

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 43, NR 3, 1997

Jak funkcjonuje miozyna	134
Rola łańcuchów lekkich miozyny .	143
Dystrofia miotoniczna.	151
Proteoglikany — struktura i funkcje	158
Komunikat Komisji Słownictwa .	173
Geny otyłości	174
Terminacja transkrypcji bakteryjnej	182
Wyspy CpG — niezmetylowane odcinki DNA w genach kręgowców .	189
Metabolizm fosforanów 8-oxodG .	199
Elektroforeza kapilarna: narzędzie analizy biomolekuł	208
Uczmy biochemii poprawnie . . .	216
Sprawozdania	218

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

<http://rcin.org.pl>

Jak funkcjonuje miozyna

How Myosin Works

ANDRZEJ A. KASPRZAK 134

Wpływ łańcuchów lekkich miozyny na jej funkcjonowanie

The influence of myosin light chains on its work

RENATA DĄBROWSKA, DARIUSZ STĘPKOWSKI 143

Dystrofia miotoniczna — mutacja dynamiczna i patogeneza choroby

Myotonic dystrophy — dynamic mutation and the disease pathogenesis

ŁUKASZ HUMINIECKI, RYSZARD SŁOMSKI 151

Proteoglikany — struktura i funkcje

Proteoglycans — structure and functions

EWA M. KOŻMA, ANDRZEJ GŁOWACKI, KRYSZYNA OLCZYK, MAGDALENA JAŻWIEC 158

Komunikat Komisji Słownictwa

Report of the Nomenclature Commission 173

Geny otyłości

Obesity genes

JULIAN ŚWIERCZYŃSKI, ZDZISŁAW KOCHAN, JOANNA KARBOWSKA 174

Terminacja transkrypcji bakteryjnej

Transcription termination in bacteria

KRYSZYNA I. WOLSKA 182

Wyspy CpG — niezmetylowane odcinki DNA w genach kręgowców

CpG islands — the unmethylated fragments of DNA in vertebrate genome

GRZEGORZ IRA 189

Metabolizm fosforanowych pochodnych 8-oxo-2-deoksyguanozyny

Metabolism of 8-oxo-2-deoxyguanosine phosphates

KAROL BIAŁKOWSKI, RYSZARD OLIŃSKI 199

Elektroforeza kapilarna: nowe narzędzie analizy biomolekuł

Capillary electrophoresis: a new tool for biomolecules separation

PIOTR MUCHA, PIOTR REKOWSKI, AGNIESZKA SZYK, GOTFRYD KUPRYSZEWSKI, JAN BARCISZEWSKI 208

Uczmy biochemii poprawnie: ponadtlenek, dysmutaza ponadtlenkowa

GRZEGORZ BARTOSZ 216

Sprawozdania

Reports 218

WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
IWONA FIJAŁKOWSKA
tel. 658-44-99 w. 1123
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 813-05-15
HANNA LASKOWSKA
pon. i czw. 14-16
tel. 659-85-71 w. 441

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
JERZY BAL
(Warszawa)
JAN BARCISZEWSKI
(Poznań)
JAN FRONK
(Warszawa)
ANDRZEJ GINDZIENSKI
(Białystok)
MONIKA HRYNIEWICZ
(Warszawa)
ANNA JAKUBIEC-PUKA
(Warszawa)
IRENA KĄKOL
(Warszawa)
CEZARY PĄCZKOWSKI
(Warszawa)
HANNA STRZELECKA-
GOŁASZEWSKA
(Warszawa)
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 14⁰⁰-16⁰⁰
fax (22) 22-53-42
e-mail: postepy @ nencki.gov.pl.

Jak funkcjonuje miozyna

How Myosin Works

ANDRZEJ A. KASPRZAK*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Argumenty za i przeciw zmianie orientacji domeny łańcuchów lekkich miozyny
- III. Podobieństwa kinezy i miozyny
- IV. Mechanizm generacji siły przez miozynę

Contents:

- I. Introduction
- II. Arguments for and against a change in orientation of the light chain binding domain of myosin
- III. Similarities between kinesin and myosin
- IV. Mechanism of force generation by myosin

Wykaz stosowanych skrótów: *ncd* — (ang. *non-claret dysjunctional*), produkt genu *ncd*, białko z nadrodziny kinezy, które porusza się na mikrotubuli w kierunku (-), tj. w kierunku przeciwnym do kinezy; S1 — subfragment 1 miozyny; FRET — rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji; EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny; SH1 — reaktywna grupa tiolowa cysteiny 707 w miozynie; SH2 — reaktywna grupa tiolowa cysteiny 697 w miozynie; P_i — ortofosforan; V_i — ortowanadan.

wany w zeszłym roku w *Postębach Biochemii* artykuł Strzeleckiej-Gołaszewskiej [7].

Generacja siły przez aktomiozynę zachodzi podczas oddziaływania główki miozyny, określanej mianem subfragmentu S1 miozyny (w skrócie S1), z filamentem aktyny. Częsteczką miozyny „konwencjonalnej”¹ składa się z dwóch łańcuchów ciężkich o masie cząsteczkowej 230 kDa i dwóch par łańcuchów lekkich o masie cząsteczkowej ok. 20 kDa każdy (Ryc. 1). Główka miozyny (S1) obejmuje ok. 840 N-końcowych aminokwasów łańcucha ciężkiego miozyny i jedną parę łańcuchów lekkich. W subfragmencie 1 wyróżnić można dwie domeny strukturalne²; domenę katalityczną, zwaną także domeną motoryczną [10], która ma kształt elipsoidalny i wymiary 90 × 45 × 60 Å. Domena ta zawiera miejsce wiązania i hydrolizy ATP oraz miejsce wiązania aktyny. Drugim elementem strukturalnym S1 jest domena łańcuchów lekkich, zwana także domeną regulatorową, która jest długą α-helisą (≈ 85 Å), niekowalencyjnie wiążącą dwa łańcuchy lekkie miozyny: łańcuch regulujący i łańcuch istotny (Ryc. 1). Helisa ta ma niewiele punktów kontaktowych z domeną katalityczną, co umożliwia jej rotację, bez konieczności znacznych przegrupowań strukturalnych w pozostałej części S1. Jednym z największych dylema-

I. Wstęp

Jednym z problemów, które najdłużej opierają się biochemikom jest mechanizm konwersji energii hydrolizy ATP w ruch. Problem ten, z początku rozpatrywany wyłącznie w związku ze skurczem mięśnia szkieletowego, okazał się bardziej ogólny. W komórkach ssaków występuje ponad 100 genów, których produkty określić można mianem motorów molekularnych. Istnieje wiele hipotez odnośnie sposobu w jaki siła (ruch) są generowane. Jednakże dopiero określenie struktur krystalograficznych miozyny i dwóch podobnych do siebie białek: kinezy i białko *ncd* pozwoliło na sformułowanie bardziej precyzyjnych i, co ważniejsze, doświadczalnie sprawdzalnych hipotez generacji ruchu przez motory molekularne. Na ten temat ukazało się wiele publikacji przeglądowych: Blocka [1], Goldmana [2], Vale'a [3], Howarda [4], Raymenta [5] i Holmesa [6]. Dla polskiego czytelnika najlepsze wprowadzenie stanowi opubliko-

¹ Określenie to odnosi się do wszystkich izoform miozyny występujących w komórkach mięśniowych oraz do homologicznych miozyn dwugłówkowych w komórkach mięśniowych.

² Tych domen strukturalnych nie należy mylić z trzema fragmentami proteolitycznymi: 26, 50 i 20 kDa otrzymywanymi na drodze trawienia S1 trypsyną. Fragmenty te nie są domentami strukturalnymi [8], jak to kiedyś proponowano [9].

*Dr inż., Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, B.P. 5051, 1919 Route de Mende, 34033 Montpellier Cédex Francja. E-mail: aak@xerxes.crbsm.cnrs-mop.fr

tów, a także źródłem wielu rozczarowań, były niepowodzenia prób wykazania dużych zmian strukturalnych w domenie katalitycznej, zarówno podczas wiązania ATP jak i generacji siły. Tymczasem wielkość „kroku roboczego” (ang. *step size*) miozyny, tj. odległość o jaką przesuwa się główka podczas hydrolizy jednej cząsteczki ATP, wynosi ok. 40-120 Å [11-13]. Aby wyjaśnić w jaki sposób izomeryzacja kompleksu S1·ADP, towarzysząca uwolnieniu ortofosforanu z główki miozyny i uważana za etap generacji siły [2, 14, 15], powoduje tak duże przesunięcie główki, zaproponowano, że miozyna wykorzystuje jedną ze znanych człowiekowi maszyn prostych, a mianowicie dźwignię. Małe zmiany konformacyjne w okolicy centrum aktywnego ulegają wzmocnieniu przez obrót domeny łańcuchów lekkich. Powoduje to, w rezultacie, przemieszczanie się końca domeny łańcuchów lekkich o odległości porównywalne z doświadczalnie zmierzoną wielkością kroku roboczego. Podczas tych obrotów domena katalityczna pozostaje prawie nieruchoma (Ryc. 2).

Wiązanie nukleotydów przez S1 powoduje szereg niewielkich zmian konformacyjnych prawie we wszystkich częściach domeny katalitycznej. Najłatwiejsze do zauważenia zmiany zachodzą w obszarze kontaktu z aktyną, co wiąże się z obniżeniem powinowactwa S1 do aktyny o 5 rzędów wielkości w obecności ATP [16, 17]. W obecności nukleotydów obserwowano także zmiany ruchliwości Cys-707 (SH1) (Ryc. 1), która nie jest częścią centrum aktywnego, jak również zmiany reaktywności obu reaktywnych grup tiolowych miozyny: wymienionej już Cys-707 (SH1) i Cys-697 (SH2) [18, 19]. Użycie dwufunkcyjnych odczynników pokazało, że odległość pomiędzy Cys-697 i Cys-707 wynosi 14 Å w nieobecności nukleotydów [18, 19], ale w obecności MgADP może maleć do wartości ok. 2 Å [20]. Kowalencyjne połączenie tych dwóch grup tiolowych prowadzi w rezultacie do zablokowania nukleotydu i towarzyszącego mu kationu w centrum aktywnym [21]. Podobny efekt ma połączenie SH2 z Cys-540 [22]. Odległość pomiędzy peptydem komplementarnym („antypeptydem”) przyłączonym do pętli 677-688 ciężkiego łańcucha S1, wchodzącej w skład miejsca kontaktowego miozyny z aktyną i grupą SH2 zwiększa się o ~6.7 Å w obecności ATP [23]. Nukleotydy mają także wpływ na szybkość trawienia za pomocą trypsyny dwóch pętli łączących proteolityczne fragmenty ciężkiego łańcucha S1: „pętli 1”, która łączy fragmenty 25 i 50 kDa, oraz „pętli 2”, która łączy fragmenty 50 i 20 kDa [24, 25].

Na konformację S1 wpływa również aktyna, obniżając powinowactwo S1 do nukleotydów, zmieniając reaktywność obu reszt cysteinowych [19], i chroniąc przed proteolizą pętle 1 i 2 [24, 26]. Jest interesujące, że przecięcie ciężkiego łańcucha S1 pomiędzy Lys-561 i Ser-562 przy użyciu trombiny obniża powinowactwo S1 do aktyny 250-razy w nieobecności nukleotydów, a także w obecności ADP, podczas gdy stała wiązania

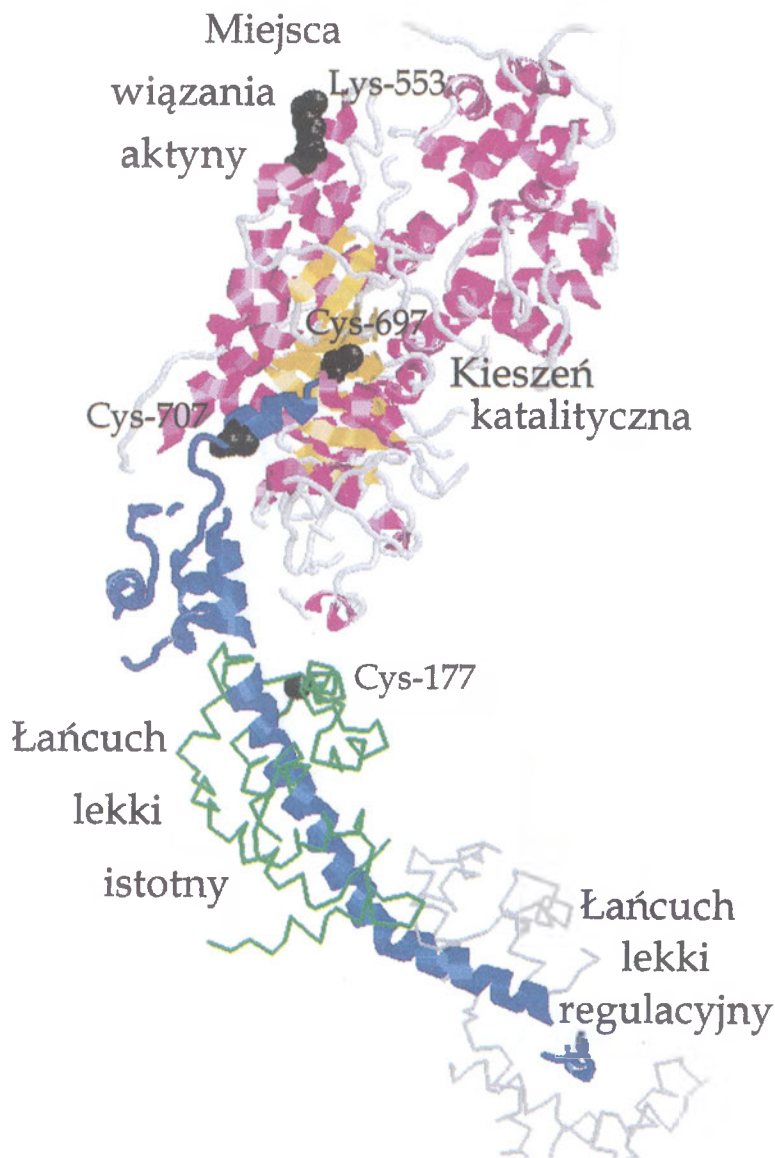
S1 do aktyny w obecności MgATP nie uległa zmianie [27]. Mimo, iż wiązanie zarówno nukleotydów i aktyny wpływa na prawie wszystkie części domeny katalitycznej S1, każde z tych zaburzeń może być wytłumaczone zmianami strukturalnymi, których amplituda nie przekracza kilku angstromów.

Z uwagi na nietrwałość, kompleks S1·ADP·P_i nie może być badany metodami krystalograficznymi. Jednakże miozyna tworzy stabilne związki z ADP i ortowanadanem lub fluorkami berylu i glinu. Kompleksy te mogą być badane za pomocą metod krystalograficznych i spektroskopowych. Struktura krystalograficzna domeny katalitycznej miozyny ameby *Dictyostelium discoideum* w kompleksie z ADP i BeF_x prawie nie różni się od struktury tej domeny w S1 miozyny mięśniowej w nieobecności nukleotydu [28]. W kompleksie z ADP i AlF₄ występują przesunięcia rzędu 5 Å, szczególnie w obrębie reaktywnych reszt tiolowych [28]. Z kolei w kompleksie z ADP i V_i występują bardzo duże przesunięcia położenia całych fragmentów strukturalnych w rejonie dwóch reaktywnych reszt cysteinowych [29]. Uważa się, że strukturalne różnice charakteryzują różne stany przejściowe enzymu w trakcie hydrolizy ATP: zgodnie z wcześniejszymi badaniami biochemicznymi, strukturę kompleksów z ADP i BeF_x oraz z pirofosforanem uznano za zbliżoną do struktury S1·ATP, natomiast kompleksy z ADP i AlF₄ lub V_i uznano za analogi S1·ADP·P_i [28]. Duże zmiany w C-końcowym fragmencie domeny katalitycznej (wokół reaktywnych reszt cysteinowych) pod wpływem ADP i V_i mogą być jednak artefaktem, spowodowanym brakiem domeny łańcuchów lekkich, która prawdopodobnie stabilizuje C-końcowy fragment domeny katalitycznej [29], jak również obecnością polimerycznych form wanadanu [30, 31].

W sumie można przyjąć, że obecność i hydroliza ATP w centrum aktywnym miozyny oraz oddziaływanie tej ostatniej z aktyną prowadzą do umiarkowanych zmian strukturalnych w domenie katalitycznej. Czy i w jaki sposób zmiany te ulegają wzmocnieniu? Mimo, iż nie ma bezpośrednich i jednoznacznych dowodów na znaczącą zmianę orientacji domeny łańcuchów lekkich w stanie ADP·P_i lub podczas generacji ruchu, istnieje wiele wskazań potwierdzających teorię dźwigni.

II. Argumenty za i przeciw zmianie orientacji domeny łańcuchów lekkich

Posługując się mikroskopią elektronową Milligan i wsp. [32-34] dokonali trójwymiarowej rekonstrukcji filamentu aktyny „udekorowanego” S1. Po dodaniu ADP, zaobserwowali oni różnicę w położeniu domeny łańcuchów lekkich względem filamentu aktyny w przypadku użycia S1 miozyny mięśni gładkich (zmiana kąta o ok. 22°) lub S1 miozyny z rąbka brzeźnego mikrokosmków enterocytów (zmiana o 32°). Takie przesunięcie nie zachodziło dla S1



Ryc. 1. Struktura subfragmentu 1 miozyny. Reszty aminokwasowe 699-843 łańcucha ciężkiego S1, które stanowią trzon domeny łańcuchów lekkich, zaznaczono kolorem niebieskim. W obrębie domeny katalitycznej α -helisy i elementy β -strukturalne zaznaczone są odpowiednio kolorami czerwonym i żółtym. Pokazano również pozycje niektórych aminokwasów, które omawia się w tekście. (Do wykonania ryciny zostały użyte współrzędne atomowe S1 z pliku PDB 2MYS).

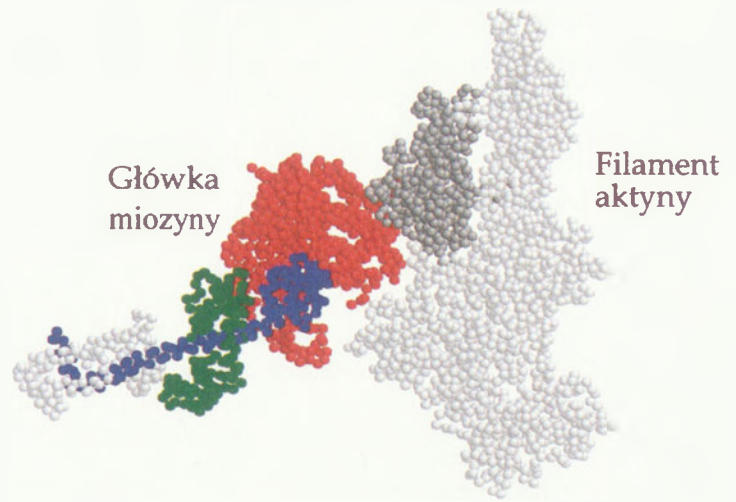
miozyny z mięśnia szkieletowego (Ryc. 3). Obserwacje te zostały następnie potwierdzone przy użyciu metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego [35]. Ponieważ dotychczasowe badania mechanizmu generacji siły nie wskazują na istotne znaczenie etapu uwalniania ADP w mięśniu szkieletowym, powyższe wyniki świadczą o tym, że korelacja pomiędzy podstawowymi etapami chemicznymi i mechanicznymi może być nieco różna w przypadku różnych typów mięśni.

Wielu spektakularnych, aczkolwiek pośrednich dowodów wskazujących na udział domeny łańcuchów lekkich w generacji siły dostarczyła biologia molekularna. Jedną z jej oczywistych zalet jest możliwość produkcji S1 o różnej długości C-końcowej helisy. Jeśli helisa ta zostaje prawie całkowicie wyeliminowana na poziomie genetycznym [36] lub przez użycie kontrolowanej proteolizy [37], szybkość przesuwania filamentów aktyny przez S1 w teście ruchliwości *in vitro*³ maleje do 5-10% wartości dla białka o pełnej długości. Grupa J. S u p d i c h a [38] skonstruowała kilka wariantów główki miozyny *Dictyostelium, discoideum* w których obszary łańcucha ciężkiego wiążące łań-

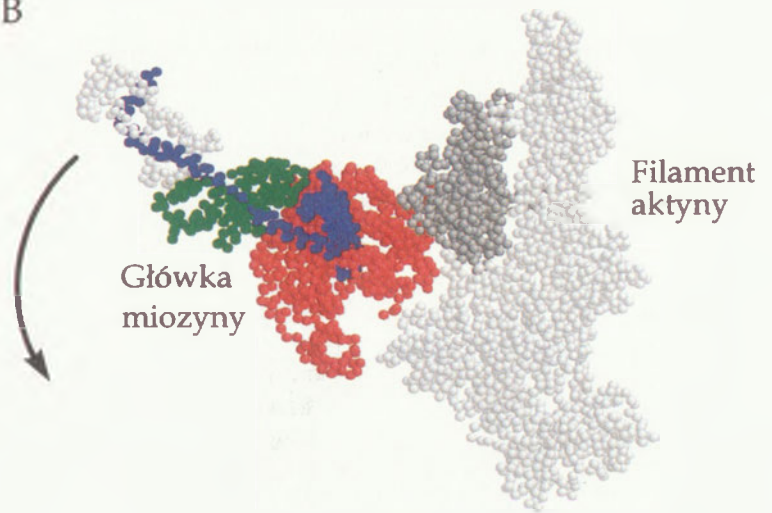
cuchy lekkie były nieobecne, ograniczone do łańcucha istotnego, lub zwiększone o dodatkowe miejsca wiążące łańcuch istotny (wraz z tym łańcuchem). Gdy mutanty te analizowano pod kątem szybkości indukowanego przez nie ruchu filamentów aktyny, otrzymano liniową zależność pomiędzy prędkością ruchu a długością domeny łańcuchów lekkich. Co ważniejsze, w przypadku mutanta, w którym domena łańcuchów lekkich została przedłużona, zaobserwowano większą niż dla nie zmutowanego S1 szybkość poruszania się. Wynik ten, wbrew rozpowszechnionemu przekonaniu, nie dostarcza bezpośrednio dowodu potwierdzającego teorię dźwigni, ponieważ w przypadku wielu modeli działania mostków, włączając w to klasyczne modele H. E. Huxleya [39] i A. F. Huxleya [40], taka liniowa zależność powinna być spełniona. Jednakże mały rozrzut punktów pomiarowych umożliwił, przez ekstrapolację szybkości poruszania się S1

³ W teście tym główki miozyny przytwierdzone są do stałego podłoża. Po dodaniu fluorescencyjnie znakowanych filamentów aktyny i ATP, prędkość poruszania się filamentów jest mierzona przy użyciu mikroskopu sprzężonego z kamerą wideo.

A

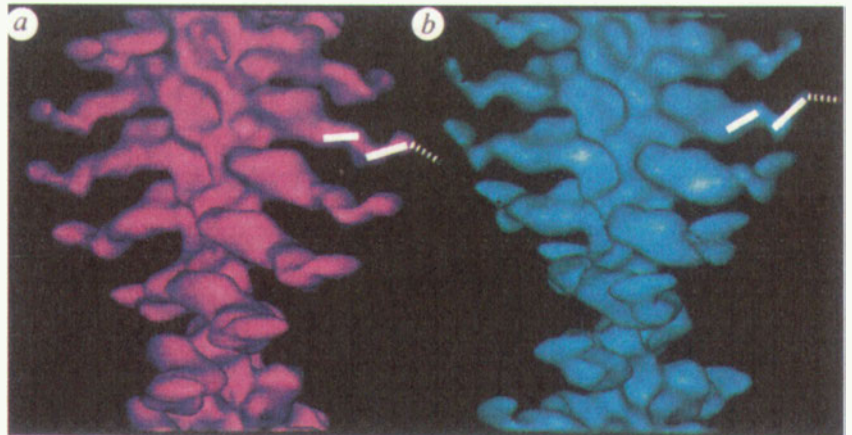


B



Ryc. 2. Główna miozyny związana filamentem aktynowym w nieobecności nukleotydów (stan rigor) (A) i początkowym momencie generacji siły (stan $S1 \cdot ADP \cdot P_i$). Stan pokazany na Ryc. 6B odpowiada obrotowi domeny łańcuchów lekkich o kąt 60° , w stosunku do stanu rigor, co daje przesunięcie jej C-końcowej części, wiążącej łańcuch lekki regulacyjny, o ok. 110 Å. Strzałką zaznaczona jest droga powrotna domeny łańcuchów lekkich do stanu rigor. Domena katalityczna S1 oznaczona jest kolorem czerwonym; domena łańcuchów lekkich — niebieskim; łańcuch lekki istotny — zielonym; łańcuch lekki regulujący — jasnoszarym. Monomer aktyny, z którym związana jest główka miozyny zaznaczony jest kolorem ciemnoszarym. (Rycina została wykonana w oparciu o nieopublikowane współrzędne atomów C_α kompleksu aktomiozyny uprzejmie dostarczone przez I. Raymenta)

Ryc. 3. Filament aktynowy „udekorowany” główkami miozyny z rąbka brzeżnego mikrośródków enterocytów w stanie rigor (a) i w obecności MgADP (b). Trójwymiarową rekonstrukcję przeprowadzono na podstawie danych uzyskanych za pomocą mikroskopii elektronowej. Białymi paskami oznaczono położenie łańcuchów lekkich, których rolę w przypadku tej miozyny spełniają cząsteczki kalmoduliny. W porównaniu z (a) różnica w położeniu domeny łańcuchów lekkich w strukturze (b) wynosi 32° (wg [33]).



do wartości zero, znalezienie punktu podparcia dźwigni, tj punktu który obraca się w miejscu. Ten punkt mieści się w obszarze pomiędzy dwiema reaktywnymi resztami cysteinowymi⁴ i jest różny od proponowanej przez Milligana [27, 30] Gly-770. Reszty cys-

teinowe zawierające grupy tiolowe SH1 i SH2 są położone na dwóch krótkich helisach połączonych pętlą (Ryc. 1). Gdy znajdująca się w tej pętli Gly-699, występująca we wszystkich miozynach, została zmutowana do alaniny, szybkość wędrowania zmniejszyła się przeszło stukrotnie [41], przy tylko ok. pięciokrotnym spadku aktywności ATPazowej w obecności aktyny. Niewątpliwie jest to obszar o pierwszorzędnym znaczeniu w procesie transdukcji energii i, być może, punkt podparcia dźwigni.

