE CHACHULSKIEJ  
(Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa) za „Twórczy  
wkład w wirusologię molekularną roślin”.**

Sponsorami funduszu nagród byli: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Radzików, Hodowla Roślin „Danko” – Choryń, Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o. – Tulce k/Poznania oraz Krakowska Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze „Polan” Sp. z o.o. – Kraków.





**Pokwitowanie dla wpłacającego**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

**Odcinek dla posiadacza rachunku**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

**Odcinek dla poczty lub banku**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego



**Pokwitowanie dla wpłacającego**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

**Odcinek dla posiadacza rachunku**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

**Odcinek dla poczty lub banku**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

Prenumerata POSTĘPÓW  
BIOCHEMII rok 1998  
dla nie zrzeszonych w PTBioch 30 zł  
dla członków PTBioch 15 zł  
dla instytucji 60 zł

Składka P.T.Bioch.  
za rok 1998 20,— zł  
studenci 7,— zł

# 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.

**PIŚMIENICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9—26]. 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” (ołówek, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

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