Jaka jest rola łańcuchów lekkich w procesie genera-

⁴ S1 miozyny *Dyctostelium discoideum* nie ma SH1. Zamiast Cys-707 występuje tu Thr-688; natomiast SH2 istnieje i odpowiada Cys-678. Tak więc mówienie o dwóch reaktywnych resztach cysteinowych nie jest w tym przypadku całkowicie ściśle.

cji siły? Lekkie łańcuchy miozyny mają wiele funkcji⁵: zapewniają sztywność C-końcowej helisy, a w miozynach gładkich mięśni kręgowców, mięśni mięczaków i miozynach niemięśniowych zapewniają regulację skurczu [42, 43]. Łańcuchy istotne A1 i A2 wykazują różne zachowanie w procesie polimeryzacji aktyny [44], co pozostaje w zgodzie z poglądem, że mogą być one modulatorem w oddziaływaniu główki miozyny z aktyną [45, 46]. Jednakże rola łańcuchów lekkich w transdukcji energii może być bardziej aktywna, zwłaszcza że pewne części łańcucha istotnego znajdują się w pobliżu N-końcowej części łańcucha ciężkiego, tak iż mogą być one sieciowane do łańcucha ciężkiego w sposób zależny od obecności ATP [47]. Całkowita eliminacja łańcuchów lekkich, mimo iż jest możliwa, daje w rezultacie produkt bardzo niestabilny [48], ponieważ zostają odsłonięte hydrofobowe motywy IQ łańcucha ciężkiego wiążące łańcuchy lekkie. Grupa *Manstein* [49] zastąpiła C-końcową helisę S1 miozyny z *Dictyostelium* jednym lub dwoma α -helikalnymi fragmentami pochodzącymi z innego białka — α -aktyniny. Jest zadziwiające, że taka hybryda białkowa wykazywała zarówno funkcje enzymatyczne (prawie niezmienną kinetykę hydrolizy ATP), jak i zdolność przesuwania filamentów aktyny w teście ruchliwości *in vitro*. Świadczy to o tym, że główną rolą łańcuchów lekkich w procesie generacji ruchu jest usztywnienie α -helikalnego odcinka łańcucha ciężkiego, stanowiącego trzon domeny łańcuchów lekkich (dźwigni).

Spośród wielu innych badań należy klasyczną pracę *Wakabayashi* i wsp. [50], którzy używając niskokątowego rozpraszania promieni X dokonali pomiarów wpływu ATP i kilku jego analogów na wielkość promienia obrotowego (R_g) S1. Obecność MgATP wywołuje zmniejszenie się R_g o 2.8 Å; w przypadku S1·ADP·V_i zmiana ta wynosi 1.9 Å, a dla S1·ADP, 0.8 Å. Wyniki te są zgodne z hipotezą, według której C-końcowy fragment S1 po przyłączeniu ATP obraca się o kąt 25-30°.

Używając kilku technik spektroskopii optycznej nie udało się wykryć ruchu C-końcowej helisy S1. Za pomocą polaryzacji fluorescencji śledzono rotacje znaczników przyłączonych do Cys-125 łańcucha regulującego w zsynchronizowanym włóknie mięśniowym⁶ [53]. Rotacje te były bardzo małe, rzędu 3°. Obrót o taki kąt nie jest, oczywiście, wystarczający do wyjaśnienia rozmiaru kroku roboczego miozyny. Wynik ten należy uznać za bardzo istotny, ponieważ doskonałość techniczna dwóch współpracujących laboratoriów, w którym dokonano pomiarów, nigdy nie była kwestionowana. Powszechnie oferowane proste wyjaśnienie, że tylko niewielka część mostków⁷ bierze aktywny udział w skurczu, podczas gdy polaryzacja fluorescencji używana w doświadczeniu mierzy średnią wartość dla całej populacji mostków, jest trudne do przyjęcia. W podobnych warunkach 36-52% mostków jest związanych z aktyną [54], co prowadzi do wnios-

ku, że skorygowana wartość kąta rotacji mostka wynosi ok. 6°, wciąż o rząd wielkości za mało aby wyjaśnić odległość pokonywaną przez główkę miozyny podczas hydrolizy jednej cząsteczki ATP.

Drugi zestaw doświadczeń kwestionujących ruch C-końcowej helisy pochodzi z laboratorium autora niniejszego artykułu. Rezonansowe przeniesienie energii fluorescencji (FRET) zostało tu użyte do pomiaru odległości pomiędzy Cys-177 łańcucha lekkiego A1 w S1 miozyny z mięśnia szkieletowego a kilkoma resztami aminokwasowymi łańcucha ciężkiego: Lys-83, Lys-553 oraz centrum aktywnym (Ryc. 1) [55]. Posługując się atomowym modelem akt-S1 [56], obliczono pozycje Cys-177 przy rotacji o zadany kąt. Pomiar odległości pomiędzy Cys-177 a wyżej wymienionymi innymi miejscami cząsteczki S1 w nieobecności ligandów dały dobrą zgodność pomiędzy danymi krystalograficznymi i FRET. Jednakże odległości otrzymane z pomiarów FRET zmieniły się niewiele w obecności ATP, ADP, aktyny, aktyny + ADP, oraz analogów stanu przejściowego ADP·BeF₃, ADP·AlF₄, i ADP·V_i. Eksperymenty te nie pozwalają wykluczyć małych obrotów (o kąt <20°), natomiast są one niezgodne z dużymi rotacjami, np. o kąt >45°.

Elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR) oraz STEPR (*Saturation Transfer EPR*), odmiana tej techniki pozwalająca śledzić mikrosekundowe rotacje, dostarczyły wyników nieco bardziej zgodnych z teorią dźwigni. Znaczniki spinowe połączone z Cys-707 wykazały, że w stanie rigor⁸ istnieje tylko jedna orientacja domeny katalitycznej w stosunku do filamentu aktynowego [57, 58]. Podczas skurczu zarówno domena katalityczna, jak i domena łańcuchów lekkich wykazywały w dużej mierze chaotyczną orientację, przy czym domena łańcuchów lekkich miała znacznie większą ruchliwość, nawet w skali mikrosekund [49, 50], co zgadza się dobrze z postulatem, że jedynie ta domena wykonuje obrót. Natomiast wykazanie chaotycznej orientacji obu domen, a w szczególności domeny katalitycznej, jest całkowicie niezgodne z klasycznymi modelami skurczu mięśniowego, w których główka

⁵ Proszę porównać z kolejnym artykułem autorstwa R. Dąbrowskiej i D. Stępkowskiego.

⁶ W zsynchronizowanym włóknie mięśniowym poszczególne etapy cyklu ATPazowego zachodzą jednocześnie we wszystkich główkach. Synchronizację przeprowadza się przez nasączenie włókna mięśniowego prekursorami ATP, tj. pochodną tego nukleotydu, w którym γ -fosforan jest zablokowany przez światłoczułą grupę, najczęściej 2-nitrobenzylową [51]. Taki prekursor (ang. *caged-ATP*) nie jest hydrolizowany przez miozynę i ma do niej niskie powinowactwo [52]. 50-ns impuls lasera uwalnia ATP, które wiąże się ze wszystkimi główkami jednocześnie, a następnie jest jednocześnie hydrolizowany.

⁷ Mostek poprzeczny (ang. *crossbridge*) jest połączeniem pomiędzy filamentem aktynowym i miozynowym we włóknie mięśniowym. Składa się z główki miozyny.

⁸ Stan rigor (od łac. *rigor mortis*) występuje w główce miozyny połączonej z filamentem aktynowym w nieobecności nukleotydów. Powinowactwo S1 do aktyny jest wtedy największe.

miozyny ma dwa ściśle określone położenia w stosunku do filamentu aktynowego.

Czy używając mikroskopu elektronowego, nie można bezpośrednio „zobaczyć” orientacji główek miozyny w stosunku do filamentu aktynowego w obecności ATP lub innych nukleotydów? Jest to zadanie bardzo trudne, z uwagi na niskie powinowactwo miozyny do aktyny w obecności ATP. Początkowe obserwacje [59, 60], przeprowadzone na S1 kowalencyjnie sieciowanym z podjednostkami filamentu aktynowego, doprowadziły do wniosku, że w obecności ATP istnieje cała gama kątów przyłączenia główki do filamentu. Prace te spotkały się z krytyczną oceną, ponieważ w sieciowanej aktomiozynie główka miozyny jest utrzymywana w kontakcie z aktyną również wtedy, gdy „funkcjonalne”, niekowalencyjne wiązania uległyby dysocjacji pod wpływem ATP. Takie główki nie są odróżniane od główek funkcjonalnie związanych. Jeśli jednak obniżyć siłę jonową roztworu do 2 mM, powinowactwo S1 do aktyny jest wystarczająco wysokie, aby ok. 70% główek było związanych [6] bez potrzeby sieciowania. Otrzymane w tych warunkach obrazy mikroskopowe potwierdzają rozmaite kąty przyłączenia S1 do aktyny, jak również wskazują na pewną zmianę kształtu główki w obecności ATP [61]. W podobnych warunkach, ale używając nieco innej techniki mikroskopii elektronowej stwierdzono, że kąty, które tworzą mostki w obecności ADP-P_i nie są różne od tych, które występują w stanie rigor [62, 63]. Ponieważ w mikroskopie elektronowym widzi się głównie domenę katalityczną, obserwacje te są zgodne z poglądem, że ta domena nie zmienia swojej orientacji w czasie cyklu ATPazowego.

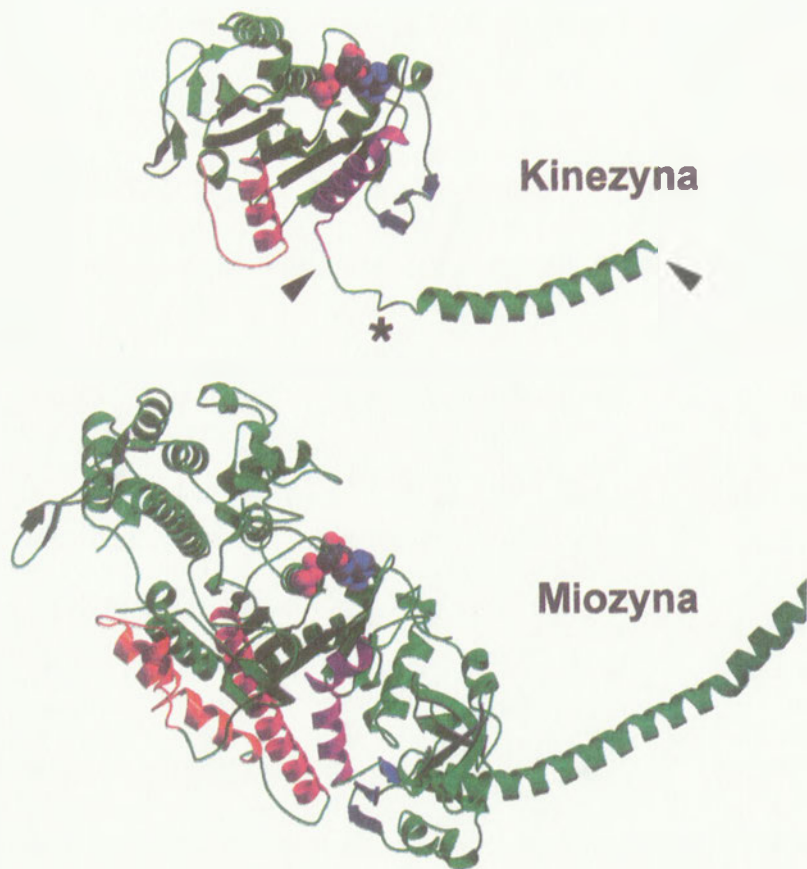
Wyżej opisane wyniki uzyskane za pomocą mikroskopii elektronowej trudno jest skorelować z trójwymiarowymi rekonstrukcjami (zob. Ryc. 3) używanymi przez grupę Milligana [32-34, 64], ponieważ rekonstrukcje takie mogą być dokonane wyłącznie dla filamentów aktyny nasyconych S1, tj dla filamentów, w których z *każdą* podjednostką aktyny jest związana główka miozyny. Tymczasem orientacja główki miozyny w stosunku do osi filamentu aktynowego zmienia się w zależności od stopnia **obsadzenia** podjednostek aktyny przez miozynę, tj. w zależności od stopnia nasycenia filamentu aktynowego przez miozynę. Hipoteza ta, początkowo wysunięta przez J. Borejda [65], została potwierdzona przez sieciowanie chemiczne S1 z filamentami aktynowymi [66], a także przez pomiary odległości pomiędzy aktyną i miozyną metodą rezonansowego przeniesienia energii fluorescencji [67]. W warunkach fizjologicznych filamente aktynowe nie są nasycone główkami miozyny. W sumie, wydaje się, że mikroskopia elektronowa nie potrafi dostarczyć jednoznacznych odpowiedzi odnośnie orientacji główek miozyny w stosunku do filamentu aktynowego w obecności nukleotydów, prawdopodobnie ze względu na dynamiczny charakter tych oddziaływań.

III. Podobieństwa kinezy i miozyny

Jednym z najciekawszych wydarzeń w ostatnim czasie było odkrycie znacznych podobieństw strukturalnych białek komórek niemięśniowych kinezy i ncd oraz miozyny [68, 69]. Miozyna i kinezy są motorami molekularnymi wykorzystującymi energię hydrolizy ATP do poruszania się. Białka te różnią się wielkością (domena katalityczna kinezy ma masę cząsteczkową ok. 2-krotnie mniejszą niż miozyna i wymiary $70 \times 45 \times 45 \text{ \AA}$), jak również używają różnego typu polimeru na którym się poruszają: miozyna używa filamentu aktynowego, kinezy — mikrotubuli [42]. Także ich sekwencje aminokwasowe nie wykazują większych analogii. Jednak szczegółowa analiza ich struktur trzeciorzędowych wykazuje jednoznacznie [68, 69], że są to białka strukturalnie podobne (Ryc. 4). Podobnie jak miozyna, kinezy składa się z dwóch domen: domeny katalitycznej, w której znajduje się centrum aktywne i miejsce wiążące tubulinę, oraz superhelisy stanowiącej C-końcową część ciężkiego łańcucha tego białka. Struktura tej ostatniej nie jest jeszcze dobrze poznana; obecność długiego superhelikalnego fragmentu stabilizowanego przez oddziaływanie z drugim łańcuchem ciężkim kinezy wydaje się najbardziej prawdopodobna na podstawie spektroskopii CD i przewidywań struktury białka [3, 70]. Sama domena katalityczna składa się z sześciu α -helis i siedmiu segmentów β -strukturalnych [68, 69]. Elementy te odnajdziemy z łatwością w miozynie i, co ciekawsze, większość tych elementów strukturalnych występuje również w białkach G [3, 68, 69]. Sugeruje to, że te białka mają wspólne pochodzenie ewolucyjne [1, 3, 68, 69]. Wspólną ich cechą jest to, że reagują one zmianą konformacyjną na hydrolizę wiązania pomiędzy β i γ -fosforanem ATP związanego w centrum aktywnym. Można więc łatwo sobie wyobrazić, że takie zmiany strukturalne są przekazywane z okolic centrum aktywnego w pobliże punktu podparcia dźwigni, umożliwiając jej obrót. Są jednak poważne wątpliwości, czy kinezy używa mechanizmu dźwigni. Jeśli C-końcowy fragment zostaje całkowicie usunięty, kinezy, która w tych warunkach jest monomeryczna (jednogłówkowa), porusza się z prędkością ok. 1% w stosunku do natywnego białka, jednakże dodanie następnego dziesięciu aminokwasów powoduje wzrost prędkości do ok. 20-30% wielkości charakterystycznej dla normalnej kinezy [71]. Białko takie jest ciągle monomerem i praktycznie nie ma C-końcowego superhelikalnego fragmentu (Ryc. 4). Tak więc, dla generacji ruchu przez kinezynę C-końcowa helisa nie jest niezbędna.

IV. Mechanizm generacji siły przez miozynę

Zakładając, że C-końcowa helisa odgrywa podstawową rolę w procesie generacji ruchu przez miozynę, zaproponować możemy 2 mechanizmy dotyczące



Ryc. 4. Podobieństwa strukturalne główek kinezy i główek miozyny. W cząsteczce kinezy struktura segmentu pomiędzy grotami strzałek została zrekonstruowana na podstawie widm dichroizmu kołowego i przewidywań struktury. Domena katalityczna kinezy, tj. część globularna do punktu zaznaczonego gwiazdką może funkcjonować jako motor molekularny, chociaż wykazuje niską, w porównaniu z natywnym białkiem, zdolność translokacji mikrotubul w teście ruchliwości *in vitro* (wg [3]).

sposobu, w jaki hydroliza ATP jest sprzężona z ruchem mechanicznym główki:

a) *Mechanizm konformacyjny*. Połączenie S1 z filamentem aktynowym zostaje zdysocjowane pod wpływem ATP (Ryc. 5A). Nukleotyd ten następnie ulega hydrolizie tworząc związany z S1 kompleks ADP·P_i, a energia uzyskana z tego procesu jest magazynowana w główce miozyny przez obrót C-końcowej α-helisy o znaczny kąt. Powoduje to wystąpienie naprężeń w strukturze główki miozyny. W chwili obecnej nie ma żadnych danych doświadczalnych wskazujących jakie odkształcenia strukturalne mogą tu występować. Możemy jedynie przypuszczać, że zachodzi tu odkształcenie standardowych kątów w wiązaniach peptydowych białka, albo zginanie jego α-helikalnych segmentów. Może zachodzić także zginanie całej C-końcowej helisy [72]. Powrót do stanu wyjściowego, tj. bez naprężeń, następuje w momencie uwolnienia ortofosforanu, co ma miejsce, gdy S1·ADP·P_i wiąże się z filamentem aktynowym, generując w ten sposób siłę i ruch. Cechą charakterystyczną tego mechanizmu jest użycie energii hydrolizy ATP do wywołania naprężeń w strukturze białkowej. Należy się spodziewać, że istnieją dwie konformacje główki miozyny: jedna w nieobecności nukleotydów i druga występująca w kompleksie S1·ADP·P_i [4]. Obie konformacje różnią się kątem, jaki tworzy C-końcowa helisa z domeną katalityczną.

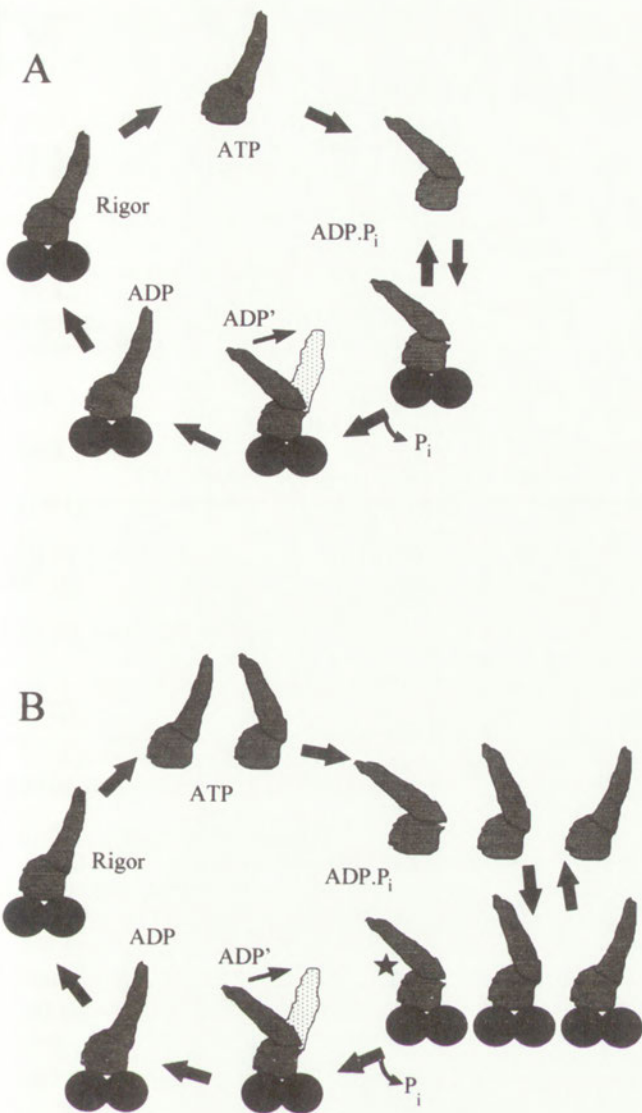
b) *Mechanizm dyfuzyjny*. Po raz pierwszy pewien rodzaj takiego mechanizmu został zaproponowany przez A. F. Huxleya w 1957 [73]. Idea ta uległa później pewnym przekształceniom [74-76], nie zawsze

jasnym i użytecznym. Mechanizm ten opiera się na funkcjonowaniu urządzenia zapadkowego. Ponieważ C-końcowa helisa nie jest przymocowana sztywno do domeny katalitycznej, wychylenia z położenia równowagi zachodzą stale na skutek ruchów Browna (ruchów termicznych). Im większe odchylenie od położenia równowagi, tym większe naprężenie w strukturze. Po dysocjacji od aktyny i hydrolizie ATP, *statystycznie uśredniony* kształt cząsteczki S1·ADP·P_i jest taki sam jak dla S1 niezwiązanego z filamentem (Ryc. 5B). Kompleksy S1·ADP·P_i wiążą się z filamentem, ale dysocjują natychmiast, ponieważ ich powinowactwo do aktyny jest niskie, a czas życia ich połączeń z aktyną, krótki ($\tau_w \approx 0.1$ ms [77]). Jednakże dla cząsteczek, w których wychylenie helisy osiągnęło pewien próg, w związanej z aktyną główce miozyny następuje zjawisko nieodwracalne: dysocjacja ortofosforanu (co zaznaczono na Ryc. 5B gwiazdką). Powoduje to wzrost powinowactwa S1 do aktyny o ok. 4 rzędy wielkości (możliwa jest także sytuacja odwrotna, w której przejście ze stanu słabego oddziaływania do silnego oddziaływania z aktyną prowadzi do dysocjacji ortofosforanu z aktomiozyny). Po dysocjacji P_i główka miozyny pozostaje związana z filamentem przez czas znacznie dłuższy ($\tau_s \approx 2$ ms [15]), a jej energia naprężenia zostaje zużyta na przywrócenie helisy do stanu wyjściowego. Jak widać z tego modelu, ATP spełnia tu rolę „prostownika”, „mechanicznej diody” [78] albo „demonia Maxwella” [75]. Model Brownowskiej zapadki był użyty do opisu innych motorów oraz procesu translokacji białek przez membrany [79]. Szacunkowe obliczenia wykazują, że dyfuzja taka

Artykuł otrzymano 11 lutego 1997 r.
Zaakceptowano do druku 9 maja 1997 r.

Piśmiennictwo

- Block SM (1996) *Cell* **87**: 151-157
- Barsotti RJ, Dantzig JA, Goldman Y (1996) *Nature Struct Biol* **3**: 737-739
- Vale RD (1996) *J Cell Biol* **135**: 291-302
- Howard J (1996) *Annu Rev Physiol* **58**: 703-729
- Rayment I (1996) *J Biol Chem* **271**: 15850-15853
- Holmes KC (1997) *Current Biology* **7**: R112-R118
- Strzelecka-Gołaszewska H (1996) *Post Biochem* **42**: 185-194
- Rayment I, Holden H (1994) *TIBS* **19**: 129-134
- Mornet D, Ue K, Morales MF (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 736-739
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick D, Benning MM, Winkelman D, Wesenberg G, Holden H (1993) *Science* **261**: 50-58
- Molloy JE, Burns JE, Kendrick-Jones J, Tregear RT, White DCS (1995) *Nature (Lond)* **378**: 209-212
- Finer JT, Simmons RM, Spudich JA (1994) *Nature (Lond)* **368**: 113-119
- Guilford WH, Dupuis DE, Kennedy G, Wu J, Patlak JB, Warshaw DM (1997) *Biophys J* **72**: 1006-1021
- Geeves MA (1991) *Biochem J* **274**: 1-14
- Spudich JA (1994) *Nature (Lond)* **372**: 515-518
- Highsmith S (1976) *J Biol Chem* **251**: 6170-6172
- Greene L, Eisenberg E (1980) *J Biol Chem* **255**: 543-548
- Seidel J, Chopek M, Gergely J (1970) *Biochemistry* **9**: 3265-3272
- Duke J, Takashi R, Ue K, Morales MF (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 302-306
- Burke M, Reisler E (1977) *Biochemistry* **16**: 5559-5563
- Wells JA, Yount RG (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4966-4970
- Chaussepied P, Mornet D, Kassab R (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2037-2041
- Kasprzak AA, Chaussepied P, Morales MF (1989) *Biochemistry* **28**: 9230-9238
- Yamamoto K, Sekine T (1979) *Biochem Biophys Res Commun* **89**: 925-932
- Applegate D, Reisler E (1984) *Biochemistry* **23**: 4779-4784
- Miller L, Reisler E (1985) *J Mol Biol* **182**: 271-279
- Chaussepied P, Mornet D, Barman TE, Travers F, Kassab R (1986) *Biochemistry* **25**: 1141-1149
- Fisher AJ, Smith CA, Thoden JB, Smith R, Sutoh K, Holden H, Rayment I (1995) *Biochemistry* **34**: 8960-8972
- Smith CA, Rayment I (1996) *Biochemistry* **35**: 5404-5417
- Smith SJ, Eisenberg E (1990) *Eur J Biochem* **193**: 69-73
- Ringel I, Peyser M, Muhrad A (1990) *Biochemistry* **29**: 9091-9096
- Whittaker M, Wilson-Kubalek EM, Smith JE, Faust L, Milligan RA, Sweeney HL (1995) *Nature (Lond)* **378**: 748-751
- Jontes JD, Wilson-Kubalek EM, Milligan RA (1995) *Nature (Lond)* **378**: 751-753
- Milligan RA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 796-801
- Gollub J, Cremo C, Cooke R (1996) *Nature Struct Biol* **3**: 796-801
- Itakura S, Yamakawa H, Toyoshima YY, Ishijima A, Kojima T, Harada Y, Yanagida T, Wakabayashi T, Sutoh K (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1504-1510
- Waller G, Ouyang G, Swafford J, Vibert P, Lowey S (1995) *J Biol Chem* **270**: 15348-15352
- Uyeda TQ, Abramson PD, Spudich JA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4459-4464
- Huxley HE (1969) *Science* **164**: 1356-1366



Ryc. 5. Dwa mechanizmy generacji siły. A) mechanizm konformacyjny B) mechanizm dyfuzyjny (objaśnienia w tekście).

może się odbywać wystarczająco szybko, aby sprostać wymaganiom kurczącego się mięśnia [4]. Wydaje się, że w chwili obecnej dane doświadczalne lepiej pasują do tego mechanizmu. Jednakowoż, jeśli ten mechanizm jest używany przez miozynę, jego udowodnienie będzie trudne, ponieważ frakcja cząsteczek, w których domena łańcuchów lekkich ma położenie faworyzujące dysocjację ortofosforanu, może być bardzo mała.

W podsumowaniu: w przypadku miozyny istnieją dane eksperymentalne wskazujące na udział C-końcowej helisy w procesie generacji siły (ruchu). W ostatnim czasie mechanizm taki zyskuje coraz szerszą akceptację. Ze względu na pokrewieństwo ewolucyjne kinezyny i miozyny sądzi się, że oba motory molekularne mają zbliżony mechanizm generacji siły. Materiał doświadczalny jest w chwili obecnej niewystarczający, aby jednoznacznie wypowiedzieć się za lub przeciw mechanizmowi dźwigni. Problemy te wymagają dalszych badań, w których przydatne mogą być techniki biofizyczne i biochemiczne.

Podziękowania

Autor dziękuje Pani Profesor Hannie Strzeleckiej-

40. Huxley AF, Simmons RM (1971) *Nature (Lond)* **233**: 533-538
41. Kinoshita F, Wang SX, Kidambi US, Moncman CL, Winkelmann DA (1996) *J Cell Biol* **134**: 895-909
42. Dąbrowska R (1994) *Post Biochem* **40**: 96-105
43. Dąbrowska R (1996) *Post Biochem* **42**: 195-203
44. Chaussepied P, Kasprzak AA (1989) *Nature (Lond)* **342**: 950-953
45. Stępkowski D (1995) *FEBS Lett* **374**: 6-11
46. Timson DJ, Trayer IP (1997) *FEBS Lett* **400**: 31-36
47. Pliszka B (1993) *Biochem Mol Biol Int* **31**: 381-388
48. Wagner PD, Stone DB (1983) *J Biol Chem* **258**: 8876-8882
49. Anson M, Geeves MA, Kurzawa SE, Manstein D (1996) *EMBO J* **15**: 6069-6974
50. Wakabayashi K, Tokunaga M, Kohno I, Sugimoto Y, Hamanaka T, Takezawa Y, Wakabayashi T, Amemiya Y (1992) *Science* **258**: 443-447
51. McCray JA, Trentham DR (1989) *Annu Rev Biophys Chem* **18**: 239-270
52. Thirwell H, Sleep JA, Ferenczi MA (1995) *J Muscle Res Cell Motil* **16**: 131-127
53. Claire Allen TS, Ling N, Irving M, Goldman YE (1996) *Biophys J* **70**: 1847-1862
54. Higuchi H, Goldman YE (1995) *Biophys J* **69**: 1491-1507
55. Smyczynski C, Kasprzak AA (1997) *J Muscle Res Cell Biol* **18**: 257
56. Rayment I, Holden H, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA (1993) *Science* **261**: 58-65
57. Raucher D, Fajer PG (1994) *Biochemistry* **33**: 11993-11999
58. Thomas DD, Ramachandran S, Roopnarine O, Hayden DW, Ostap EM (1995) *Biophys J* **68**: 135s-141s
59. Craig R, Green LE, Eisenberg E (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3247-3251
60. Applegate D, Flicker P (1987) *J Biol Chem* **262**: 6856-6863
61. Walker M, White H, Belknap B, Trinick J (1994) *Biophys J* **66**: 1563-1572
62. Pollard T, Bhandari D, Maupin P, Wachsstock D, Weeds AG (1993) *Biophys J* **64**: 454-471
63. Funatsu T, Kono E, Tsukita S (1993) *J Cell Biol* **121**: 1053-1064
64. Milligan RA, Whittaker M, Safer D (1990) *Nature (Lond)* **348**: 217-221
65. Andreev OA, Borejdo J (1992) *J Muscle Res Cell Motil* **13**: 523-533
66. Bonafè N, Chaussepied P (1995) *Biophys J* **68**: 35s-43s
67. Kasprzak AA, Bertrand R, Kassab R (1996) *Biophys J* **70**: 17a
68. Kull FJ, Sablin EP, Lau R, Fletterick RJ, Vale RD (1996) *Nature (Lond)* **380**: 550-555
69. Sablin EP, Kull FJ, Cooke R, Vale RD, Fletterick RJ (1996) *Nature (Lond)* **380**: 555-559
70. Morii H, Takenawa T, Arisaka F, Shimizu T (1997) *Biochemistry* **36**: 1933-1942
71. Vale RD, Funatsu T, Pierce DW, Romberg L, Harada Y, Yanagida T (1996) *Nature (Lond)* **380**: 451-453
72. Howard J, Spudich JA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4462-4464
73. Huxley AF (1957) *Prog Biophys Chem* **7**: 255-318
74. Córdoba NJ, Ermentrout B, Oster GF (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 339-343
75. Vale RD, Oosawa F (1990) *Adv Biophys* **26**: 97-134
76. Mitsui T, Ohshima H (1988) *J Muscle Res Cell Motil* **9**: 248-260
77. Schoenberg M (1988) *Biophys J* **54**: 135-148
78. Magnasco M (1993) *Phys Rev Letters* **71**: 1477-1481
79. Peskin C, Odell GM, Oster GF (1993) *Biophys J* **65**: 316-324

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

Obecny adres:

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

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

Wpływ łańcuchów lekkich miozyny na jej funkcjonowanie

The influence of myosin light chains on its work

RENATA DĄBROWSKA¹,
DARIUSZ STĘPKOWSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura łańcuchów lekkich miozyny
- III. Funkcje łańcuchów lekkich miozyny
 - III-1. Regulacja (lub modulacja) aktywności domeny motorycznej miozyny
 - III-2. Wpływ na generację siły i szybkość skurczu mięśni
- IV. Izoformy łańcuchów lekkich miozyny i ich znaczenie funkcjonalne
- V. Podsumowanie

I. Wstęp

Miozyna konwencjonalna (zwana też miozyną II), jest białkiem motorycznym odgrywającym rolę w procesach skurczu mięśni i ruchliwości komórkowej. Jest heksamerem zbudowanym z dwóch łańcuchów ciężkich (o masie ok. 200 kDa) oraz dwóch par łańcuchów lekkich: regulujących (20 kDa) i istotnych (16-25 kDa) [1, 2]. Łańcuchy lekkie związane są z N-końcowymi fragmentami łańcuchów ciężkich, które na tym odcinku nie są zwinięte w superhelisę i tworzą struktury globularne zwane główkami (Ryc. 1A). W strukturze główek miozyny, jak wykazały badania przy użyciu przeciwciał [3] oraz badania krystalograficzne [4, 5], można wyróżnić dwie domeny: motoryczną, w której znajduje się miejsce katalityczne i miejsce wiązania aktyny oraz regulatorową, utworzoną z trzech elementów: regulującego i istotnego łańcucha lekkiego i α -helikalnego fragmentu łańcucha ciężkiego (Ryc. 1B). Istotny lekki łańcuch wiąże się z N-końcową częścią, a regulujący z C-końcową częścią helikalnego odcinka łańcucha ciężkiego.

Przedmiotem niniejszego artykułu jest znaczenie łańcuchów lekkich dla generacji siły (ruchu) przez domenę motoryczną miozyny, a także dla regulacji jej aktywności.

II. Struktura łańcuchów lekkich

Łańcuchy lekkie wchodzi w skład rodziny białek

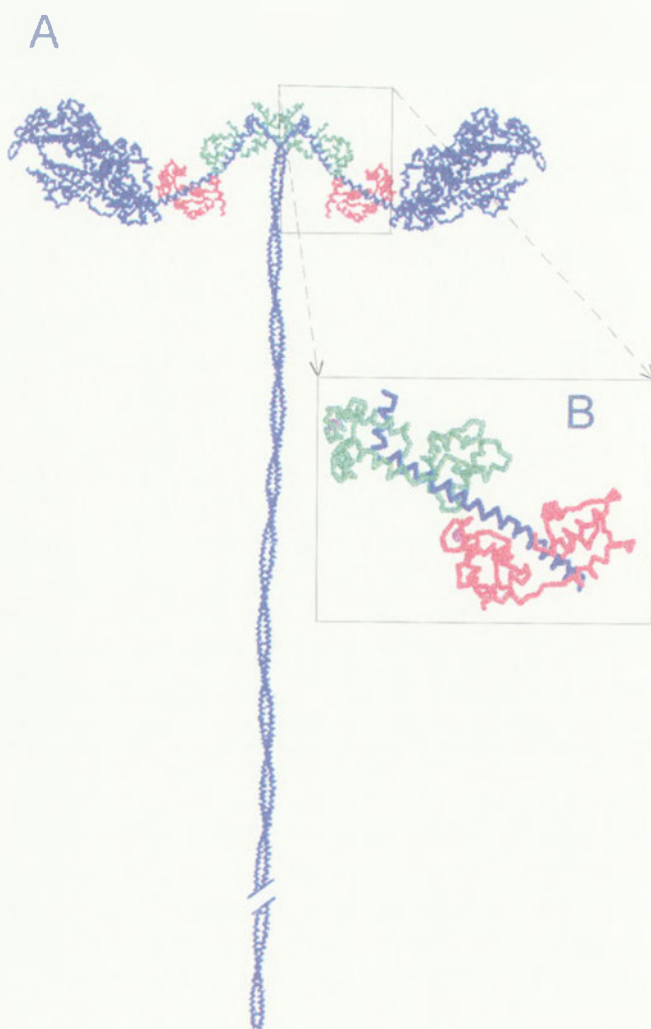
¹ Prof. dr hab., ² doc. dr hab. Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of myosin light chains
- III. Function of myosin light chains
 - III-1. The regulation (or modulation) of motor domain activity of myosin
 - III-2. The effect on force generation and velocity of muscle contraction
- IV. Isoforms of myosin light chains and their functional importance
- V. Conclusions

zawierających powielony strukturalny motyw helisa-pętla-helisa (*EF hand*) służący wiązaniu jonów Ca^{2+} [6, 7]. W obydwu lekkich łańcuchach motyw ten powtarza się cztery razy, jednakże na skutek zmian w sekwencji lub delekcji reszt aminokwasowych w drugiej, trzeciej i czwartej pętli utraciły one zdolność wiązania jonów Ca^{2+} . Istotne łańcuchy wszystkich miozyn, z wyjątkiem miozyny mięczaków, utraciły również miejsce wiązania Ca^{2+} w domenie pierwszej [8], natomiast pętla pierwsza regulującego łańcucha lekkiego wiąże Ca^{2+} w sposób niespecyficzny. Przypuszcza się, że w miozynie mięśni gładkich miejsce to jest wysyczone Mg^{2+} [9], a w miozynie mięśni szkieletowych, w zależności od ich stanu fizjologicznego, Ca^{2+} lub Mg^{2+} [10, 11]. Specyficzne miejsce wiązania Ca^{2+} w miozynie mięczaków tworzy nietypowy motyw *EF hand*, do którego stabilizacji potrzebne są wszystkie elementy domeny regulatorowej, chociaż reszty aminokwasowe wiążące Ca^{2+} znajdują się w pierwszej pętli istotnego łańcucha lekkiego [12]. Wyizolowany istotny łańcuch mięczaków nie wiąże Ca^{2+} .

Różnice w sekwencji reszt aminokwasowych łańcuchów lekkich miozyny mięśni prążkowanych (szkieletowych i serca) i gładkich kręgowców, a także mięśni prążkowanych mięczaków, w szczególności różnice w sekwencji miejsc ich połączenia z łańcuchem ciężkim (Ryc. 2), determinują ich różną rolę fizjologiczną. Na tę ostatnią różnicę wskazuje konieczność użycia różnych związków chemicznych do oddysocjowania łańcuchów lekkich od reszty cząsteczki miozyny. Na przykład, regulujący łańcuch lekki, w nieobecności kationów dwuwartościowych, jest selektywnie usuwany z miozyny mięśni szkieletowych przez DTNB (kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitro-benzoowy)), który powoduje



Ryc. 1. Struktura cząsteczki miozyny (A). Model prezentuje jedno z prawdopodobnych ułożeń główek względem ogonka. Kolorem niebieskim zaznaczono łańcuchy ciężkie miozyny tworzące na N-końcu globularne główki a na C-końcu zwinięte w superhelisę. Łańcuchy lekkie znajdują się w C-końcowej części główek i oznaczone są kolorami zielonym — łańcuch regulujący i kolorem czerwonym — istotny łańcuch. Szczegółowa struktura domeny regulatorowej (lekkich łańcuchów) pokazana jest na rycinie 1B gdzie wskazano położenie jonu Mg^{2+} wiązanego wymiennie z Ca^{2+} w regulującym łańcuchu i jonu Ca^{2+} wiązanego przez łańcuch istotny. Przedstawiona struktura jest strukturą krystalograficzną domeny regulatorowej miozyny z mięśni mięczaków [5].

tworzenie mostków dwusiarczkowych w końcu C regulującego łańcucha [15], z mięśni mięczaków przez chelatowanie kationów dwuwartościowych EDTA (solą sodową kwasu etyleno-diaminoczworoocowego) [16], a z mięśni gładkich przez TFP (trifluoroperazynę) (związek znany z oddziaływania z kalmoduliną) [17]. Usunięcie regulujących łańcuchów ułatwia dysocjację istotnych łańcuchów lekkich.

III. Funkcje łańcuchów lekkich

Wykazano, że usunięcie łańcuchów lekkich z miozyny mięśni szkieletowych wpływa na aktywność motoryczną miozyny: nieznacznie hamując jej aktywność enzymatyczną w kompleksie z aktyną i dziesięciokrotnie spowalniając szybkość generowanego przez nią

ruchu filamentów aktynowych wobec immobilizowanej miozyny [18] w teście ruchliwości (ang. *motility assay*) *in vitro* (opisanym w [19]). Spadek szybkości ruchu filamentów aktynowych jest większy w przypadku miozyny pozbawionej istotnych, niż regulujących łańcuchów lekkich. Usunięcie łańcuchów lekkich z mięśni gładkich także powoduje obniżenie jej aktywności motorycznej [17]. Ponieważ delecja 26 reszt aminokwasowych końca C regulującego łańcucha (który łączy się z łańcuchem ciężkim) powoduje takie samo zmniejszenie szybkości ruchu filamentów aktynowych jak usunięcie całego łańcucha, przypuszczano, że zmiany właściwości motorycznych towarzyszące usuwaniu łańcuchów lekkich mogą być wywołane destabilizacją ciężkiego łańcucha miozyny [17]. Obecnie wiadomo jednak, że funkcja łańcuchów lekkich jest bardziej złożona. Oprócz fundamentalnej roli strukturalnej, którą pełnią łańcuchy lekkie wszystkich typów mięśni, w mięśniach gładkich kręgowców i mięśniach prążkowanych mięczaków ich rola polega również na regulacji aktywności domeny motorycznej [20], a w mięśniach prążkowanych kręgowców na jej modulacji [21, 22].

III-1. Regulacja (lub modulacja) aktywności motorycznej miozyny

Nieufosforylowane regulujące łańcuchy lekkie działają jako represor aktywności motorycznej miozyny z mięśni gładkich [23]. Fosforylacja jej Ser^{19} umożliwia tworzenie przez miozynę filamentów, prowadzi do około 100-krotnego wzrostu szybkości hydrolizy ATP przez kompleks aktomiozynowy, a także powoduje znaczny wzrost szybkości ruchu filamentów aktynowych w testach ruchliwości *in vitro* [24]. Regulacji aktywności motorycznej przez fosforylację podlega natywna miozyna, bądź jej proteolityczny fragment, ciężka meromiozyna, zawierająca dwie główki i określonej długości odcinek superhelisy. Aktywność miozyny jednogłówkowej, jak też samych główek miozynowych nie jest regulowana, mimo, że zawierają one łańcuchy lekkie [25, 26]. Sugeruje to, że dla regulacji aktywności motorycznej miozyny poprzez fosforylację istotna jest obecność dwóch główek. Na asocjację dwóch główek nieufosforylowanej miozyny z mięśni gładkich wskazywały wcześniejsze wyniki ich chemicznego sieciowania i mikroskopii elektronowej [15, 27-29]. Można przypuszczać, że podobnie jak to ma miejsce w przypadku monomerycznej miozyny w warunkach *in vitro* [30], również w przypadku filamentów oddziaływania elektrostatyczne między główkami nieufosforylowanej miozyny, lub/i oddziaływania regulujących łańcuchów z ciężkimi blokują uwalnianie produktów hydrolizy ATP z miejsca katalitycznego, co w konsekwencji prowadzi do hamowania aktywności domeny motorycznej. Fosforylacja Ser^{19} poprzez zmniejszenie dodatniego ładunku N-końcowego odcinka regulującego łańcucha w każdej z dwu główek

A

Gatunek		Mięśnie
kura	---APKKAKKRIEGAN--SNVFSMFEQAQIQEFKEAFTIMDQNRDGFIDKADLRDTFAAL	
człowiek	---APKKAKKRAGGAN--SNVFSMFEQTQIQEFKEAFTIMDQNRDGFIDKNDLRDTFAAL	
mysz	---APLFAKKRIEGGT--SNVFSMFEQTQIQEFKEAFTIMDQNRDGFIDKNDLRDTFAAL	Sercowe
szczur	---SPKKAKKRLEGG--SNVFSMFEQTQIQEFKEAFTIMDQNRDGFIDKNDLRDTFAAL	
kura	----PKKAKRRAAEGS--SNVFSMFDQTQIQEFKEAFTVIDQNRDGIIDKDDLRETFAAM	
królik	---APKKAKRRAAEGGS-SNVFSMFDQTQIQEFKEAFTVIDQNRDGIIDKEDLRDTFAAM	Szkieletowe
szczur	---APKKAKRRAAEG-S-SNVFSMFDQTQIQEFKEAFTVIDQNRDGIIDKEDLRDTFAAM	
kura	SSKRAKAKTTKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHDMMLASM	
świnia	SSKRAKAKTTKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHDMMLASL	Gładkie
człowiek	SSKRAKAKATKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHDMMLASL	
szczur	SSKRAKT KTTKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHDMMLASM	
halocynthia r.	-----ATSNVFSMFDQSQIQEFKEAFTMIDANRDGFIDQEDLKDITYASL	
placopecten	-----ADKAASGVLTCLPQKQIQEMKEAFSMIDVDRDGFVNKDDLKAISEQL	
chlamys n.	-----ADKAASGVLTCLPQKQIQEMKEAFSMLDVRDGFVNKDDLKAISEQL	Mięczaków
aquiptecten	-----ADKAASGVLTCLPQKQIQEMKEAFSMIDVDRDGFVSKEDIKAISEQL	
patinopecten	-----ADKAASGVLTCLPQKQIQEMKEAFSMIDVDRDGFVSKDDIKAISEQL	

B

Gatunek		Mięśnie
kura	AYIKEMLMTQEGRFSEQEIDQMFAAFPDPVSGNLDYKNLVHVIITHGEEKD--	
człowiek	DYVREMLTTQAERFSKEEVDQMFAAFPDPVTGNLDYKNLVHVIITHGEEKD--	
mysz	DYVREMLTTQAERFSKEEIDQMFAAFPDPVTGNLDYKNLVHVIITHGEEKD--	Sercowe
szczur	DYVREMLTTQAERFSKEEIDQMFAAFPDPVTGNLDYKNLVHVIITHGEEKD--	
kura	SFLEELLTTQCDRFTPEEIKNMWAAFPPDVAGNVDYKNICYVITHGEDKEGE	
królik	QFLEELLITQCDRFSQEEIKNMWAAFSPDVGGNVDYKNICYVITHGDAKDQE	Szkieletowe
szczur	QFLEELLTTQCDRFSQEEIKNMWAAFPPDVGGNVDYKNICYVITHGDAKDQE	
kura	DHLRELLTTMGDRFTDEEVDEMYREAPIDKKGNFNVEFTRI LKHGAKDKDD	
świnia	DHLRELLTTMGDRFTDEEVDEMYREAPIDKKGNFNVEFTRI LKHGAKDKDD	Gładkie
człowiek	DHLRKLTTMGDRFTDEEVDEMYREAPVDKKGNFNVEFTRI LKHGAKDKHD	
szczur	DYLRRELLTTMGDRFTDEEVDELYREAPIDKKGNFNVEFTRI LKHGAKDKDD	
halocynthia r.	NYLAEIMMTQADRFSEQSEVNQMFDISPIDVAGNLDYKSLCYIITHGQEEEE--	
placopecten	EYIKDLLENMGDNFTKDEMRMTFKEAPVT-GGKFDYVKFTAMIKSGEEDDA-	
chlamys n.	EYIKDLLENMGDNFTKDEMRMTFKEAPVT-GGKFDYVKFTAMIKSGEDDA-	Mięczaków
aquiptecten	EYIKDLLENMGDNFNKDEMRMTFKEAPVE-GGKFDYVKFTAMIKSGEEDDA-	
patinopecten	EYIKDLLEDGMNFNKDEMRMTFKEAPVE-GGKFDYVKFTAMIKSGEDEDA-	

Ryc. 2. Fragmenty sekwencji łańcuchów regulujących z różnych typów mięśni wybranych gatunków. (A) N-końcowy fragment łańcuchów regulujących. Zaznaczono tłustym drukiem serynę ulegającą fosforylacji w mięśniach sercowym, szkieletowym i gładkim a drukiem pochyłym pozytywnie naładowane reszty lizyny i argininy ważne dla rozpoznawania przez kinazę lekkich łańcuchów miejsca fosforylacji na serynie. (B) C-końcowa część sekwencji łańcuchów regulujących. Tłustym drukiem zaznaczono w sekwencjach łańcuchów z mięśni gładkich reszty argininowe prawdopodobnie biorące udział w oddziaływaniu z grupą fosforanową przyłączoną do ulegającej fosforylacji seryny. Ustawienia sekwencji dokonano przy pomocy programu Antheprot [13, 14].

miozyny, może wpływać na te oddziaływania. Ocena znaczenia zmian wypadkowego ładunku w procesie regulacji przeprowadzono przy zastosowaniu licznych mutacji N-końca regulujących łańcuchów. Zmiana ładunku w rejonie obejmującym Arg¹³-Ser¹⁹, podobna do zmiany wywołanej przez fosforylację Ser¹⁹, powodowała wzrost generowanej przez mięsień siły i utrzymywała miozynę z mięśni gładkich w postaci filamentów, nie wpływając jednakże na aktywność ATPazy aktomiozynowej i ruch filamentów aktynowych [31]. Zatem regulacji aktywności motorycznej

miozyny przez fosforylację nie można tłumaczyć wyłącznie zmianami wypadkowego ładunku. Mutacje C-końcowych fragmentów regulujących łańcuchów pokazały, że odgrywają one istotną rolę w przekazywaniu informacji o zmianach konformacyjnych N-końców wywołanych przez fosforylację Ser¹⁹ do łańcuchów ciężkich obu główek miozynowych [30]. W ten sposób wykazano, że aktywacja ATPazy i ruchu filamentów aktynowych nie zależy wyłącznie od zmian ładunku na końcu N regulujących łańcuchów, ale także od przestrzennych uwarunkowań, które są speł-

nione tylko przez reszty fosforanowe [31], a ponadto zależy od właściwego ustawienia rejonu końca C regulującego łańcucha w stosunku do odpowiedniego odcinka stabilnej superhelisy łańcucha ciężkiego w każdej z dwu główek [32, 33].

Regulujące łańcuchy lekkie miozyny mięśni mięczaków mimo, że w pozycji 6 mają resztę serynową, homologiczną do fosforylowanej seryny regulujących łańcuchów z mięśni gładkich, nie ulegają fosforylacji z powodu braku dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych w rejonie ich N-końców, które niezbędne są dla katalitycznej aktywności kinazy [34] (Ryc. 2). Hamowanie aktywności motorycznej miozyny mięczaków przez regulujące łańcuchy lekkie jest znoszone przez wiązanie Ca^{2+} z 9 resztami aminokwasowymi N końcowej, nietypowej pętli istotnych łańcuchów lekkich, a stabilizowane przez szereg połączeń z resztami amonokwasowymi należącymi zarówno do regulujących łańcuchów (pętli trzeciej i czwartej) jak i łańcuchów ciężkich [11, 35]. Ta stabilizacja wynika z właściwej orientacji wzajemnej wszystkich trzech łańcuchów domeny regulatorowej każdej z dwu główek miozyny, koniecznej dla utworzenia miejsca wiązania Ca^{2+} [5, 36]. Usunięcie regulujących łańcuchów powoduje zanik wrażliwości na Ca^{2+} , aktywowanej przez aktyne, ATPazy miozynowej i 10-15-krotne obniżenie szybkości ruchu filamentów aktynowych (w teście ruchliwości *in vitro*) [37]. Podobny efekt wywołuje delecja 12 lub więcej C-końcowych reszt aminokwasowych regulujących łańcuchów [38]. Zatem, podobnie jak w przypadku mięśni gładkich C-końcowa połowa regulujących łańcuchów jest niezbędna dla regulacji aktywności motorycznej miozyny mięczaków. Przypuszcza się, że w obu przypadkach bierze ona udział w transmisji zmian konformacyjnych (wywołanych modyfikacją miozyny przez fosforylację, bądź wiązanie Ca^{2+}) z domeny regulatorowej do domeny motorycznej [20]. Hamowanie aktywności motorycznej miozyny mięczaków, tak samo jak miozyny mięśni gładkich, spowodowane jest asocjacją dwu główek, prawdopodobnie za pomocą regulujących łańcuchów, oraz główek z superhelisą łańcucha ciężkiego [39]. Dla pełniejszego zrozumienia mechanizmu regulacji ważne byłyby informacje na temat struktury regulowanej miozyny w stanie nieaktywnym, które można by uzyskać poprzez krystalizację jej dwugłównego fragmentu.

Sekwencja reszt aminokwasowych komponent domeny regulatorowej miozyny mięśni mięczaków i mięśni gładkich jest w znacznym stopniu konserwatywna [12]. Zastąpienie regulujących łańcuchów lekkich w miozynie mięśni mięczaków regulującymi łańcuchami z mięśni gładkich nie wpływa na regulację jej aktywności motorycznej przez Ca^{2+} [40]. Jednakże istotne łańcuchy lekkie miozyny z mięśni gładkich nie są zdolne do specyficznego wiązania Ca^{2+} nawet w przypadku, gdy pozostałe elementy domen regulującej (łańcuch regulujący i ciężki) pochodzą z mięśni

mięczaka [11].

Sekwencja reszt aminokwasowych regulujących lek- kich łańcuchów miozyny z mięśni szkieletowych znacznie bardziej różni się od sekwencji reszt regulujących łańcuchów miozyny z mięśni gładkich i mięśni mięczaków [12]. Wymiana regulujących łańcuchów z mięczaków na regulujące łańcuchy z mięśni szkieletowych powoduje zanik regulacji przez Ca^{2+} [40]. Podobny zanik regulacji przez fosforylację miozyny mięśni gładkich obserwuje się po zastąpieniu jej regulujących łańcuchów, regulującymi łańcuchami z mięśni szkieletowych [41]. Chimery regulujących łańcuchów utworzone przez połączenie połówek łańcuchów z mięśni gładkich i szkieletowych pokazały, że za zanik regulacji odpowiedzialne są różnice w sekwencji C-końcowej połowy łańcuchów szkieletowych [33]. Porównanie sekwencji obu rodzajów łańcuchów ujawniło brak w C-końcowej połowie łańcuchów z mięśni szkieletowych m.in. reszt argininy (Ryc. 2), które prawdopodobnie biorą udział w koordynacji fosforanu fosfoseryny w regulujących łańcuchach mięśni gładkich [42]. Ponadto wykazano, że powinowactwo regulujących łańcuchów lekkich miozyny z mięśni szkieletowych do łańcuchów ciężkich miozyny z mięśni gładkich jest 100 razy niższe niż regulujących łańcuchów z mięśni gładkich [33]. Opisane wyżej różnice sprawiają, że regulujące łańcuchy lekkie miozyny z mięśni szkieletowych nie mogą brać udziału w regulacji działania domeny motorycznej w taki sposób, jak to czynią regulujące łańcuchy miozyny z mięśni gładkich i mięśni mięczaków. Tym niemniej są dowody na to, że spełniają one rolę modulującą działanie domeny motorycznej (patrz następny podrozdział).

III-2. Wpływ łańcuchów lekkich na generację siły i szybkość skurczu mięśni

Badania generacji siły (napięcia) przez miozynę rekonstruowaną z łańcuchów ciężkich i różnych łańcuchów lekkich mięśni szkieletowych wykazały, że istotne łańcuchy lekkie są niezbędne do pełnej generacji siły. Miozyna pozbawiona tych łańcuchów wytwarzała siłę o 60% niższą od miozyny mającej obydwa rodzaje łańcuchów lekkich [43]. Tego faktu nie można tłumaczyć wyłącznie destabilizacją helikalnego fragmentu łańcucha ciężkiego, do którego wiąże się istotny łańcuch lekki. Usuwanie bowiem regulującego łańcucha, który wiąże się w sposób podobny do łańcucha ciężkiego w każdej z dwu główek miozyny nie ma wpływu na generację siły. Zmniejszenie siły generowanej przez miozynę pozbawioną istotnych łańcuchów wynika prawdopodobnie nie tylko ze zmniejszonej liczby mostków między miozyną i aktyną, lecz także ze zmian w kinetyce tworzenia mostków. Wskazuje na to, skrócony o 30% cykl roboczy mostków (ang. *duty cycle*) (część całkowitego cyklu mostków, w czasie którego miozyna jest połączona z aktyną i generuje ruch) po usunięciu istotnych łańcuchów lekkich [43].

Wykazano, że ekstrakcja regulujących łańcuchów z włókien mięśni szkieletowych powoduje zmniejszenie izometrycznego napięcia, co świadczy o ich wpływie na kientykę cyklicznego tworzenia i dysocjacji mostków pomiędzy filamentami miozynowymi i aktynowymi [44]. Ostatnio opublikowane badania [45] wskazują, że główną funkcją łańcuchów lekkich miozyny z mięśni szkieletowych jest stabilizacja C-końcowego fragmentu łańcucha ciężkiego główki. Zastąpienie bowiem na drodze manipulacji genetycznych jej domeny regulatorowej przez sztywny fragment α -aktyliny nie zmienia właściwości motorycznych główek.

Fosforylacja Ser¹³ regulujących łańcuchów miozyny mięśni szkieletowych powoduje wzmacnianie siły, wytwarzanej przy niskim poziomie aktywacji przez Ca²⁺. Odbywa się to, jak sugerują jedni autorzy [22, 46, 47], poprzez odchylenie główek miozynowych od trzonu filamentu, lub jak sugerują inni [48, 49], poprzez dezorganizację główek, co może wskazywać na ich zwiększoną ruchliwość i dostępność dla aktyny. Podobne, związane ze zmianą ładunku, efekty uzyskano wstawiając regulujące ufosforylowane łańcuchy lekkie z mięśni gładkich do mięśni prążkowanych mięczaków [47, 50].

Dla regulacji aktywności motorycznej miozyny z mięśni gładkich przez fosforylację istotne łańcuchy lekkie nie są potrzebne [20]. Ich rola polega na stabilizacji domeny łańcucha ciężkiego z którym się wiąże, co jest niezbędne dla pełnej aktywności domeny motorycznej miozyny. Aktywność motoryczna miozyny zawierającej tylko ufosforylowane regulujące łańcuchy jest znacznie niższa od tej, która zawiera również istotne łańcuchy [23].

IV. Izoformy łańcuchów lekkich miozyny i ich znaczenie funkcjonalne

Tabela 1 prezentuje izoformy lekkich łańcuchów miozyny występujące w mięśniach dorosłego osobnika rodziny kręgowców. W mięśniach szkieletowych występują dwie izoformy istotnych łańcuchów lekkich charakterystyczne dla mięśnia szkieletowego szybkie-

go: długa (21 kDa) i krótka (16 kDa), oraz dwie izoformy charakterystyczne dla mięśnia szkieletowego wolnego: a i b (obie długie). Izoforma wolna b jest jednocześnie izoformą spotykaną w komorach sercowych. W przedsionkach serca dorosłego osobnika występuje izoforma charakterystyczna dla fazy embrionalnej organizmu. Różnorodność występowania izoform łańcucha regulującego w tych typach mięśni jest mniejsza i ogranicza się do izoform typowych dla miozyny z mięśni szkieletowych szybkich, szkieletowych wolnych, będących jednocześnie formą występującą w komorach serca, oraz izoformy przedsionkowej serca.

Najlepiej poznany jest wpływ występowania określonej izoformy łańcucha lekkiego na właściwości miozyny dla mięśnia szkieletowego szybkiego. Jak już wspomniano, w mięśniach tych mogą występować dwie izoformy łańcucha istotnego: długa i krótka. Są one produktem ekspresji tego samego genu w wyniku alternatywnego wycinania intronów (ang. *alternative splicing*) [51]. W mięśniu szkieletowym szybkim królika izoforma długa istotnego łańcucha lekkiego ma taką samą sekwencję jak izoforma krótka na odcinku 141 C-końcowych reszt aminokwasowych. Dodatkowy fragment zawierający 41 reszt jest obecny na N-końcu łańcucha. Pomiędzy tymi 41 resztami aminokwasowymi a odcinkiem 141 reszt znajduje się fragment 8-miu reszt, homologicznych dla obydwu łańcuchów (Ryc. 3). Miozyny zawierające te dwie izoformy istotnych łańcuchów mało się różnią. Jednakże główki miozyny zawierające izoformę długą mają większe powinowactwo do aktyny niż te, które zawierają izoformę krótką [52-54]. Równocześnie główka miozynowa zawierająca długą izoformę łańcucha istotnego przyspiesza znacznie efektywniej polimeryzację monomerycznej aktyny, niż główka zawierająca izoformę krótką [55]. W doświadczeniach przy użyciu testu ruchliwości stwierdzono, że miozyna zawierająca tylko izoformę długą łańcucha istotnego porusza filamenty aktynowe z prędkością dwa razy mniejszą niż miozyna zawierająca tylko izoformę krótką [56]. Zjawiska te mogą być efektem wiązania się N-końcowego fragmentu długiej izoformy z C-końcem ak-

Tabela 1.

Izoformy łańcuchów lekkich miozyny występujące w różnych mięśniach dorosłych osobników z rodziny kręgowców.

Typ mięśni	Łańcuchy istotne	Łańcuchy regulujące
szkieletowy szybki	2 izoformy (długa i krótka)	1 izoforma (szybki)
szkieletowy wolny	2 izoformy a (wolny) i b (wolny/komorowy)	1 izoforma (wolny/komorowy)
sercowy	2 izoformy (przedsionkowo/embrionalny i wolny/komorowy)	2 izoformy (przedsionkowy i komorowy/wolny)
gładki	2 izoformy (mięśniowy i niemięśniowy)	2 izoformy (mięśniowy i niemięśniowy)

długi	PKKNVKKPAA	AAAPAPKAPA	PAPAPAPAPK	E EKIDLSAIK	IEFSKEQODE
	10	20	30	40	50
krótki					SFSADQIAE
długi	FKEAFLLYDR	TGDSKITLSQ	VGDMVLRALGT	NPTNAEVKKV	LGNPSDEOMN
	60	70	80	90	100
krótki	FKEAFLLYDR	TGDSKITLSQ	VGDMVLRALGT	NPTNAEVKKV	LGNPSDEOMN
długi	AKKIEFEQFL	PMLQAISNNK	DQGTYEDEFVE	GLRVEDKEGD	TVGMGAELRH
	110	120	130	140	150
krótki	AKKIEFEQFL	PMLQAISNNK	DQGTYEDEFVE	GLRVEDKEGD	TVGMGAELRH
długi	VLATLGEKMK	EEVEALMAG	QEDSNGCINY	EAFVKHIMSI	
	160	170	180	190	
krótki	VLATLGEKMK	EEVEALMAG	QEDSNGCINY	EAFVKHIMSI	

Ryc. 3. Porównanie sekwencji długiej i krótkiej izoformy istotnego łańcucha lekkiego z mięśni szkieletowych szybkich królika. Obszary o identycznej lub podobnej sekwencji przedstawiono jako zacieniowane.

tyny [57, 58]. Sekwencje N-końców długiej izoformy istotnego łańcucha lekkiego z różnych źródeł są przedstawione na rycinie 4. Ich porównanie ujawnia charakterystyczne elementy: obecność czterech reszt lizyny na samym N-końcu, które prawdopodobnie są odpowiedzialne za oddziaływanie z C-końcem aktyny [59] a także obecność odcinka bogatego w powtórzenia Ala-Pro stanowiącego prawdopodobnie sztywne ra-

mię umożliwiające dotarcie do miejsca docelowego na aktywie wspomnianych lizyn. Koncepcja ta jest obecnie sprawdzana w wielu laboratoriach [22]. Ostatnio stwierdzono, że oddziaływanie N-końca długiej izoformy istotnego łańcucha lekkiego z aktyną ma bardzo duże znaczenie przy generacji siły we włóknach mięśniowych [60] oraz wpływa na aktywność ATPazy miofibrylarnej [61]. Efekty te stwierdzono przy sub-

ChCs	193	-PPKKPEP--KK	APEPKKEEPK	PAPKPA----	---EPEPKKE	--VEFNPASI---	KV--	
HmVSb	194	-APKKPEP--KK	D-DAK-AAPK	AAPAPAPPP-	---EPERPKE	--VEFDASKI---	KI--	
RtVSb	199	-APKKPEP--KK	D-DAKTAAPK	AAPAPAAAPA	AAPEPERPKE	--AEFDASKI---	KI--	
HmEA	196	-APKKPEP--KK	EAAKPAPAPA	PAPAPAPAP-	---APEAPKE	--PAFDPKSV---	KI--	
MsEA	192	-PPKKPEP--KK	EAAKPAAPAA	PAASAAPEP-	---L-----	---KD	--SAFDPKSV---	KI--
RtEA	192	-PPKKPEP--KK	ETAKVAAAPA	PAPAPAPEP-	---L-----	---RD	--SAFDPKSV---	KI--
ChEB	185	MPLKKPDP--KK	DAKAAAAAPE	VP-----	-----KE	--FTFDPKSV---	KI--	
ChFS1	190	--PKK-DV--KK	P---AAAAAPA	PAPAPAPAP-	---APAKPKE	--PAIDLKSI---	KI--	
HmFS1	193	-APKK-DV--KK	PVAAAAAAPA	PAPAPAPAP-	---APAKPKE	--EKIDLSAI---	KI--	
RbFS1	191	-APKK-DV--KK	P---AAAAAPA	PAPAPAPAP-	---APAKPKE	--EKIDLSAI---	KI--	
MsFS1	187	-APKK-DV--KK	P-----AAA-	PAPAPAPAP-	---APAKPKE	--EKIDLSAI---	KI--	
RtFS1	188	-APKK-DV--KK	P-----AAAA	PAPAPAPAP-	---APAKPKE	--EKIDLSAI---	KI--	
HmSa	208	MPPKK-DVPVKK	PAGPSISKPA	AKPAAAGAPP	AKTKAEPAPV	QAQKTQEP	PPVDLSKVV	
		P** DP **	AA A	PAPAPAPAP	P PKE	FD	I *I	

Ryc. 4. Porównanie sekwencji N-końcowych odcinków różnych izoform istotnych łańcuchów lekkich. Wytluszczonym drukiem zaznaczono reszty lizyn prawdopodobnie biorących udział w oddziaływaniu z C-końcem aktyny. Oznaczenia izoform: ChCs — kura — z mięśnia sercowca; HmVSb — człowiek — komory serca, mięśnie szkieletowe wolne typ b; RtVSb — szczur — komory serca, mięśnie szkieletowe wolne typ b; HmEA — człowiek — przedsionki serca, mięśnie embrionalne; MsEA — mysz — przedsionki serca, mięśnie embrionalne; RtEA — szczur — przedsionki serca, mięśnie embrionalne; ChEB — kura — forma embrionalna; ChFS1 — kura — mięsień szkieletowy szybki, forma długa; HmFS1 — człowiek — mięsień szkieletowy szybki, forma długa; RbFS1 — królik — mięsień szkieletowy szybki, forma długa; MsFS1 — mysz — mięsień szkieletowy szybki, forma długa; RtFS1 — szczur — mięsień szkieletowy szybki, forma długa; HmSa — człowiek — mięsień szkieletowy.

maksymalnych stężeniach Ca^{2+} , co sugeruje współdziałanie N-końca długiej izoformy istotnego łańcucha lekkiego z systemem regulującym troponinowo-tropomioszynowym filamentu aktynowego. Wskazuje na to zmniejszenie stopnia regulacji układu ATPazy aktomiozyny sercowej po selektywnym skróceniu od strony N-końca łańcucha istotnego [62]. Współdziałanie istotnego łańcucha z systemem regulującym filamentu aktynowego wydaje się być logiczne, biorąc pod uwagę fakt, iż długa izoforma istotnych łańcuchów lekkich występuje tylko w mięśniach szkieletowych szybkich i wolnych oraz mięśniu sercowym, regulowanych dominująco przez układ troponinowo-tropomioszynowy. Forma istotnego łańcucha lekkiego miozyny ma prawdopodobnie duży wpływ na oddziaływanie między aktyną i miozyną w tym typie mięśni.

Zarówno regulujące jak i istotne łańcuchy lekkie miozyny mięśni gładkich występują w dwu formach polimorficznych [63, 64] (Tab. 1). Jednakże tylko izoformy istotnych łańcuchów mięśni ssaków różniące się pięcioma podstawieniami w dziewięciu C-końcowych resztach aminokwasowych wpływają na aktywność motoryczną miozyny. Miozyna z mięśni trzewnych, w której przeważa izoforma „mięśniowa” (typowa dla mięśni gładkich) istotnego łańcucha charakteryzuje się szybszą kinetyką hydrolizy ATP (V_{max}) i większym powinowactwem do aktyny, niż miozyna z mięśni naczyniowych, w których przeważa ilość izoformy charakterystycznej dla komórek niemięśniowych [65, 66]. W konsekwencji spadek maksymalnej szybkości skracania włókien mięśni gładkich różnego typu jest proporcjonalny do zawartości w nich izoformy niemięśniowej [67].

Zwieracz małży składa się z dwóch typów mięśni: szybkich mięśni fazowych (w przypadku przegrzebka — mięśni prążkowanych) i wolniejszych mięśni tonicznych wyspecjalizowanych w wytwarzaniu napięcia, które służy utrzymywaniu muszli w stanie zamkniętym [68]. Mięśnie fazowe mają 4-5 razy wyższą aktywność ATPazy miozynowej w obecności aktyny. Badając sekwencję cDNA łańcuchów lekkich miozyny mięśni mięczaków stwierdzono, że istotne łańcuchy nie wykazują zasadniczych różnic, natomiast regulujące występują w trzech izoformach: dwóch charakterystycznych dla mięśni tonicznych i jednej charakterystycznej dla mięśni fazowych [69]. Te trzy izoformy regulujących łańcuchów są produktem tego samego genu i powstają poprzez alternatywne wycinanie intronów w rejonie 5'. Tylko sekwencje 52 ich N-końcowych reszt aminokwasowych różnią się. Badanie aktywności enzymatycznej hybryd utworzonych z łańcuchów ciężkich miozyny z mięśni fazowych i z mięśni tonicznych, istotnych łańcuchów lekkich i każdej z trzech izoform regulujących łańcuchów wykazały, że tylko różnice w budowie łańcuchów ciężkich, a nie regulujących łańcuchów mięśni zwieracza małży są odpowiedzialne za specyficzne różnice w aktywności enzymatycznej

tych dwóch typów miozyny.

IV. Podsumowanie

Funkcją domeny motorycznej miozyny jest hydroliza ATP, wiązanie aktyny i generacja ruchu. Lekkie łańcuchy są niezbędne dla sprawnego działania domeny motorycznej t.j. dla uzyskania wymaganej siły i szybkości jej generacji, a także do regulacji aktywności domeny motorycznej. Jej hamowanie jest prawdopodobnie spowodowane asocjacją dwu główek a także ich interakcją z helikalnym fragmentem ciężkiego łańcucha. Sygnał do aktywacji domeny motorycznej indukowany modyfikacją regulujących łańcuchów (poprzez fosforylację lub wiązanie Ca^{2+}) jest transmitowany wzdłuż ciężkiego łańcucha do każdej z główek miozyny, lub poprzez główki zasocjowane ze sobą.

Z poprzedzającego artykułu K a s p r z a k a [70] wynika, że przepływ informacji może zachodzić również w drugą stronę: małe zmiany konformacyjne zachodzące w domenie motorycznej mogą być transmitowane do domeny regulującej poprzez ciężki łańcuch, który działając jak ramię dźwigni powoduje ich wzmocnienie i w konsekwencji obrót domeny regulującej. Ten proces odgrywa prawdopodobnie rolę w sprzężeniu mechanochemicznym zachodzącym w mięśniu.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować Dr Robertowi M a k u c h o w i i Doc. Sławomirowi P i k u l e za pomoc w przygotowaniu rycin. Praca częściowo finansowana przez Komitet Badań Naukowych w ramach projektów badawczych No: 6P 04A 056 09 i 6 PO4A 020 08.

Artykuł otrzymano 12 maja 1997 r.

Zaakceptowano do druku 5 czerwca 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Sellers JR, Goodson HV, Wang F (1996) *J Muscle Res Cell Motil* **17**: 7-22
2. Dąbrowska R (1994) *Post Biochem* **40**: 96-105
3. Katoh T, Lowey S (1989) *J Cell Biol* **109**: 1549-1560
4. Rayment Y, Rypniewski WR, Schmidt-Böse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM (1993) *Science* **261**: 50-58
5. Xie X, Harrison DH, Schlichting I, Sweet RM, Kalabokis VN, Szent-Györgyi AG, Cohen C (1994) *Nature (Lond)* **368**: 306-312
6. Kretsinger RH (1980) *CRC Crit Rev Biochem* **8**: 119-174
7. Dąbrowska R (1996) *Post Biochem* **42**: 195-203
8. Collins JH (1991) *J Muscle Res Cell Motil* **12**: 3-25
9. Da Silva ARC, Kendrick-Jones J, Reinach FC (1995) *J Biol Chem* **270**: 6773-6778
10. Holroyde M, Potter JD, Solaro J (1979) *J Biol Chem* **254**: 6478-6482
11. Robertson SP, Johnson JD, Potter JD (1981) *Biophys J* **34**: 559-569
12. Kalabokis VN, O'Neill-Hennessey E, Szent-Györgyi AG (1994) *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 547-553

13. Deleage G, Clerc FF, Roux B (1989) *CABIOS* 5: 159-160
14. Deleage G, Clerc FF, Roux B, Gautheron DC (1988) *CABIOS* 4: 351-356
15. Wolf-Long VL, Saraswat LD, Lowey S (1993) *J Biol Chem* 268: 23162-23167
16. Szent-Györgyi AG, Chantler P (1994) W: Engel AG, Franzini-Armstrong C, (red) Myology, McGraw-Hill Book Co, New York, str 506-528
17. Trybus KM, Waller GS, Chatman T (1994) *J Cell Biol* 124: 963-969
18. Lowey S, Waller GS, Trybus KM (1993) *Nature (Lond)* 365: 454-456
19. Makuch R, Stępkowski D (1993) *Acta Biochem Polon* 40: 353-362
20. Trybus KM (1994) *J Muscle Res Cell Motil* 15: 587-594
21. Sweeney HL, Bowman BF, Stull JT (1993) *Am J Physiol* 264: C1085-C1095
22. Stępkowski D (1995) *FEBS Lett* 374: 6-11
23. Katoh T, Morita F (1996) *J Biol Chem* 271: 9992-9996
24. Sellers JR (1991) *Curr Opin Cell Biol* 3: 98-104
25. Hasegawa Y, Tanahashi K, Morita F (1990) *J Biochem (Tokyo)* 108: 909-913
26. Cremo CR, Sellers JR, Facemyer KC (1995) *J Biol Chem* 270: 2171-2175
27. Onishi H, Maita T, Matsuda G, Fujiwara K (1992) *Biochemistry* 31: 1201-1210
28. Katoh T, Tanahashi K, Hasegawa Y, Morita F (1995) *Eur J Biochem* 227: 459-465
29. Katoh T, Morita F (1995) *Eur J Biochem* 233: 123-131
30. Cross RA, Sobieszek A (1986) *EMBO J* 5: 2637-2641
31. Sweeney HL, Yang Z, Zhi G, Stull JT, Trybus K (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1490-1494
32. Ikebe M, Reardon S, Mitani Y, Komisoyama H, Matsuura M, Ikebe R (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9096-9100
33. Trybus KM, Chatman TA (1993) *J Biol Chem* 268: 4412-4419
34. Kemp BE, Stull JT (1990) W: Kemp BE (red) Peptides and protein phosphorylation, CRC, Boca Raton, FL, str 115-133
35. Ankrett RJ, Rowe AJ, Cross RA, Kendrick-Jones, Bagshaw CR (1991) *Mol Biol* 217: 323-335
36. Jancsó A, Szent-Györgyi AG (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8762-8766
37. Vale RD, Szent-Györgyi AG, Sheetz MP (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6775-6778
38. Rowe T, Kendrick-Jones J (1993) *EMBO J* 12: 4877-4884
39. Kalabokis VN, Vibert P, York ML, Szent-Györgyi AG (1996) *J Biol Chem* 271: 26779-26782
40. Sellers JR, Chantler PD, Szent-Györgyi AG (1980) *J Mol Biol* 144: 223-245
41. Trybus KM, Lowey S (1988) *J Biol Chem* 263: 16485-16492
42. Yang Z, Sweeney HL (1995) *J Biol Chem* 270: 24646-24649
43. VanBuren P, Waller GS, Harris DE, Trybus KM, Warshaw DM, Lowey S (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12403-12407
44. Szczesna D, Zhao J, Potter JD (1996) *J Biol Chem* 271: 5246-5250
45. Anson M, Geeves MA, Kurzawa SE, Manstein DJ (1996) *EMBO J* 15: 6069-6074
46. Bărâny K, Bărâny M, Gillis JM, Kushmerick MJ (1979) *J Biol Chem* 254: 3617-3623
47. Metzger JM, Greaser ML, Moss RL (1989) *J Gen Physiol* 93: 855-883
48. Craig R, Padron R, Kendrick-Jones J (1987) *J Cell Biol* 105: 1319-1327
49. Levine RJC, Chantler PD, Kensler RW, Woodhead JL (1991) *J Cell Biol* 113: 563-572
50. Sweeney HL, Stull JT (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 414-418
51. Matsuda G, Maita T, and Umegane T (1981) *FEBS Lett* 126: 111-113
52. Weeds AG, Taylor RS (1975) *Nature (Lond)* 257: 54-56
53. Wagner PD, Slayter CS, Pope B, Weeds AG (1979) *Eur J Biochem* 99: 385-394
54. Hayashibara T, Miyanishi T (1994) *Biochemistry* 33: 12821-12827
55. Chaussepied P, Kasprzak AA (1989) *Nature (Lond)* 342: 950-953
56. Lowey S, Waller GS, Trybus KM (1993) *J Biol Chem* 268: 20414-20418
57. Prince HP, Trayer HR, Henry GD, Trayer IP, Dalgarno DC, Levine BA, Cary PD, Turner C (1981) *Eur J Biochem* 121: 213-266
58. Milligan RA, Whittaker M, Safer D (1990) *Nature (Lond)* 348: 217-221
59. Sutoh K (1982) *Biochemistry* 21: 3654-3661
60. Morano I, Ritter O, Bonz A, Timek T, Vahl C, Michel G (1995) *Circ Res* 76: 720-725
61. Rarick HM, Oppenorth TJ, von Geldern TW, Wu-Wong JR, Solaro JR (1996) *J Biol Chem* 271: 27039-27043
62. Moczarska A, Kąkol I (1995) *Biochem Molec Biol Int* 37: 765-772
63. Kumar CC, Mohan SR, Zavodny PL, Narula SK, Leibowitz PJ (1989) *Biochemistry* 28: 4029-4035
64. Lash JA, Helper DJ, Klug M, Nikolozakes AW, Hathaway DR (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 7176-7183
65. Helper DJ, Lash JA, Hathaway DR (1988) *J Biol Chem* 263: 15748-15753
66. Hasegawa Y, Morita F (1992) *J Biochem (Tokyo)* 111: 804-809
67. Malmqvist U, Arner A (1991) *Pflüg Archiv* 418: 523-530
68. Rüegg JC (1971) *Physiol Rev* 51: 201-248
69. Prereault-Micale CL, Jancsó A, Szent-Györgyi AG (1996) *J Muscle Res Cell Motil* 17: 533-542
70. Kasprzak A (1997) *Post Biochem* 43:



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”.

Dystrofia miotoniczna — mutacja dynamiczna i patogeneza choroby

Myotonic dystrophy — dynamic mutation and the disease pathogenesis

ŁUKASZ HUMINIECKI¹,
RYSZARD SŁOMSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Gen i białko kinazy miotoninowej
- III. Dystrofia miotoniczna jako jedna z chorób powodowanych mutacjami dynamicznymi
- IV. Mechanizm patogenezy dystrofii miotonicznej
- V. Niestabilność międzypokoleniowa i somatyczna
- VI. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: DM — dystrofia miotoniczna (ang. *myotonic dystrophy*); Mt-PK — kinaza miotoninowa (ang. *myotonin protein kinase*); OMIM — baza danych chorób genetycznych człowieka; PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy; FRAXA, FRAXE — dwa zespoły chorobowe związane z łamliwymi miejscami na chromosomie X; FRA11B — zespół chorobowy związany z łamliwym miejscem na autosomie 11; FRA16A, FRAXF — dwa miejsca łamliwe (odpowiednio na autosomie 16 i chromosomie X) niepowiązane z żadnym patologicznym fenotypem; EPM1 — postępująca mioklonalna epilepsja typu 1 (ang. *progressive myoclonal epilepsy type 1*); DMAHP — gen z kasetą homeo związany z locus DM (ang. *DM-locus-associated homeodomain protein*).

I. Wstęp

Dystrofia miotoniczna (ang. *myotonic dystrophy* — DM), numer w bazie danych *Mendelian Inheritance in Men* — OMIM: 160900, jest chorobą genetyczną dziedziczącą się w sposób autosomalny dominujący. Uznaje się ją za jedną z najczęstszych jednogenowych chorób dziedzicznych populacji kaukaskiej oraz najczęstszą postać dystrofii u dorosłych. Dokładne dane dotyczące częstości występowania DM w populacji różnią się znacznie w zależności od źródła (od 1/7000 do 1/15000 urodzeń). Wynika to prawdopodobnie bardziej z trudności prawidłowego diagnozowania,

Contents:

- I. Introduction
- II. The myotonin kinase gene and protein
- III. Myotonic dystrophy: one of the diseases caused by the dynamic mutation process
- IV. The mechanism of the pathogenesis of myotonic dystrophy
- V. Somatic and meiotic instability
- VI. Conclusions

zwłaszcza łagodnych form choroby, niż z rzeczywistych różnic w częstości występowania DM w badanych grupach.

Ważną cechą DM jest ogromna zmienność objawów. W klasycznej — dorosłej — formie choroby za najważniejszy objaw (także pod względem diagnostycznym) uważa się miotonię. Więcej uwag o obrazie klinicznym DM znaleźć można w tekście przy omawianiu trzech form choroby. Dokładny opis jest jednak poza zakresem tej pracy i dlatego zainteresowanych stroną kliniczną zagadnienia odsyłamy do publikacji medycznych, w szczególności zaś do książki Petera Harpera "Myotonic dystrophy" (1989).

II. Gen i białko kinazy miotoninowej

Analiza dziedziczenia DM wraz z konstrukcją odpowiednich map genetycznych i fizycznych posłużyły do wyselekcjonowania kilku genów w regionie 19q13.2-q13.3, w których podejrzewano występowanie mutacji prowadzącej do rozwoju choroby (ang. *candidate genes*). Analiza polimorfizmu tych genów wskazała na występowanie mutacji dynamicznej powiązanej z chorobą. Gen w którym ją wykryto (dokładniej w jego 3' regionie niekodującym) nazwano genem kinazy miotoninowej (ang. *myotonin protein kinase* — Mt-PK) [1-3] gdyż wykazuje on silną homologię do rodziny serynowo-treoninowych kinaz białkowych.

Gen kinazy miotoninowej ulega ekspresji głównie w tkance nerwowej i mięśniowej (choć techniką odwrotnej transkrypcji i PCR można jego mRNA wykryć właściwie we wszystkich tkankach). Co ciekawe, tkan-

¹ Mgr, Zakład Genetyki Człowieka PAN i Imperial Cancer Research Fundation, Oxford University, John Radcliffe Hospital, Oxford OX 391, England ² prof. dr hab., Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

kowy wzór ekspresji Mt-PK jest bardzo podobny do analogicznych wzorów ekspresji dystrofiny i dystroglikanu — dwóch innych białek powiązanych z dystrofiami mięśniowymi [4-6]. Jednocześnie jednak DM cechuje się znacznie większą różnorodnością objawów i gradacją stopnia ich nasilenia niż inne typy dystrofii. Opisano 14 izoform kinazy miotoninowej, powstających w procesie alternatywnego składania genu i wykazujących tkankowo-specyficzną ekspresję (dane z OMIM). Generalnie I i III to formy dominujące (z wyjątkiem mięśni płodu i noworodków gdzie przeważa forma IV [7-9]).

Niewiele wiadomo o funkcji Mt-PK. Biorąc pod uwagę najbardziej charakterystyczną cechę DM — miotonię, jest wysoce prawdopodobne, że Mt-PK fosforyluje białka związane z pobudzeniem bądź skurczem mięśnia. Wykazano, że Mt-PK specyficznie fosforyluje podjednostkę beta kanału wapniowego zależnego od potencjału, oraz receptor dihydropirydynowy [10]. Mt-PK może też wpływać na różnicowanie się tkanki mięśniowej (ang. *myogenic pathway*) [11]. Należy także wspomnieć o obserwacjach muszki owocowej z mutacją w genie *warts* — homologu ludzkiej kinazy miotoninowej — wskazujących na znaczenie genu *warts* jako supresora transformacji nowotworowej [12].

III. Dystrofia miotoniczna jako jedna z chorób powodowanych mutacjami dynamicznymi

DM wywoływana jest mutacją dynamiczną. Mutacje dynamiczne to niedawno poznana grupa mutacji wyróżniająca się wieloma istotnymi cechami [13-16]. Raz zmutowana sekwencja ma znacznie większe szanse na dalsze mutacje niż sekwencja prawidłowa. Prawdopodobieństwo wydłużenia sekwencji jest tym większe im więcej mutacji już przedtem zaszło. Wreszcie, rozwój patologicznego fenotypu nie jest zjawiskiem jednoetapowym, a wręcz przeciwnie: zachodzi w ciągu kilku pokoleń, przechodząc od zupełnego braku objawów, poprzez objawy coraz cięższe i wcześniej rozpoczynające się w życiu chorego, niekiedy aż do form letalnych.

W większości chorób wywoływanych mutacjami dynamicznymi w kolejnych pokoleniach obserwuje się nasilenie objawów oraz coraz wcześniejsze ich występowanie w życiu chorych. Zjawisko to, nazywane antycypacją, niezgodne z tradycyjnymi prawami genetyki Mendlowskiej, możliwe jest właśnie dzięki molekularnej specyfice mutacji dynamicznych. Antycypacja jest najwyraźniej widoczna właśnie w DM. W innych chorobach zazwyczaj zmienia się tylko wiek wystąpienia pierwszych objawów, a w znacznie mniejszym stopniu sam przebieg choroby.

Dystrofia miotoniczna nie była pierwszą chorobą genetyczną, w przypadku której wykazano, że mutacja ją wywołująca ma charakter dynamiczny. Dzisiaj znamy już 13 takich jednostek chorobowych [17-19]:

płatawicę Huntingtona (ang. *Huntington's disease*), chorobę Kennedy'ego (ang. *Kennedy's disease* albo *spinobulbar muscular atrophy*), ataksje rdzeniowo-mózdkowe typu 1, 2, 3 i 6 (ang. *spinocerebellar ataxias* — SCAs), ataksję Frydreicha, epilepsję wieloukładową z choreoatetorą (ang. *dentatorubral-pallidoluyasian atrophy* — DRPLA), chorobę Machado-Joseph'a (ang. *Machado-Joseph disease*), dystrofię miotoniczną i wreszcie trzy zespoły związane z łamliwymi miejscami na chromosomach: FRAXA (najczęstszy, zwany często skrótowo zespołem łamliwego chromosomu X — ang. *fragile X syndrome*), FRAXE (drugi zespół łamliwego chromosomu X) i FRA11B (zespół związany z miejscem łamliwym położonym na autosomie 11).

Przypuszcza się, że jeszcze wiele innych chorób dziedziczących się nietypowo może być spowodowanych mutacjami dynamicznymi. Opracowuje się nowatorskie techniki, np. detekcja ekspansji powtórzeń (*repeat expansion detection* — RED [20-23], czy PCR z powtórzeniami trójnukleotydowymi jako starterami (ang. *triplet repeat primed PCR* — TP PCR [24-28]) pomagające w poszukiwaniu nowych mutacji dynamicznych.

Istnieją jeszcze dwa miejsca łamliwe związane z amplifikacją, niepowiązane jednak z żadnym patologicznym fenotypem: FRAXF (na chromosomie X) i FRA16A (na autosomie 16). Wszystkie miejsca łamliwe mogą być indukowane *in vitro* w określonych warunkach hodowli.

Na poziomie molekularnym dotychczas poznane mutacje dynamiczne polegają na amplifikacji powtórzeń trójnukleotydowych. FRAXA, FRAXE, FRA11B, FRAXF — to powtórzenia (CCG)_n. W ataksji Frydreicha amplifikacji ulega trójnukleotyd AAG. Wszystkie pozostałe zespoły (choroby neuromięśniowodegeneratywne) są natomiast powodowane przez rozszerzone regiony (AGC)_n. Pewnym problemem związanym z sekwencjami tandemowo powtarzającymi się jest brak jednolitego sposobu zapisu powtarzającego się motywu. Każdą trójkę nukleotydową zapisać można bowiem nawet na sześć różnych sposobów. W artykule tym przyjęto, że sekwencje zapisuje się w kierunku od 5' do 3' w kolejności alfabetycznej. Ten sposób zapisu wydaje się być najbardziej poprawny, nie jest jednak powszechnie stosowany w literaturze.

FRA16B — to niezwykła amplifikacja z 33-nukleotydowym bogatym w pary AT minisatelitą jako motywem ulegający powtórzeniu [29]. Niedawno wykazano, że inna minisatelitarna amplifikacja (minisatelita bogaty w pary GC) jest związana z postępującą mioklonalną epilepsją typu 1 (ang. *progressive myoclonal epilepsy type 1* — EPM1) [30]. Obydwie te mutacje nie są jednak w sensie dosłownym mutacjami dynamicznymi [31].

W DM region amplifikacji znajduje się w regionie 3' niekodującym genu kinazy miotoninowej (ang. *myotonin protein kinase* — Mt-PK) [32-34]. Powtarzającym się motywem jest sekwencja AGC. U zdrowej osoby

liczba powtórzeń wynosi od 5 do 30-35. Przekroczenie granicy 30-35 powtórzeń oznacza premutację, która następnie stymuluje spontaniczne dodawanie kolejnych powtórzeń. Udowodniono pozytywną korelację między liczbą dodatkowych powtórzeń, a ciężkością choroby i wiekiem wystąpienia pierwszych objawów.

Wyróżnia się trzy formy DM:

a) forma późna (ang. *late-onset form*), w której obserwuje się od 50 do 170 powtórzeń; postać ta jest trudna do zdiagnozowania, objawy występują późno w życiu chorego i są nieswoiste (najbardziej charakterystyczny objaw to katarakta);

b) postać dorosła (ang. *adult-onset myotonic dystrophy*): od 70 do 1300 powtórzeń; rozpoczyna się zazwyczaj w wieku 20-25 lat; jest to klasyczna forma choroby cechująca się zaburzeniami w pracy bardzo wielu różnych tkanek i organów; charakterystyczne objawy to: miotonia (stąd nazwa choroby), zaniki mięśni, zaburzenia pracy serca, przedwczesne łysienie, zaburzenia umysłowe (szczególnie we wczesnych przypadkach), zaburzenia endokrynologiczne, bezpłodność (szczególnie u mężczyzn);

c) postać poporodowa — najrzadsza (mniej niż 10% matek z formą dorosłą rodzi dzieci tak poważnie chore) [35] (ang. *congenital form*); liczba powtórzeń przekracza 500 i może dochodzić nawet do 4000; bardzo ciężka choroba prowadząca często do zgonu tuż po porodzie w wyniku braku pracy mięśni uczestniczących w oddychaniu; w przeciwieństwie do formy dorosłej charakteryzuje się ona hipotonią mięśniową, szczególnie wyraźną tuż po porodzie: dziecko nie wykonuje żadnych ruchów, często nie oddycha, nie jest także w stanie ssać i przełykać; jeśli (pod warunkiem zapewnienia odpowiedniej intensywnej opieki medycznej) dziecko przeżyje, pojawia się także upośledzenie umysłowe (które nie jest tylko skutkiem poporodowej hipoksji); w miarę upływu czasu tonus mięśni poprawia się, przechodząc często w miotonię, mogą rozwinąć się także inne objawy charakterystyczne dla formy dorosłej.

Jak widać z przytoczonych powyżej danych tą samą liczbę powtórzeń mogą mieć osoby z różnymi formami DM (np. wrodzonej i dorosłej, dorosłej i później). W rzeczywistości podane wielkości to liczba powtórzeń mierzona w DNA wyizolowanym z leukocytów krwi (najczęstszy materiał diagnostyczny), organizm chorego jest natomiast mozaiką komórek o różnej długości regionu zamplifikowanego. Być może bardziej informatywne byłyby wyniki badań DNA tkanki mięśniowej pobranej na drodze biopsji cienkoigłowej. Metoda ta jest jednak bardziej inwazyjna i nie była dotychczas rutynowo stosowana w badaniach diagnostycznych. Opisana niedokładność zależności między ilością powtórzeń regionu (AGC)_n mierzona w DNA izolowanym z krwi a przebiegiem choroby poddaje w wątpliwość wartość prognostyczną testu genetycznego. Niemniej jednak znaczenie tego testu w diagnostyce różnicowej jest niepodważalne.

IV. Mechanizm patogenezy dystrofii miotonicznej

Od momentu ustalenia korelacji między fenotypem dystrofii miotonicznej a amplifikacją motywu AGC w genie Mt-PK, trwają intensywne badania zmierzające do ustalenia mechanizmów rozwoju choroby. Należy od razu przyznać, że do dziś nie rozwiązano tego problemu w sposób zadowalający.

Nie sposób na obecnym etapie stwierdzić, czy w patogenezie DM istotne znaczenie ma niedostatek funkcji Mt-PK. Mechanizm metylacji promotora analogiczny analogiczny do obserwowanego we FRAXA został wykluczony. Nie obserwuje się także (mimo, że powtórzenia (AGC)_n DM osiągać mogą olbrzymie rozmiary „złamań” chromosomów. Według niektórych doniesień poziom białka Mt-PK jak i poziom jego mRNA u ludzi chorych jest niezmienny (jeśli nie wyższy) w porównaniu z tkankami osób zdrowych [36-37]. Jednak inni badacze dochodzą do odmiennych wniosków demonstrując dane, z których wynika, że zmniejszenie aktywności Mt-PK jest wprost proporcjonalne do długości regionu zamplifikowanego [38-44]. W istocie, zaobserwowano, że region amplifikacji w DM niezwykle silnie wiąże się do nukleosomów [45] co może wyjaśniać mechanizm zmniejszenia aktywności transkrypcji (być może nie tylko Mt-PK, ale także innych blisko położonych genów).

Fenotyp dominujący choroby genetycznej jest jednak zazwyczaj wynikiem zmiany funkcji białka, a nie jej utraty czy nadmiaru. Właśnie ze zmianą funkcji białka mamy do czynienia w patogenezie kilku innych autosomalnych dominujących chorób spowodowanych mutacjami dynamicznymi np.: zespołu Kennedy'ego i płasawicy Huntingtona. W chorobach tych regiony powtórzone kodują długie odcinki zbudowane z jednego aminokwasu: glutaminy. Przypuszcza się, że nadmierne wydłużenie tych właśnie regionów (spowodowane amplifikacją regionu powtórzonego) zmienia funkcję białka nadając mu właściwości toksyczne. Dystrofia miotoniczna dziedziczy się właśnie w sposób autosomalny dominujący, co wskazywałoby na mechanizm zmiany funkcji białka. Powszechnie uważa się, że mutacje w regionie niekodującym, a taka jest mutacja w DM, nie mogą wpływać na budowę białka. Jednak amplifikacja w 3' regionie niekodującym Mt-PK mogłaby mieć wpływ na tkankowo-specyficzny proces składania genu, zaburzając ekspresję poszczególnych izoform, albo nawet prowadząc do powstania nowych. Brak dotychczas eksperymentalnego potwierdzenia tej hipotezy.

Myszy, które pozbawiono całkowicie Mt-PK (technika "knock out") [46] przejawiały zaledwie niewielkie zmiany w umięśnieniu głowy i szyi, a i to tylko w późnym wieku. Podobnie myszy, których komórki produkowały znacznie więcej Mt-PK, nie były dobrym modelem ludzkiej DM. Obserwowano co prawda kardiomiopatię oraz zwiększoną śmiertelność tuż po

urodzeniu, ale bez tak charakterystycznej dla DM miotonii i dystrofii mięśni szkieletowych. Z opisanych doświadczeń wynika, że myszy z prostym nadmiarem albo brakiem funkcji genu Mt-PK nie są adekwatnym modelem ludzkiej DM.

Oczywiste jest, że bardziej odpowiednim modelem DM mogą być dopiero zwierzęta, u których wprowadzi się jako wstawkę (technika knock in) region powtórzenia trójnukleotydu [47]. Takie modele mogą posłużyć nie tylko do testowania różnych mechanizmów patogenezы DM, w tym także i koncepcji niedostatku funkcji Mt-PK, ale też do ustalenia czy fenomen wydłużania powtórzenia (mutacji dynamicznej) jest cechą wyłącznie genomu ludzkiego, czy też może mieć miejsce także u innych organizmów.

W bieżącym roku powstały pierwsze takie modele DM u zwierząt, jednak wyniki badań nadal nie są jednoznaczne [48]. Skonstruowano a) mysz z dużą wstawką zawierającą Mt-PK (z 55 trójnukleotydami powtórzenia) i dwa sąsiednie geny: 59 i DMAHP (o których informacje będą zamieszczone dalej w tekście) [49]; b) mysz z fragmentem genu Mt-PK i 162 powtórzeniami [50]. Wprowadzone powtórzenia były niestabilne, ale amplifikacje (i to o raczej ograniczonym zakresie) były rzadkie, czasem nawet mniej liczne niż przypadki skracania. Ponadto w żadnym przypadku nie obserwowano objawów typowych dla DM. Być może wprowadzone regiony powtórzenia były zbyt krótkie, albo też wymagane jest oddziaływanie między obydwojema allelami Mt-PK: dzikim i zmutowanym, co nie ma miejsca w hemizygotycznych modelach transgenicznych.

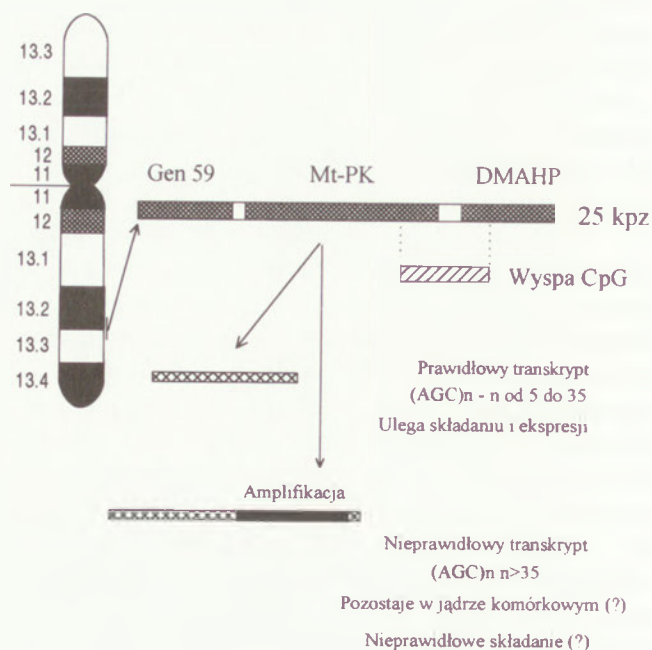
Kolejną niewyjaśnioną kwestią jest udział mitochondriów w patogenezie choroby. Niekiedy nawet klasyfikuje się DM jako jedną z chorób mitochondrialnych (wywołanych mutacjami mtDNA). Świadczyć za tym mają zarówno złożony fenotyp choroby jak i to, że formę wrodzoną dziedziczyć można tylko od matki (dziedziczenie matczyne — mitochondrialne). Wykazano, że podawanie pacjentom z dorosłą formą dystrofii miotonicznej koenzymu Q10 (witaminy U) powoduje poprawę stanu chorego [51]. Postawiono hipotezę, że do wywołania formy wrodzonej oprócz amplifikacji w genie Mt-PK konieczna jest również mutacja w mitochondrialnym DNA [52]. Takich przypuszczeń generalnie nie wspierają jednak badania mtDNA u chorych na DM [53], mimo że nie brak i potwierdzających obserwacji [54-57] (choć dokonanych na raczej ograniczonej puli pacjentów).

Według najnowszych hipotez molekularna patogenezа DM może polegać na dwóch dalszych mechanizmach. Po pierwsze, przyczyną mogą być toksyczne efekty odkładających się niedojrzałych transkryptów. Udowodniono, że jeśli w komórce obecny jest zmutowany allel, to zarówno transkrypty allelu zmutowanego jak i normalnego ulegają znacznie wolniejszemu dojrzewaniu (obniżony poziom RNA poliA+ przy niezmiennym poziomie pierwotnych transkryptów)

[58] oraz częściowo odkładają się w jądrach komórkowych w postaci okluzji [59]. Być może właśnie te złogi uniemożliwiają komórkom pełnienie prawidłowej funkcji. Jeśli opisany mechanizm okazałby się prawdziwy, dystrofia miotoniczna stałaby się pierwszym znanym przykładem choroby wywołanej dominującą zmianą funkcji na poziomie RNA.

Alternatywnym sposobem wyjaśniania patogenezы DM jest założenie, że istotny jest tak naprawdę inny pobliski gen/geny, a nie sama (albo nie tylko sama) Mt-PK. Koncepcja ta zakłada, że amplifikacja może mieć wpływ na transkrypcję blisko leżących genów. Być może dzieje się to wskutek zmian jakie sekwencja (AGC)_n wywołuje w strukturze DNA, czy też obecności bardzo dużej ilości białek wiążących się do tej sekwencji, albo paradoksalnie na skutek ich braku (efekt rozcieńczenia: brak wystarczającej ilości białek aby móc związać się z setkami nukleotydów sekwencji powtórzonej).

Genem, który może być związany z patogenezą DM jest tzw. gen 59 leżący bardzo blisko (około 1100 par zasad w kierunku 5') genu Mt-PK [60]. Gen 59 ulega intensywnej ekspresji w tkance nerwowej i w jądrach (w drugorzędowych spermatocytach faz VIII-XII), co „zgadza” się z objawami klinicznymi DM. Ekspresja genu 59 w spermatocytach w czasie drugiego podziału mejotycznego oraz obecność w jego sekwencji regionów świadczących, że jego białkowy produkt może być zaangażowany w kontrolę mejozy stały się podstawą do wysunięcia ciekawej hipotezy tłumaczącej dlaczego przypadki poporodowej formy DM są zawsze dziećmi matek z formą dorosłą DM (mężczyźni z formą dorosłą mają dzieci z formą dorosłą, a nie poporodową). Zgodnie z tą hipotezą spermatocyty z bardzo silnie zamplifikowanym regionem (AGC)_n ulegają eliminacji na etapie drugiego podziału mejotycznego, właśnie w wyniku braku aktywności genu 59 (natomiast żeń-



Ryc. 1. Region Mt-PK u człowieka

ska mejoza nie wymaga aktywności tego genu). Rzeczywiście w plemnikach mężczyzn chorych na DM, alleli o bardzo dużej liczbie powtórzeń po prostu nie obserwuje się. Jednocześnie im cięższa postać choroby mężczyzny, tym mniejsza jego płodność (tym mniejszy procent spermatocytów ma odpowiednio ograniczony region amplifikacji). Należy jednak podkreślić, że nie ma ostatecznego potwierdzenia powyższej hipotezy, a opisywane różnice dziedziczenia DM od matki i ojca można próbować tłumaczyć także innymi zjawiskami jak np.: piętnowaniem genetycznym (ang. *imprinting*), czy też różnym zachowaniem się powtórzenia w czasie żeńskiej i męskiej mejozy.

Innym genem, który może warunkować DM jest gen leżący w kierunku 3' od genu Mt-PK: gen z kasetą homeo związany z locus DM (ang. *DM-locus-associated homeodomain protein* — *DMAHP*) [61]. Powtórzenia trójnukleotydowe Mt-PK znajdują się wewnątrz dużej wyspy CpG i jest prawdopodobne, że zmiany w jej strukturze mają wpływ na ekspresję genów znajdujących się blisko w kierunku 3', a więc np. *DMAHP*. Jednocześnie jednak dotychczasowe badania nie wykazały zmian profilu metylacji w zmutowanych allelach DM [62]. Udało się natomiast zademonstrować, że duże amplifikacje zmniejszają dostępność pobliskiego miejsca wrażliwego na DNAzę I, co może świadczyć o zmniejszeniu aktywności transkrypcyjnej 3' od genu Mt-PK [63].

Złożoność obrazu klinicznego DM wskazuje, że patogenezę tej choroby jest mechanizmem wielotorowym, obejmującym zarówno efekt akumulacji niedojrzałych transkryptów Mt-PK jak i zaburzenia w ekspresji genu 59, *DMAHP* lub jeszcze innych blisko położonych genów. Wobec sprzecznych doniesień co do ilości mRNA oraz białka Mt-PK u osób chorych, nie można także wykluczyć efektu niedostatecznej funkcji Mt-PK.

V. Niestabilność międzypokoleniowa i somatyczna

Zazwyczaj w kolejnych pokoleniach objawy dystrofii miotonicznej nasilają się lub choroba rozpoczyna się we wcześniejszym wieku. Zjawisko to, nazywane antycypacją [64], niezgodne z tradycyjnym rozumieniem mechanizmów dziedziczenia chorób genetycznych, przez wiele lat uważane było jedynie za artefakt. Dopiero wyjaśnienie molekularnego podłoża antycypacji spowodowało akceptację tego zjawiska przez społeczność naukową. Na poziomie molekularnym antycypacja wiąże się z wydłużaniem długości obszaru (AGC)_n, czyli dodawaniem kolejnych trójek AGC. Wydłużanie obszaru (AGC)_n zachodzi nie tylko między pokoleniami, ale także w czasie życia chorego [65-68]. Oznacza to, że w komórkach osoby, która odziedziczyła zmutowany allel, w miarę rozwoju organizmu mutacja ta pogłębia się (dodawane są coraz to nowe powtórzenia AGC). Proces ten zachodzi z różną

szybkością w różnych typach komórek (ze względu na różnice w szybkości podziałów lub też z innych nie poznanych dotychczas przyczyn) tak, że organizm staje się mozaiką komórek o różnej długości regionu (AGC)_n.

Istnieje wiele hipotez, za pomocą których próbuje się wyjaśniać zjawisko spontanicznej amplifikacji powtórzeń trójnukleotydowych. Wielu badaczy widzi przyczynę tego zjawiska w specyficznej strukturze jaką według nich przyjmują regiony powtórzeń. Taka struktura miałaby sprzyjać popełnianiu błędów przez polimerazę DNA, wpływając bezpośrednio na nią samą, bądź działając pośrednio — poprzez interakcje z innymi białkami aparatu replikacji. Efekt ten miałby jednak występować dopiero po przekroczeniu pewnej krytycznej liczby powtórzeń (w przypadku dystrofii mięśniowej około 30-35 powtórzeń). U podstawy samego procesu leżałaby zatem pramutacja, która staje się przyczyną następującego ciągłego wydłużania regionu powtórzeń. Koncepcja ta nie wyklucza dodatkowego wpływu bliżej nieokreślonych białek, które oddziałując z regionem amplifikacji mogłyby w pewien sposób stymulować „pomyłki” polimerazy. Opisano już kilka białek wiążących się do regionów powtórzeń trójnukleotydowych [69, 70]. Część z nich wiąże się specyficznym tylko z obszarem powtórzeń konkretnego trójnukleotydu. Wykryto także pewne cytoplazmatyczne białko, które oddziałuje specyficznie z sekwencją (CUG)_n w mRNA genu Mt-PK [71].

Istnieją już przesłanki doświadczalne potwierdzające istnienie alternatywnych struktur 2-rzędowych w obszarze powtórzeń (AGC)_n i (CCG)_n [72-75]. Nadano im nazwę S-DNA (od ang. *slipped DNA*). Stwierdzono, że takie struktury powstają wydajnie dopiero po przekroczeniu krytycznej długości obszaru powtórzeń, są stabilne w fizjologicznej temperaturze oraz warunkach jonowych, są wrażliwe na nukleazę specyficzną hydrolizującą ssDNA (co wskazuje na występowanie obszarów niesparowanych) oraz wykazują znacznie zwiększoną ruchliwość elektroforetyczną w warunkach niedenaturujących. Udało się także wykazać [76] w układzie *in vitro*, że badane polimerazy DNA (fragment Klenowa polimerazy I, polimeraza beta człowieka oraz modyfikowana polimeraza DNA faga T7 — sekwenaza) mogą ulegać przejściowemu zatrzymaniu w trakcie replikacji sekwencji (AGC)_n i (CCG)_n. Prawdopodobnie pauzy te powodowane są przez regiony S-DNA i to właśnie w ich trakcie zatrzymana polimeraza syntetyzuje dodatkowe powtórzenia trójnukleotydowe.

Dane z doświadczeń badających sprzężenie mutacji w DM z określonym haplotypem chromosomu 19 [77] przyczyniły się do postawienia hipotezy o występowaniu w przypadku DM tzw. efektu założyciela. U około 30% osób z DM chromosom, który zawiera zmutowany allel posiada unikalny wzór RFLP, wśród normalnej populacji występujący z minimalną częstością 0.000015. Pacjenci z DM znacznie częściej posiadają

leżącą w pobliżu genu Mt-PK insercję (1000 pz. insercyjno-delecyjny polimorfizm Alu) niż wynikałoby to z obliczeń statystycznych [78]. Jednocześnie wstawka ta uznawana jest za polimorfizm nie mający żadnego wpływu na patologiczny fenotyp DM. Podobne badania prowadzone na kontynencie afrykańskim [79] oraz w Japonii [80] dały porównywalne wyniki, co może sugerować istnienie jednego założyciela wspólnego dla Afryki, Euroazji i innych obszarów. Jest jednak także możliwe, że opisany haplotyp w pewien sposób sprzyja powstawaniu mutacji (premutacji) DM.

W literaturze można odnaleźć doniesienia o międzypokoleniowej redukcji długości powtórzenia (AGC)_n [77]. Początkowo sądzono, że wyniki te mogą być jedynie artefaktami. Badanie długości regionu zamplifikowanego w DNA izolowanym z krwi nie dostarcza bowiem pewnych informacji o długości tego regionu w innych tkankach, ani nawet o średniej wielkości we wszystkich komórkach (konsekwencja niestabilności somatycznej). Ponadto przypadki stwierdzenia regresji dotyczyły głównie dziedziczenia ojcowskiego, mogły więc być także konsekwencją selekcji pozytywnej spermatocytów z krótkimi regionami powtórzonymi. Obecnie jednak uznaje się, że przynajmniej część przypadków redukcji jest faktem [81], gdyż redukcje zaobserwowano także w czasie bezpośredniego badania pojedynczych spermocytów (ang. *single-sperm typing* [82]).

VI. Uwagi końcowe

Dystrofia miotoniczna jest dla badacza jedną z najciekawszych chorób powodowanych mutacją dynamiczną. W żadnej innej z tych chorób nie jest tak silnie zaznaczona zależność między długością amplifikowanego odcinka a nasileniem i czasem wystąpienia objawów. Żadna inna z tych chorób nie cechuje się tak różnorodnym i złożonym patologicznym fenotypem. Amplifikacja DNA w DM może osiągać ogromne rozmiary, przy czym komórki chorego tworzą zróżnicowaną mozaikę alleli. Być może DM jest również pierwszym przykładem mutacji dominującej na poziomie RNA. Nie wyjaśnione są jeszcze dokładnie mechanizmy patogenezy, różnic w sposobie przekazywania choroby przez matkę i ojca, przyczyny fenomenu spontanicznej amplifikacji. Fakty te czynią z DM bardzo interesujący model genetyczny. Jednocześnie DM to jedna z najczęstszych chorób monogenowych, najczęstsza forma dystrofii u dorosłych. Jej diagnostyka jest stosunkowo trudna, co wskazuje na potrzebę współpracy między lekarzami a genetykami molekularnymi w celu postawienia prawidłowego rozpoznania.

Należy spodziewać się dalszego szybkiego postępu badań nad dystrofią miotoniczną i innymi chorobami wywoływanymi mutacjami dynamicznymi, z naciskiem na konstruowanie odpowiednich modeli zwierzęcych. Uzyskane odpowiedzi mogą rzucić nowe światło

nie tylko na problem mutacji dynamicznych, ale także ogólnej niestabilności sekwencji minisatelitarnych — zarówno u osób zdrowych, u chorych z EPM1 jak i w pewnych typach nowotworów.

Praca była finansowana ze środków grantu KBN 4 PO5E 065 10

Artykuł otrzymano 6 stycznia 1997 r.
Zaakceptowano do druku 5 czerwca 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter H, Stanton VP, Thirion J, Hudson T, Sohn R, Zemelman B, Snell RG, Rundle SA, Crow S, Davies J, Shelbourne P, Buxton J, Jones C, Juvonen V, Johnson K, Harper PS, Shaw DJ, Housman DE (1992) *Cell* **68**: 799-909
2. Fu Y, Pizzuti A, Fenwick RG, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, Jong P, Wieringa B, Korneluk R, Perryman MB, Epstein HF, Caskey CT (1992) *Science* **255**: 1256-1258
3. Whiting EJ, Waring JD, Tamai K, Somerville M, Hincke M, Staines WA, Ikeda JE, Korneluk RG (1995) *Hum Molec Genet* **4**: 1063-1072
4. Górecki DC, Monaco AP, Derry MJM, Walker AP, Bernard EA, Barnard PJ (1992) *Hum Mol Genet* **1**: 505-510
5. Rafael JA, Sunada Y, Cole NM, Campbell KP, Faulkner JA, Chamberlain JS (1994) *Hum Mol Genet* **3**: 1725-1733
6. Górecki DC, Derry MJM, Barnard EA (1994) *Hum Mol Genet* **3**: 1589-1597
7. Jansen G, Mahadevan M, Amemiya C, Wormskamp N, Segers B, Hendriks W, O'Hoy K, Baird S, Sabourin L, Lennon G, Jap PL, Iles D, Coerwinkel M, Hofker M, Carrano AV, Jong PJ, Korneluk RG, Wieringa B (1992) *Nat Genet* **1**: 261-266
8. Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG, Caskey CT (1993) *Science* **260**: 235-238
9. Fu W, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, Jong P, Wieringa B, Korneluk R, Perryman MB, Epstein HF, Caskey CT (1992) *Science* **255**: 1256-1258
10. Timchenko L (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5366-5370
11. Bush EW, Taft CS, Meixell GE, Perryman MB (1996) *J Biol Chem* **271** (1): 548-552
12. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ (1995) *Gene Dev* **9**: 534-546
13. Sutherland GR, Richards RI (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3636-3641
14. Richards RI, Sutherland GR (1992) *Cell* **70**: 709-712
15. Warren ST (1996) *Science* **271**: 1374-1375
16. Milewski M, Bal J (1993) *Post Biochem* **4**: 228-236
17. Monckton DG, Caskey CT (1995) *Circulation* **91**: 513-520
18. Bates G, Lehrach H (1994) *BioEssays* **16**: 277-284
19. Sutherland GR, Richards RI (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3636-3641
20. Schalling M, Hudson TJ, Buetow KH, Housman DE (1993) *Nature Genet* **4**: 135-139
21. Sirugo G, Kidd KK (1995) *Epicentre Forum* **2**: 1-3
22. Haaf T, Sirugo G, Kidd KK, Ward DC (1996) *Nat Genet* **12**: 183-185
23. Hofferbert S, Schanen C, Chehab F, Francke U (1997) *Hum Mol Genet* **6** (1): 77-83
24. Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D (1996) *Journal of Medical Genetics* **33** (12): 1022-1026

25. Schalling M, Hudson TJ, Buetow KH, Housman DE (1993) *Nature Genet* 4: 135-139
26. Sirugo G, Kidd KK (1995) *Epicentre Forum* 2: 1-3
27. Haaf T, Sirugo G, Kidd KK, Ward DC (1996) *Nat Genet* 12: 183-185
28. Hofferbert S, Schanen C, Chehab F, Francke U (1997) *Hum Mol Genet* 6 (1): 77-83
29. Yu S, Mangelsdorf M, Hewett D, Hobson L, Baker E, Eyre HJ, Lapsys N, Paslier D, Doggett NA, Sutherland GR, Richards RI (1997) *Cell* 88: 367-374
30. Lafreniere RG (1997) *Nat Genet* 15: 298-302
31. Buard J, Jeffreys AL (1997) *Nat Genet* 15: 327-328
32. Whiting EJ, Waring JD, Tamai K, Somerville M, Hincke M, Staines WA, Ikeda JE, Korneluk RG (1995) *Hum Molec Genet* 4: 1063-1072
33. Shelbourne P, Winqvist R, Kunert E, Davies J, Leisti J, Thiele H, Bacchmann H, Buxton J, Williamson B, Johnson K (1992) *Hum Molec Genet* 1: 467-473
34. Imbert G, Kretz C, Johnson K, Mandel JL (1993) *Nat Genet* 4: 72-76
35. Hojo K, Yamagata H, Moji H, Fujita T (1995) *Amer J Perinatol* 12: 195-200
36. Bhagwati S, Ghatpande A, Leung B (1996) *Biochim Biophys Acta* 1317: 155-157
37. Sabouri LA, Mahadevan MS, Narang M, Lee DSC, Surh L, Korneluk RG (1993) *Nat Genet* 4: 233-238
38. Van der Ven PFM, Jansen G, Kuppevelt TH, Perryman MB, Lupa M, Dunne PW (1993) *Hum Molec Genet* 2: 1889-1894
39. Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs R, Pizzuti A, Ashizava T, Perryman MB, Scarlato G (1993) *Science* 260: 235-238
40. Hofmann-Radvanyi H, Lavedan C, Rabes JP, Savoy D, Duros C, Johnson K, Junien C (1993) *Hum Molec Genet* 2: 1263-1267
41. Koga R, Nakao Y, Kurano Y, Tsukahara T, Nakamura A, Ishiura S, Nonaka I (1994) *Biochem Biophys Res Com* 202: 577-585
42. Novelli G, Gennarelli M, Zelano G, Pizzuti A, Fattorini C, Caskey T (1993) *Bioch Mol Biol Int* 29: 291-297
43. Roses AD, Schwartzbach CJ, Taylor HP, Gilbert JR, Speer MC (1992) *Am J Hum Genet* 51 (suppl) ASHG Meeting Abstract A109
44. Sabourin LA, Mahadevan MS, Narang M, Lee DSC, Cuhur LC, Korneluk RG (1993) *Nat Genet* 4: 233-238
45. Carango P, Noble JE, Marks HG, Funanage VL (1993) *Genomics* 18: 340-348
46. Wang YH, Amirhaeri S, Kang S, Wells RD, Griffith JD (1994) *Science* 265: 669-671
47. Jansen G, Groenen PJ, Bachner D, Jap PH (1996) *Nat Genet* 13: 316-324
48. Wynshaw-Boris A (1996) *Nat Genet* 13: 259-260
49. Korneluk RG, Narang MA (1997) *Nat Genet* 15: 119-120
50. Gourdon G, Radvanyi F, Lia AS, Duros C, Blanche M, Abitbol M, Junien C, Hofmann-Radvanyi H (1997) *Nat Genet* 15: 190-192
51. Monckton DG, Coolbaugh MI, Ashizawa K T, Siciliano MJ, Caskey CT (1997) *Nat Genet* 15: 193-196
52. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Peterson GM, Kinzler K W, Vogelstein B (1993) *Science* 260: 812-816
53. Tachi N, Kazuka N, Ohya K, Chiba A, Kikuchi K (1996) *J Child Neurol* 11 (6): 430-432
54. Poulton J, Harlet HG, Dasmahapatra J, Brown GK, Potter CG, Sykes B (1995) *J Med Genet* 32 (9): 732-735
55. Nakamura N, Hattori N, Tanaka M, Mizuno Y (1996) *Bioch Biophys Acta* 1308: 215-221
56. Sahashi K, Tanaka M, Tashiro M, Ohno K, Ibi T, Takahashi A, Ozawa T (1992) *Gerontology* 38: 18-29
57. Arnaudo E, Mita S, Koga Y, Tritschler HJ, Shan-ske S, Dimauro S, Schon EA (1990) *Neurology* 40 (suppl. 1): 376
58. Brais B, Karpati G (1990) *Neurology* 40 (suppl.): 376
59. Wang J, Pegoraro E, Menegazzo E, Gennarelli M, Hoop RC, Angelini C, Hoffman E (1995) *Hum Molec Genet* 4: 599-606
60. Taneja K, McCurrach M, Schalling M, Housman D, Singer RH (1995) *J Cell Biol* 128: 995-1002
61. Jansen G, Bachner D, Coerwinkel M, Wormskamp N, Hameisetr H, Wieeringa B (1995) *Hum Molec Genet* 4: 843-852
62. Boucher CA, King SK, Carey N, Krahe R, Winchester CL, Rahman S, Creavin T, Meghji P, Bailey MES, Chartier FL, Brown SD, Siciliano MJ, Johnson K J (1995) *Hum Mol Genet* 4 (10): 1919-1925
63. Shaw DJ, Chaudhary S, Rundle SA, Crow S, Brook JD, Harper P, Harley HG (1993) *J Med Genet* 30: 189-192
64. Otten AD, Tapscott S (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 12: 5465-5469
65. McInnis MG (1996) *Am J Hum Genet* 59: 973-979
66. Wohrle D, Kennerknecht I, Wolf M, Enders H, Schwemmle S, Steinbach P (1995) *Hum Mol Genet* 4 (7): 1147-1153
67. Zata M, Passos-Bueno MR, Ceerqueira A, Marie SK, Vainzof M, Pavanello CM (1995) *Hum Mol Genet* 3: 401-406
68. Tachi NT, Ohya K, Chiba S, Sato T, Kiikichi K (1995) *Pediatr Neurol* 12: 81-83
69. Mahadevan M, Tsilfidis S, Sabourin L (1992) *Science* 255: 1253-1255
70. Bhagwati S, Ghatpande A, Leung B (1996) *Biochem Biophys Res Com* 228: 55-62
71. Yano-Yanagisawa H, Li Y, Wang H, Kohwi Y (1995) *Nucleic Acid Res* 23: 2654-2660
72. Timchenko LT, Timchenko NA, Caskey CT, Roberts R (1996) *Hum Mol Genet* 5 (1): 115-121
73. Mariappan SV, Garcoa AE, Gupta G (1996) *Nucleic Acids Res* 24 (4): 775-783
74. Gacy AM, Goellner G, Juranic N, Macura S, McMurray CT (1995) *Cell* 81: 533-540
75. Pearson CE, Sinden RR (1996) *Biochemistry* 35 (15): 5041-5053
76. Chastain PD, Eichler EE, Kang S, Nelson DL, Levene SD, Sinden RR (1995) *Biochemistry* 34 (49): 16125-16131
77. Kang S, Ohshima K, Shimizu M, Amirhaeri S, Wells RD (1995) *J Biol Chem* 270 (45): 27014-27021
78. O'Hoy K, Tsilfidis C, Mahadevan MS, Nevile CE, Barcelo J, Hunter AGW, Korneluk RG (1993) *Science* 259: 809-811
79. Mahadevan MS, Foitzik MA, Surh LC, Korneluk RG (1993) *Genomics* 15: 446-448
80. Goldman A, Krause A, Ramsay M, Jenkins T (1996) *Am J Hum Genet* 59 (2): 445-452
81. Yamagata H, Miki T, Nakagawa M, Johnson K, Deka R, Ogihara R (1996) *Hum Genet* 97 (2): 145-147
82. Martorell L, Martimasso JF, Baiget M (1996) *Genetic Epidemiology* 13 (5): 483-487
83. Monckton DG, Wong LJC, Ashizava T, Caskey CT (1995) *Hum Mol Genet* 4: 1-8

Prenumerata „Postępow Biochemii” w 1997 r.

**Prenumerata dla instytucji — 60 zł
Indywidualna — 30 zł**

50% zniżki dla członków PTBioch.

Proteoglikany — struktura i funkcje

Proteoglycans — structure and functions

EWA M. KOŹMA¹,
ANDRZEJ GŁOWACKI¹,
KRYSTYNA OLCZYK²,
MAGDALENA JAŹWIEC³

Spis treści:

- I. Budowa proteoglikanów
- 1-1. Struktura komponentów glikozoaminoglikanowych
- 1-2. Struktura części białkowej proteoglikanów
- II. Metabolizm proteoglikanów
- III. Biologiczne funkcje proteoglikanów

Wykaz stosowanych skrótów: PG — proteoglikany; GAG — glikozoaminoglikany; KS — siarczany keratanu; HS — siarczany heparanu; H — heparyny; ChS — siarczany chondroityny; DS — siarczany dermatanu; HA — kwas hialuronowy; HSPG — proteoglikany heparanosiarczanowe; EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy; FGF 1 i 2 — czynniki wzrostowe fibroblastów; TGF β — transformujący czynnik wzrostowy β ; II-3 — interleukina 3; GM-CSF — czynnik stymulujący kolonizację makrofagów i granulocytów.

Proteoglikany (PG) są heterogenną grupą glikoprotein, produkowanych prawdopodobnie przez wszystkie komórki zwierzęce [1, 2]. Częsteczki te występują zarówno w obrębie komórek, jak i w przestrzeni pozakomórkowej [1, 2]. PG znajduje się w ziarnistościach wydzielniczych oraz w błonach komórkowych [2-5]. W lokalizacji pozakomórkowej, proteoglikany stanowią istotny komponent substancji podstawowej macierzy zewnątrzkomórkowej, występując również w wyspecjalizowanych strukturach tej macierzy — błonach podstawnych [1, 2, 6-8]. Różnorodność lokalizacji, pewne cechy struktury (wysoka gęstość ładunku elektrycznego części cukrowej) czy też występowanie na określonych etapach różnicowania tkanek i narządów, wskazują na pełnienie przez proteoglikany wielu różnych funkcji — od zapewnienia tkankom sprężystości — do uczestniczenia w procesach proliferacji i różnicowania [1-3, 9].

Contents:

- I. Proteoglycans structure
- 1-1. Structure of glycosaminoglycan components
- 1-2. Structure of proteoglycans protein component
- II. Metabolism of proteoglycans
- III. Biological functions of proteoglycans

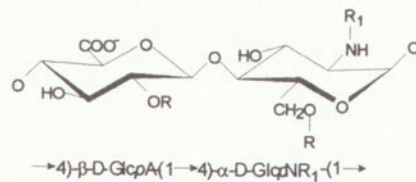
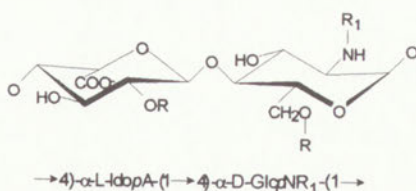
I. Budowa proteoglikanów

I-1. Struktura komponentów glikozoaminoglikanowych

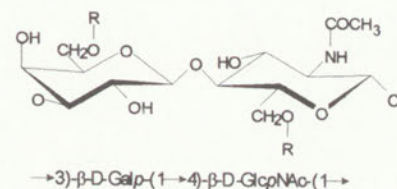
Proteoglikany zbudowane są z białkowego rdzenia, do którego, za pośrednictwem wiązań O- lub N-glikozydowych, przyłączone są oligosacharydy oraz różna liczba łańcuchów glikozoaminoglikanów (GAG). PG mogą posiadać od 1 do nawet 100 i więcej łańcuchów GAG [2, 9], będących liniowymi, nierozgałęzionymi heteropolisacharydami, należącymi do jednej z poniższych klas: glikanów heparanowych, keratanowych lub chondroityno-dermatanowych [10]. W ostatnich latach, w polskim piśmiennictwie, ukazało się kilka artykułów, omawiających budowę glikozoaminoglikanów, tworzących proteoglikany [11, 12]. Stąd, w niniejszym rozdziale, zdecydowano się zwrócić uwagę tylko na najważniejsze cechy struktury wspomnianych składników PG. Podstawową jednostką strukturalną GAG jest naprzemiennie powtarzający się disacharyd [1, 2, 9, 13]. W zależności od klasy glikanu, disacharyd ów składa się (Ryc. 1) z reszty jednej z następujących heksozoamin: N-acetylogalaktozoaminy (glikany chondroityno-dermatanowe), N-acetyloglukozoaminy (glikany heparanowe i keratanowe) lub N-siarczanoglukozoaminy (glikany heparanowe) oraz — z reszty kwasu heksuronowego (D-glukuronowego lub L-iduronowego) (glikany heparanowe i chondroityno-dermatanowe) albo galaktozy (glikany keratanowe) [1, 2, 9, 13]. Omawiana disacharydowa podjednostka może zawierać do 3 reszty siarczanowych [9, 13]. Siarczowaniu podlegają przede wszystkim reszty heksozoaminy: N-acetylogalaktozamina przy 4 lub/i 6 atomie węgla, a glukozoamina

¹ Dr, ² prof., Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, ³ lek. med., Oddział Urazowo-Ortopedyczny, Szpital Miejski nr 1, ul. Zegadłowicza 3, 41-200 Sosnowiec

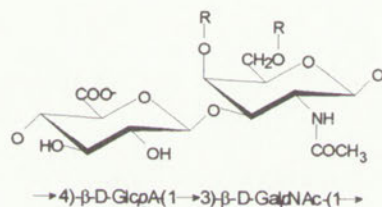
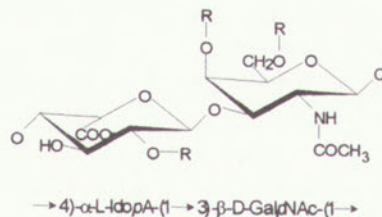
a)

gdzie: R = H lub SO₃⁻R₁ = CH₃CO lub SO₃⁻

b)

gdzie: R = H lub SO₃⁻

c)

gdzie: R = H lub SO₃⁻

Ryc. 1. Disacharydowe podjednostki, budujące łańcuchy glikozaminoglikanowe proteoglikanów:

a) heparanosiarczanowych i heparynowych,

b) keratanosiarczanowych,

c) chondroityno-dermatanowych;

Galp — galaktoza (forma piranozowa),

GalpNAc — N-acetylogalaktozamina

(forma piranozowa), GlcpA — kwas

glukuronowy (forma piranozowa),

GlcpNAc — N-acetylglikozamina

(forma piranozowa), GlcpNSO₃

— N-siarczanoglikozamina (forma

piranozowa), IdopA — kwas iduronowy

(forma piranozowa).

przy atomie azotu grupy aminowej i/lub przy 6 atomie węgla (Ryc. 1). Występowanie N-siarczanowanej glikozaminy, siarczanowanej jednocześnie przy 3 atomie węgla, jest rzadkie i ograniczone do pentasacharydowej sekwencji, obecnej w niektórych populacjach glikanów heparanowych i swoście wiążącej antytrombinę III [9, 14]. Siarczanowaniu mogą podlegać także reszty galaktozy, występujące w końcowych partiach łańcuchów keratanowych oraz — występujące w pozostałych typach omawianych tu glikanów — reszty kwasów heksuronowych [2, 9, 13, 15, 16]. Pośród tych ostatnich, najczęściej siarczanowanie dotyczy reszt iduronianowych, w pozycji przy 2 atomie węgla [2, 9, 13]. Reszty glukuronianowe, siarczanowane przy 2 atomie węgla znaleziono w siarczanach heparanu, występujących w jądrach hepatocytów [17]. Obecność znacznej liczby grup siarczanowych i karboksylowych sprawia, że łańcuchy GAG są polianionami o dużej gęstości ładunku elektrycznego [2, 9].

Składniki glikanowe PG są w znacznej mierze

odpowiedzialne za ogromną heterogenność tych cząsteczek, co jest spowodowane [2]:

1. różną liczbą łańcuchów glikanowych tego samego rodzaju, przyłączonych do jednego typu białka rdzeniowego;
2. różną długością łańcuchów glikanowych tego samego rodzaju, przyłączonych do jednego typu białka rdzeniowego;
3. zmienną zawartością i różnym rozmieszczeniem w łańcuchach cukrowych tej samej klasy GAG reszt siarczanowych i iduronianowych;
4. możliwością występowania jednego typu białka rdzeniowego w połączeniach z łańcuchami GAG, należącymi do różnych klas.

W cząsteczkach proteoglikanów łańcuchy glikanowe połączone są z białkami rdzeniowymi za pośrednictwem tzw. regionu łączącego. W proteoglikanach heparanowych i chondroityno-dermatanowych odcinek ten zawiera cztery reszty cukrowe: ksylozę, 2 reszty galaktozy i kwas glukuronowy [1, 2, 9]. W proteo-

glikanach keratanowych region łączący składa się z wielu reszt sacharydowych, obejmujących fukozę, galaktozę, mannozę, glukozaminę i kwas N-acetyloneuraminowy [15, 16, 18]. Ponieważ wspomniany odcinek — w przypadku proteoglikanów keratanowych — występuje w dwóch odmianach, różniących się strukturą, wyróżnia się dwa rodzaje siarczanów keratanu: rogówkowy (KS I) i szkieletowy (KS II), [15, 16, 18].

Do glikoaminoglikanów heparanowych zalicza się siarczany heparanu (HS) i heparyny (H). Pierwsze z nich, o masach od 14 do 100 kDa [19, 20], występują głównie jako składniki proteoglikanów błon komórkowych, stanowiących zarówno cząsteczki przezbłonowe, jak i połączone z błoną przez glikozylofosfatydyloinozytol [3, 21, 22]. Proteoglikany heparanosiarczanowe spotyka się także w substancji podstawowej macierzy zewnątrzkomórkowej oraz w wyspecjalizowanych strukturach tej ostatniej — błonach podstawnych. [7, 8, 19].

Występowanie kowalencyjnych połączeń heparyn z białkami ograniczone jest do ziarnistości wydzielniczych komórek tucznych i bazofili [2, 5, 9, 19]. Do przestrzeni pozakomórkowej, heparyny wydzielane są jako łańcuchy glikoaminoglikanowe o masach od 5 do 40 kDa [9, 20, 23].

Wspólną i charakterystyczną cechą glikanów heparanowych jest domenowa budowa łańcucha cukrowego [19, 24]. Obok różnej długości obszarów ubogosiarczanowanych, złożonych przede wszystkim z reszt N-acetyloglukozoaminy i kwasu glukuronowego, występują fragmenty łańcucha zawierające głównie reszty N-siarczanowanej glukozoaminy i kwasu iduronowego. Oba typy reszt cukrowych są przy tym często siarczanowane. W siarczanach heparanu przeważają domeny zawierające kwas glukuronowy, zaś reszty glukozoaminy są N-siarczanowane i N-acetylowane w zmiennych proporcjach. W łańcuchach heparyn natomiast, dominują bogatosiarczanowane obszary, zbudowane z reszt N-siarczanowanej glukozoaminy (co najmniej 80% reszt glukozoaminy występuje właśnie w tej formie), zaś około 70% wszystkich reszt kwasów heksuronowych reprezentuje kwas iduronowy [2, 20].

Glikany keratanosiarczanowe (KS), o masach od 2 do 20 kDa, występują w organizmach zwierząt w postaci proteoglikanów, zlokalizowanych głównie w macierzy zewnątrzkomórkowej [18, 25]. Prócz reszt N-acetyloglukozoaminy i galaktozy, w niektórych łańcuchach KS stwierdzono także występowanie reszt fukozy, połączonych wiązaniem 1→3 z resztami wymienionej wyżej heksozoaminy [25].

Stopień siarczanowania disacharydowych podjednostek KS jest zależny od ich pozycji w łańcuchu cukrowym [15, 16]. Sekwencje te, zlokalizowane w pobliżu regionu łączącego, nie mają grup siarczanowych. W disacharydach rozmieszczonych w środkowej części łańcucha stwierdza się występowanie 6-O-siarczanowanej N-acetyloglukozoaminy. Sekwencje końcowe

mają dwie reszty siarczanowe — przy 6 atomie węgla N-acetyloglukozoaminy i galaktozy.

Glikany chondroityno-dermatanowe obejmują chondroityno-4- i -6-siarczany (Ch-4-S i Ch-6-S) oraz siarczany dermatanu (DS). Glikany te są szeroko rozpowszechnione w organizmach zwierzęcych, głównie w postaci proteoglikanów macierzy zewnątrzkomórkowej [6, 26, 27]. Tym niemniej są też i takie, które stanowią składniki błon komórkowych — np. biglikan, betaglikan, syndekan1 czy CD44 [26, 28-31]. Siarczany dermatanu najczęściej wchodzi w skład małych proteoglikanów, zawierających od 1-2 do 8 łańcuchów glikanowych, o masach od 15 do 55 kDa [32]. Siarczany chondroityny są natomiast składnikami zarówno małych, błonowych jak i bardzo dużych, agregujących PG macierzy [1, 27, 28, 30, 31]. Ostatnie z wymienionych cząsteczek cechują się obecnością od 20 do 100 łańcuchów ChS o masach od 15 do 70 kDa [27, 32]. Stosunkowo często proteoglikany zawierające glikany chondroitynowe, posiadają jeszcze inny typ łańcuchów GAG — siarczany heparanu (np. betaglikan, CD 44, niektóre syndekany) lub siarczany keratanu (np. agrekany) [1, 27-31].

Podstawą podziału glikanów chondroitynowych na chondroityno-4- i -6-siarczany jest dominujący w obrębie łańcucha cukrowego sposób siarczanowania reszt N-acetylogalaktozoaminy. Siarczany chondroityny zawierają disacharydowe podjednostki głównie z resztami kwasu glukuronowego i tylko niewielkie ilości (nie więcej niż 10%) disacharydów z resztami iduronianowymi [10]. Siarczany dermatanu natomiast mogą zawierać od 10 do 90% disacharydów iduronianowych [10]. Podjednostki te mogą być zblokowane w postaci obszarów o różnej długości bądź też występować pojedynczo, w otoczeniu disacharydów z resztami glukuronianowymi [33]. Takie kopolimeryczne strefy często zawierają naprzemiennie ułożone disacharydy iduronianowe i glukuronianowe [33, 34]. Badania Franssona [35] wskazują jednak, że pozycje 1-3, 8-9 i 25, w pobliżu redukującego końca łańcuchów dermatanosiarczanowych, są rezerwowane wyłącznie dla disacharydów z resztami glukuronianowymi. Disacharydowe podjednostki siarczanów dermatanu zawierają ponadto reszty N-acetylogalaktozoaminy, siarczanowane głównie przy 4 atomie węgla [2, 13, 35].

I-2. Struktura części białkowej proteoglikanów

Białka, stanowiące rdzeń cząsteczek PG, są heterogenną grupą związków. Mimo, że poznano już strukturę pierwszorzędową wielu z nich, to nadal nie wiadomo, dlaczego jedne białka tworzą proteoglikany, a inne nie — mimo posiadania potencjalnych reszt akceptorowych dla łańcuchów glikoaminoglikanowych. W obrębie białek rdzeniowych akceptorami pierwszej reszty cukrowej regionu łączącego, inicjującej syntezę łańcucha GAG, są:

1. reszta serylowa — w przypadku proteoglikanów heparanowych i chondroityno-dermatanowych oraz proteoglikanów keratanowych o typie szkieletowym [1, 2, 13, 16, 36],

2. reszta treonylowa — w przypadku proteoglikanów keratanowych o typie szkieletowym [16, 36],

3. reszta asparaginylowa — w proteoglikanach keratanowych o typie rogówkowym [16, 36].

Przynajmniej w odniesieniu do PG heparanosiarczanowych i chondroityno-dermatanowych, których syntezę poznano najlepiej, nie wykazano, by reszta akceptorowa była częścią szczególnej sekwencji łańcucha polipeptydowego, rozpoznawanej przez ksylozylotransferazę — enzym rozpoczynający syntezę części glikanowej [2]. Badania wykazały jednak, że reszty serylowe, znajdujące się w obrębie obszarów o strukturze β , są szczególnie często podstawiane łańcuchami glikozoaminoglikanowymi [2]. Prócz fragmentów, wiążących łańcuchy GAG, białka rdzeniowe proteoglikanów, charakteryzujące się często szczególną, tzw. modułową strukturą, posiadają także obszary pełniące i inne funkcje. Budowa części białkowej stała się podstawą klasyfikacji PG, zaproponowanej przez Kjellen i Lindhal [2]. Badacze ci wyróżnili następujące rodziny proteoglikanów.

1. duże, zewnątrzkomórkowe proteoglikany chondroitynosiarczanowe, zdolne do agregacji z kwasem hialuronowym (HA),
2. małe proteoglikany o białkach rdzeniowych, szczególnie zasobnych w reszty leucyny,
3. duże proteoglikany heparanosiarczanowe, występujące w macierzy zewnątrzkomórkowej i błonach podstawnych,
4. proteoglikany błon komórkowych, reprezentujące rodzinę syndekanów,
5. wewnątrzkomórkowe proteoglikany serglycylowe.

Przedstawicielami pierwszej z wymienionych grup PG są: agrekany — proteoglikany chondroityno-keratanowe chrząstki [1, 27], wersikany — proteoglikany chondroitynosiarczanowe, produkowane przez fibroblasty skóry, łożyska oraz mięśnie gładkie naczyń krwionośnych [37, 38], a także neurokany i brewikany — proteoglikany chondroitynosiarczanowe tkanki nerwowej [39, 40]. Wymienione wyżej cząsteczki charakteryzują się znaczną homologią struktury N- i C-końcowych części białek rdzeniowych, przy jednoczesnym występowaniu dużych różnic w budowie odcinków, usytuowanych centralnie i wiążących łańcuchy glikanowe [27, 38-42]. Niektóre ze wspomnianych wyżej czterech typów proteoglikanów mogą wszakże występować w formie cząsteczek, zawierających niekompletny obszar wiążący łańcuchy glikanowe (wersikany) [38, 43] lub też w postaci molekuł pozbawionych tej części białka rdzeniowego (wersikany i brewikany) [38, 43, 44]. Wszystkie cztery typy PG mają na N-końcu domenę globularną, umożliwiającą im tworzenie agregatów z kwasem hialuronowym (Ryc. 2a) [27, 38-44]. Domena ta zawiera frag-

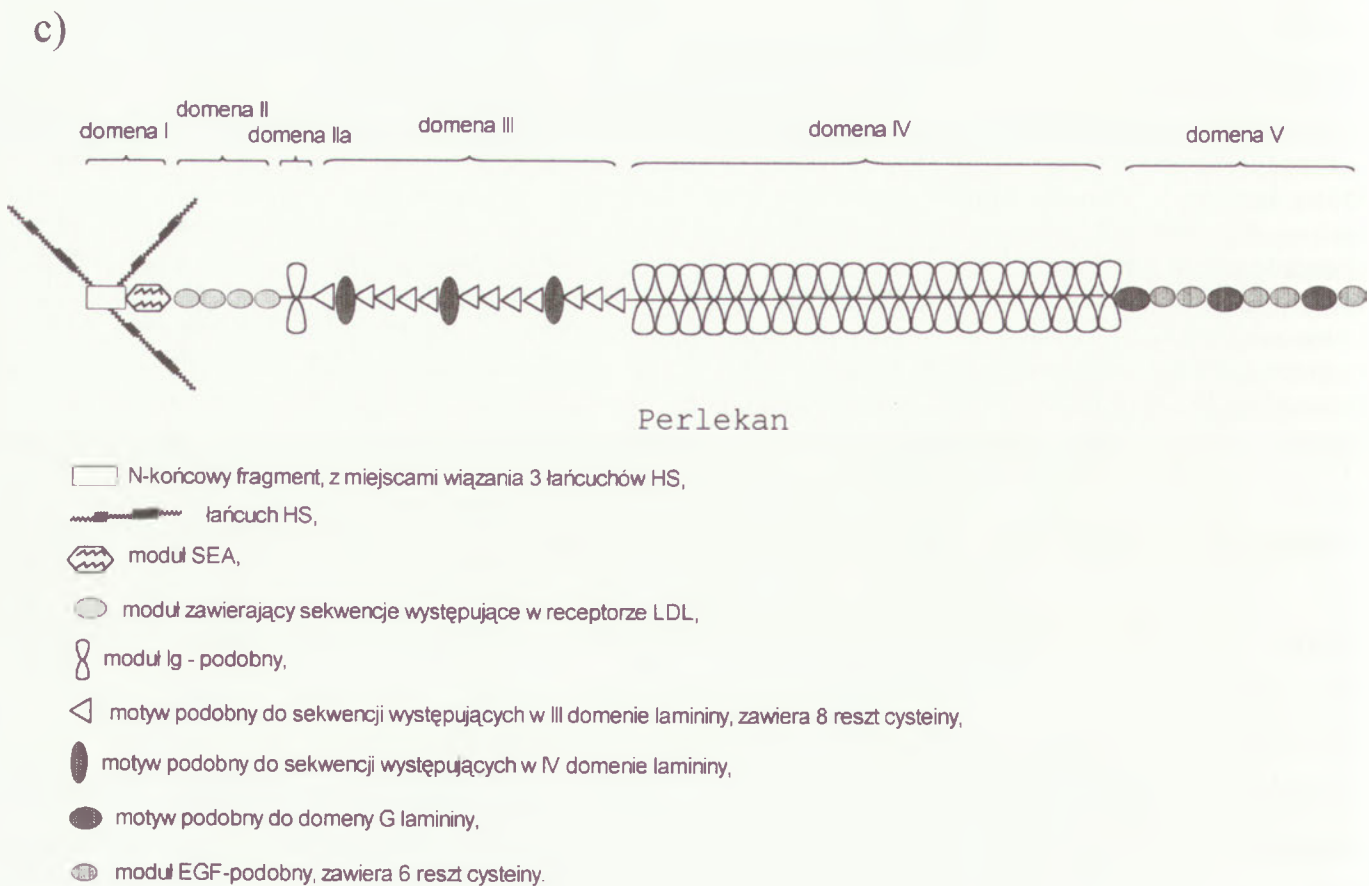
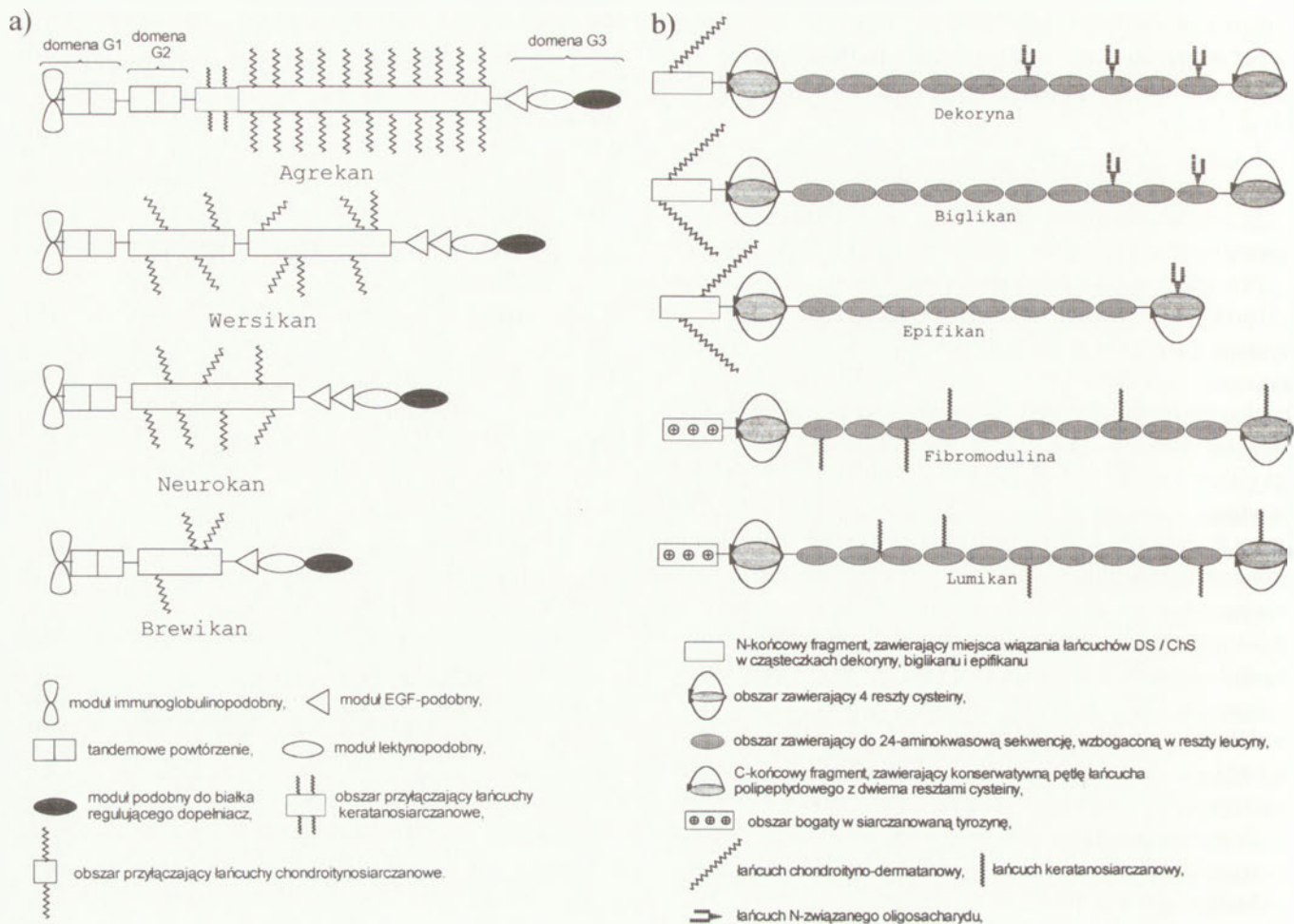
ment o strukturze immunoglobulino-podobnej oraz dwie pętle łańcucha polipeptydowego, tworzące tzw. układ tandemowego powtórzenia (tandem repeat) [38, 39, 41-45]. Układ ów bezpośrednio oddziałuje z dekasacharydowym fragmentem cząsteczki kwasu hialuronowego [27]. Region o strukturze Ig-podobnej stabilizuje te oddziaływania [45]. W stabilizacji agregatów agrekanów z HA współuczestniczy także tzw. białko łączące (*link protein*) [27, 45]. Białko to, a także jedna z domen białka rdzeniowego CD44 — cząsteczki, grająca rolę receptora powierzchniowokomórkowego dla HA [30, 46], mają budowę bardzo podobną do opisanej wyżej, N-końcowej domeny globularnej PG [45, 47]. Białka rdzeniowe agrekanów zawierają powtórzony układ dwóch pętli łańcucha polipeptydowego, tworzący tzw. domenę globularną G₂ (ryc. 2a) [41, 48]. Interesujące jest, że struktura ta nie oddziałuje z HA [48].

Wszystkie cztery typy PG, należące do omawianej tu grupy, posiadają w C-końcowym regionie białka rdzeniowego domenę globularną, zwykle złożoną z trzech rodzajów modułów, sąsiadujących ze sobą w łańcuchu polipeptydowym (ryc. 2a) [38, 39, 41-44]. Obejmują one:

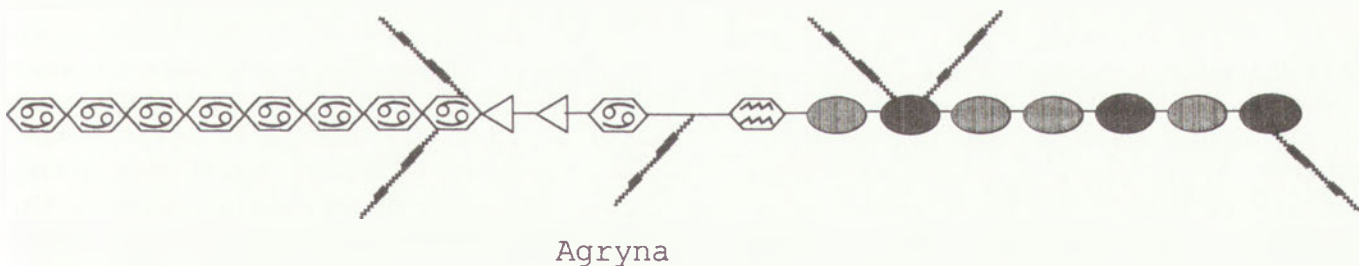
1. moduł o sekwencji podobnej do naskórkowego czynnika wzrostowego (EGF). W obrębie agrekanów występuje on dwukrotnie bądź pojedynczo, lub też ulega delecji — na etapie potranskrypcyjnej obróbki mRNA [41]. Białka rdzeniowe brewikanów mają natomiast jeden, zaś wersikanów i neurokanów — dwa takie motywy [39, 42-44],
2. moduł podobny do lektyny, wyizolowanej z wątroby kurcząt — wykazuje on niskie powinowactwo do fukozy i galaktozy [49],
3. moduł o strukturze podobnej do białka regulującego czynność dopełniacza [38, 39, 41-44].

Obecność domeny globularnej, o przedstawionej wyżej strukturze sprawia, że omawiana tu grupa PG wykazuje podobieństwo do LEC-CAM — cząsteczek biorących udział w zjawisku adhezji komórek [1, 2].

Druga grupa proteoglikanów, wg klasyfikacji Kjellen i Lindhal [2], obejmuje 5 małych proteoglikanów, występujących głównie w macierzy zewnątrzkomórkowej: dekorynę, biglikan, epifikan, fibromodulinę i lumikan. Trzy pierwsze PG posiadają 1 (dekoryna) lub 2 (biglikan i epifikan) łańcuchy dermatanosiarczanowe lub rzadziej — chondroitynosiarczanowe, przyłączone do N-końcowego regionu białka rdzeniowego [50-53]. Dekoryna jest szeroko rozpowszechniona w tkankach — wyizolowano ją ze skóry, rogówki, aorty, ścięgien, chrząstek oraz mięśni [6, 26, 50-52, 54, 55]. Biglikan występuje w różnych typach chrząstki i tkance kostnej [6, 26, 50]. Jest on także syntetyzowany przez keratynocyty, komórki śródbłonka naczyniowego i komórki mezangium nerek [26, 56]. Epifikan znaleziono natomiast w chrząstce nasadowej kurzych embrionów [53]. Fibromodulina i lumikan to proteoglikany keratanosiarczanowe,



d)



Agryna

motyw podobny do sekwencji występującej w follistatinie

łańcuch HS,

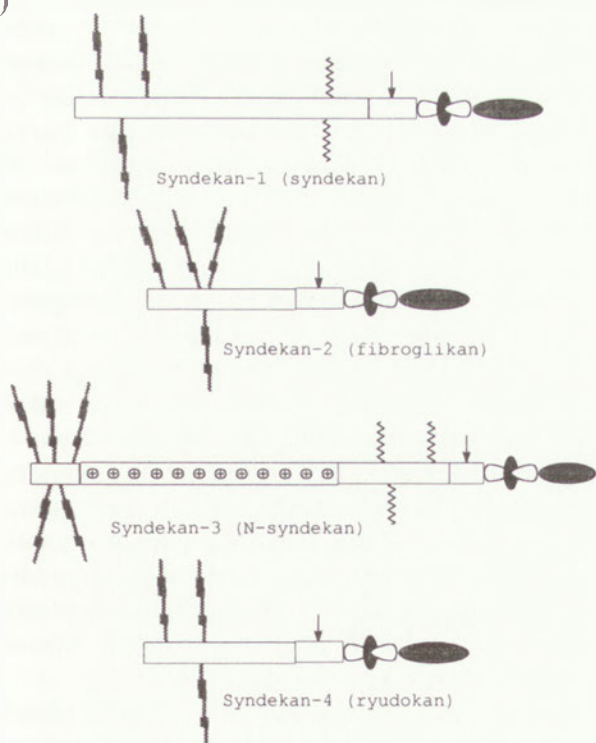
motyw podobny do sekwencji występujących w III domenie lamininy, zawiera 8 reszt cysteiny,

moduł SEA,

motyw podobny do domeny G lamininy,

moduł EGF-podobny, zawiera 6 reszt cysteiny.

e)



domena zewnątrzkomórkowa. region bogaty w sekwencje Thr-Ser-Pro.

domena błonowa. miejsce działania proteinaz.

domena cytoplazmatyczna.

łańcuch heparanosiarczanowy. łańcuch chondrotynosiarczanowy.

Ryc. 2. Schemat struktury białek rdzeniowych:

- a) proteoglikanów agregujących z kwasem hialuronowym (według [44], zmodyfikowany),
- b) małych proteoglikanów macierzy zewnątrzkomórkowej (według [44], zmodyfikowany),
- c) perlekanu (według [44], zmodyfikowany),
- d) agryny (według [44], zmodyfikowany),
- e) syndekanów (według [28] i [31], zmodyfikowany).

o 5 łańcuchach glikanowych, z których 4 są przyłączone do centralnej, zaś 1 do C-końcowej części białek rdzeniowych [44, 57]. Fibromodulina występuje w tkankach i strukturach szczególnie zasobnych w macierz kolagenową — w różnych typach chrząstek i ścięgnach [6, 44, 57]. Lumikan wyizolowano natomiast z rogówki, wątroby, mięśni i chrząstek [6, 44, 126, 129].

Cechą charakterystyczną białek rdzeniowych małych PG jest obecność w centralnej części łańcucha polipeptydowego — według I o z z o i M u r d o c h a [44] — 8 (epifikan) lub 10 (pozostałe typy PG) powtórzeń 24-aminokwasowej sekwencji, zawierającej naprzemiennie ułożone reszty hydrofobowe i hydrofilowe (Ryc. 2b). W obrębie wspomnianej sekwencji występują — konserwatywnie rozmieszczone — reszta asparaginy i od 3 do 4 reszt leucyny [6, 53, 58-63]. Badania konformacji inhibitora RN-azy, posiadającego w obrębie cząsteczki sekwencje podobne do wyżej opisanych, sugerują, że białka rdzeniowe małych PG powinny przyjmować kształt podkowy [44]. I rzeczywiście, występowanie składnika białkowego o takiej formie stwierdzono dla dekoryny i fibromoduliny/lumikanu [64]. Wydaje się, że zdeterminowany obecnością powtarzających się sekwencji bogatych w leucynę, „podkowopodobny” kształt cząsteczki, z α helikalnymi fragmentami łańcucha polipeptydowego na zewnętrznym obwodzie oraz z — antyrównoległe ułożonymi — odcinkami o strukturze β , tworzącymi krzywiznę wewnętrzną, nadaje owej molekułe znaczną konformacyjną elastyczność i szczególnie predysponuje ją do uczestnictwa w silnych oddziaływaniach typu białko: białko [44, 64]. Wykazano na przykład, że czwarta i piąta sekwencja powtórzeń, bogatych w leucynę, biorą udział w interakcjach dekoryny z kolagenem typu I [65]. Fragmenty łańcucha polipeptydowego, o dużej zawartości leucyny, uczestniczą także w oddziaływaniach dekoryny i biglikanu z transformującym czynnikiem wzrostowym β [66].

Klasycznym przedstawicielem trzeciej grupy PG, w klasyfikacji Kjellen i Lindahla [2], jest perlekan. Wydaje się jednak, że takie cechy, jak pozakomórkowa lokalizacja, typ posiadanych łańcuchów glikanowych czy pewne strukturalne właściwości białka rdzeniowego, pozwalają tu zaliczyć także agrynę.

Perlekan, występujący głównie w błonach podstawnych, jest proteoglikanem przede wszystkim heparanosiarczanowym, choć może także występować w formie hybrydy heparano-dermatanowej czy też — bardzo rzadko — w postaci cząsteczki wyłącznie z łańcuchami chondroitynosiarczanowymi [7, 8, 67]. Białko rdzeniowe perlekanu ma bardzo dużą masę (ok. 460 kDa) i skomplikowaną strukturę, stanowiącą złożenie pięciu domen (Ryc. 2c) [44, 68]. Domena I, znajdująca się na N-końcu, obejmuje fragment wiążący do 3 łańcuchów glikanowych oraz fragment określany mianem modułu SEA, występujący także m.in. w agrynie

i nadzorujący prawdopodobnie właściwą glikozylację cząsteczki białkowej. Domena II białka rdzeniowego perlekanu, z dużą ilością reszt cysteiny, wykazuje znaczne podobieństwo do receptora lipoprotein o niskiej gęstości. Domena III, homologiczna z łańcuchem A lamininy, złożona jest z 4 subdomen, zbudowanych z powtarzających się modułów, o strukturze podobnej do naskórkowego czynnika wzrostowego (EGF), i przedzielonych trzema regionami globularnymi. Domena IV oraz IIA, znajdująca się między domenami II i III, zawierają różną liczbę modułów immunoglobulinopodobnych, spotykanych w N-CAM — cząsteczkach uczestniczących w adhezji komórek. Domena V zbudowana jest z dwu grup powtórzeń modułów o strukturze podobnej do EGF, przedzielonych 3 globularnymi regionami, homologicznymi z neureksyną oraz C-końcową domeną agryny a także — w mniejszym stopniu — z C-końcowymi obszarami łańcucha A lamininy. Tak złożona struktura białka rdzeniowego perlekanu jest wynikiem zjawiska „tasowania” i duplikacji eksonów [7]. Nie wyjaśniono w pełni, czy domeny białka rdzeniowego perlekanu pełnią te same funkcje, co w innych, zawierających je białkach. Wykazano jednak, że za pośrednictwem domeny III omawiany tu PG wiąże fibronektynę [69], kolagen typu I [70] oraz lamininę [71]. Interesujące, że oddziaływania perlekanu z ostatnim z wymienionych białek zachodzą jeszcze przed sekrecją obu tych cząsteczek z komórki [71].

Agryna to proteoglikan heparanosiarczanowy, produkowany i wydzielany głównie przez neurony ruchowe, choć spotykany także w błonach podstawnych nabłonka kanalików nerkowych [72, 73]. Tak jak w przypadku perlekanu, białko rdzeniowe agryny składa się z kilku rodzajów modułów (Ryc. 2d), występujących także w innych typach cząsteczek białkowych [44]. Wspomniane moduły obejmują: 9-krotnie powtórzony motyw, spotykany w follistatinie, dwukrotnie powtórzone sekwencje, homologiczne z domeną III łańcuchów β i γ lamininy, pojedynczy region SEA, obecny m.in. w perlekanie oraz C-końcowy region, wykazujący podobieństwo do neureksyny i V domeny perlekanu. Moduły follistatynowe, występujące w części białkowej agryny, są prawdopodobnie miejscami wiązania dla płytkowopochodnego czynnika wzrostowego i transformującego czynnika wzrostowego β [44]. C-końcowa domena agryny jest natomiast niezbędna do tworzenia skupisk receptorów acetylocholinowych na postsynaptycznych błonach zakończeń nerwowo-ruchowych [44].

Czwarta grupa proteoglikanów — według klasyfikacji Kjellen i Lindahla [2] — obejmuje rodzinę syndekanów — przezbłonowych PG z łańcuchami heparanosiarczanowymi, czasem równocześnie także i chondroitynosiarczanowymi, jak w przypadku syndekanu 1 [28, 31]. Spośród czterech znanych typów syndekanów, występowanie syndekanu 1, syndekanu 2 (fibroglikanu) i syndekanu 3 (N-syndekanu)

jest ograniczone do komórek różnicujących się i/lub do określonych typów komórek dojrzałych (Tab. 1) [28, 31]. W odróżnieniu od wymienionych wyżej części, syndekan 4 (amfiglikan) jest proteoglikanem szeroko rozpowszechnionym, występując na błonach prawdopodobnie wszystkich komórek [74, 75]. Białka rdzeniowe syndekanów składają się z trzech obszarów: krótkiej, C-końcowej domeny cytoplazmatycznej, domeny błonowej oraz domeny zewnątrzkomórkowej, zawierającej dwa regiony wiążące łańcuchy glikozaminoglikanowe [28, 31]. Jeden z tych regionów znajduje się blisko N-końca białka rdzeniowego syndekanów, drugi zlokalizowany jest w pobliżu błony komórkowej (Ryc. 2e). Cechą charakterystyczną omawianych PG, zarówno w obrębie jednego gatunku jak i pochodzących od różnych gatunków, jest znaczny strukturalny konserwatyzm miejsc wiązania łańcuchów GAG, miejsca wrażliwego na działanie proteinaz — w obrębie domeny zewnątrzkomórkowej, oraz obszarów błonowych i cytoplazmatycznych [28, 76, 77]. Podobieństwo budowy regionów błonowych oraz cytoplazmatycznych syndekanów w obrębie tego samego gatunku, a także tych PG pochodzących od różnych gatunków zwierząt sięga od 60 do 82% [74, 77]. Duża zachowawczość struktury wszystkich wyżej wymienionych obszarów przemawia za pełnieniem przez nie ważnych, choć jeszcze nie poznanych funkcji. Region cytoplazmatyczny białek rdzeniowych syndekanów posiada — konserwatywnie zlokalizowane — reszty tyrozyny, stanowiące potencjalne miejsca fosforylacji [78]. Wspomniany obszar może także wiązać się z elementami cytoszkieletu [79].

Piąta i ostatnia grupa proteoglikanów — według Kjellen i Lindahla [2] — obejmuje PG serglylowe. Związki te występują w ziarnistościach wydzielniczych kilku typów komórek, w tym mastocytów, komórek naturalnie cytotoksycznych, eozynofili, makrofagów, a także — płytek krwi [2, 5, 9, 19]. Cechą charakterystyczną omawianych proteoglikanów jest obecność w łańcuchach ich białek rdzeniowych obszarów zbudowanych z naprzemiennie ułożonych reszt seryny i glicyny [2, 5, 9, 19]. Reszty serylowe — w większości — są akceptorami łańcuchów glikozaminoglikanowych — heparyn i/lub siarczanów chondroityny [5].

Prowadzone w ostatnich latach badania PG sprawiły, że przedstawioną wyżej klasyfikację tych części należałoby rozszerzyć o rodzinę proteoglikanów heparanosiarczanowych, połączonych z błoną przez glikozylfosfatydyloinozitol. Do tej pory poznano czterech przedstawicieli wspomnianej grupy; glipikan, produkowany przez fibroblasty płucne [80], cerebroglikan, wyizolowany z mózgow szczyrczych embrionów [81], K-glipikan, występujący w mysich nerkach [82] oraz OCI-5, pochodzący z nabłonka jąder szczyrczych embrionów [83]. Białka rdzeniowe wymienionych wyżej proteoglikanów wykazują pewne wspólne cechy: podobną masę cząsteczkową (ok. 60 kDa), zgrupowanie

miejsc wiążących łańcuchy glikanowe blisko C-końca oraz występowanie unikalnego motywu, zawierającego 14 konserwatywnych reszt cysteiny [22].

Wiele typów proteoglikanów pozostaje jednak poza przedstawioną tu klasyfikacją, bądź to z powodu braku danych o strukturze ich białek rdzeniowych, bądź też z powodu posiadania pewnych unikalnych cech budowy, uniemożliwiających zaliczenie tych części do wymienionych wyżej grup. Przykładem cząsteczek o unikalnej strukturze części białkowej jest choćby trombomodulina. Jest to przezbłonowa cząsteczka o charakterze „czasowego” proteoglikanu. Może ona bowiem występować w dwóch formach: zawierającej i nie zawierającej pojedynczego łańcucha chondroitynosiarczanowego [2, 14]. Występowanie trombomoduliny ograniczone jest do błon komórek śródbłonka naczyń, gdzie uczestniczy w aktywacji białka C przez trombinę [2, 14, 84]. Białko rdzeniowe trombomoduliny charakteryzuje się obecnością trzech domen w swej części zewnątrzkomórkowej [14]. Są to: N-końcowa domena hydrofobowa, sąsiadująca z nią domena — zawierająca 6 powtórzeń sekwencji podobnej do naskórkowego czynnika wzrostowego i domena bogata w reszty seryny i treoniny, a wiążąca pojedynczy łańcuch glikanowy. Cała białkowa składowa trombomoduliny kodowana jest przez jeden ekson. Odcinek białka rdzeniowego wspomnianego PG, zawierający moduły podobne do EGF, nie wykazuje aktywności czynnika wzrostowego, lecz jest miejscem wiązania trombiny i nieaktywnej formy białka C [14].

II. Metabolizm proteoglikanów

Proces biosyntezy proteoglikanów rozpoczyna się od powstania białek rdzeniowych [85]. Prekursory białek rdzeniowych, wytwarzane w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej, podlegają tam wstępnym modyfikacjom. Jeszcze w trakcie syntezy białkowych składowych PG usuwane są z nich peptydy sygnałowe [86]. Prawdopodobnie zaraz po ukończeniu translacji (a być może w jej trakcie), na reszty asparaginy, występujące w sekwencji -Asn-X-Thr-Ser (gdzie X jest dowolnym aminokwasem, z wyjątkiem proliny), przenoszone są oligosacharydy, zasobne w reszty mannozy [27, 87]. Jeszcze w obrębie siateczki śródplazmatycznej rozpoczyna się przebudowa tych N-glikozydowo przyłączonych fragmentów cukrowych [87]. Proces ten, kończący się ostatecznie w aparacie Golgiego, obejmuje usunięcie terminalnych reszt cukrowych, w tym części reszt mannozy, oraz przeniesienie na skrócone oligosacharydy reszt N-acetyloglukozoaminy, galaktozy i kwasu N-acetylneuraminowego [87]. Kolejne etapy syntezy PG obejmują powstanie O-glikozydowo przyłączonych oligosacharydów oraz łańcuchów glikozaminoglikanowych [85]. W przypadku proteoglikanów heparanosiarczanowych, wyżej wymienione procesy zachodzą w całości w cysternach aparatu Golgiego [88, 89]. W przypadku natomiast proteoglikanów

chondroityno-dermatanowych wydaje się prawdopodobne, że synteza regionu łączącego łańcuchy glikanowe z białkami rdzeniowymi odbywa się jeszcze w siateczce śródplazmatycznej. W chondrocytach, w obrębie owego przedziału komórkowego stwierdzono bowiem aktywność ksylozylotransferazy — enzymu inicjującego tworzenie regionu łączącego [90].

Powstanie oligosacharydów, O-glikozydowo przyłączonych do białek rdzeniowych, odbywa się na drodze przenoszenia pojedynczych reszt cukrowych na redukujący koniec formującego się łańcucha cukrowego [27, 85]. Tworzenie łańcuchów glikanowych proteoglikanów heparynowych, heparanosiarczanowych i chondroityno-dermatanowych rozpoczyna się syntezą regionu łączącego [2, 20, 27, 89-91]. W proces ten jest zaangażowanych kilka enzymów [2, 20, 27, 89-91]. Ksylozylotransferaza rozpoznaje odpowiednie reszty serylowe i przenosi na nie cząsteczki ksylozy. Galaktozylotransferazy I i II katalizują przeniesienie na nie redukujący koniec syntetyzowanego regionu łączącego dwóch kolejnych reszt galaktozy. Glukuronozylotransferaza I bierze udział w przenoszeniu reszty kwasu glukuronowego, zaś nie scharakteryzowany jeszcze enzym — w fosforylacji przy 2 atomie węgla reszt ksylozy. Przynajmniej dwa pierwsze z wyżej wymienionych enzymów nie są swoiste i mogą brać udział w syntezie regionów łączących zarówno glikanów heparanowych jak i chondroityno-dermatanowych [2]. Donorami reszt cukrowych, uczestniczących tak w syntezie regionu łączącego jak i w elongacji łańcucha glikanowego, są odpowiednie UDP-pochodne [2, 85, 91]. Ich dostępność reguluje zatem proces tworzenia cukrowych składowych PG [85, 91]. Wydłużanie łańcuchów GAG zachodzi przez, katalizowane enzymatycznie, naprzemienne przyłączanie do ich nie redukującego końca reszt N-acetyloheksozoaminy oraz kwasu glukuronowego [2, 27, 85, 91]. W przypadku proteoglikanów chondroityno-dermatanowych stwierdzono istnienie dwu różnych N-acetylogalaktozoaminotransferaz, biorących udział w tym procesie [2]. Pierwsza z nich przenosi resztę heksozoaminy, inicjującą elongację łańcucha, druga uczestniczy w przenoszeniu pozostałych reszt N-acetylogalaktozoaminy. Sugeruje się, że podobne zjawisko dotyczyć może transferaz, biorących udział w procesie syntezy łańcuchów heparyn i siarczanów heparanu [2]. Rodzaj pierwszej reszty heksozoaminowej, przenoszonej na resztę kwasu glukuronowego regionu łączącego, decyduje bowiem o typie syntetyzowanego łańcucha glikanowego. Czynniki, regulujące aktywność enzymów, uczestniczących w tym procesie, są na razie nieznane [2]. Przypuszcza się, że rodzaj syntetyzowanych GAG jest zdeterminowany strukturą białka rdzeniowego — obecność znacznej liczby hydrofobowych reszt aminokwasowych wydaje się faworyzować tworzenie łańcuchów heparanosiarczanowych [92]. Pewną rolę w powyższym procesie mogą odgrywać także siarczanowane reszty galaktozy, obecne jedynie w regio-

nach łączących proteoglikanów chondroityno-dermatanowych [2].

Ostatnim etapem syntezy PG jest modyfikacja łańcuchów glikanowych. Proces ten odbywa się w cysternach aparatu Golgiego i przebiega nieco odmiennie dla różnych klas GAG. Modyfikacja siarczanów heparanu i heparyn rozpoczyna się jeszcze w trakcie elongacji łańcuchów cukrowych i obejmuje kilka procesów, przebiegających w ściśle określonym porządku [20, 91]. Na procesy te składają się: N-deacetylacja z następczą reakcją N-siarczanowania reszt glukozoaminy, epimeryzacja sąsiadujących reszt kwasu glukuronowego do kwasu iduronowego i wreszcie O-siarczanowanie reszt cukrowych. Donorem grup siarczanowych w reakcjach siarczanowania wszystkich typów łańcuchów glikanowych jest 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarczan (PAPS) [20, 91].

Zasięg procesów modyfikujących łańcuchy siarczanów heparanu i heparyn reguluje aktywność enzymu, katalizującego zarówno N-deacetylację i N-siarczanowanie reszt glukozoaminy [20, 91]. Pierwsza z wymienionych reakcji wymaga obecności nie scharakteryzowanego jeszcze, nieenzymatycznego czynnika białkowego, którego poziom wpływa na syntezę heparyn i wysoce zmodyfikowanych frakcji siarczanów heparanu [93].

Wydaje się, że procesy wydłużania łańcuchów glikanowych proteoglikanów chondroityno-dermatanowych mogą zachodzić co najmniej w dwóch różnych przedziałach aparatu Golgiego. Wykazały to badania Wong-Palms i Plaas [94] oraz Ratcliffe i wsp. [95], z użyciem brefeldyny A — czynnika zaburzającego transport pęcherzykowy między siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego. Stwierdzono, że wydłużanie łańcuchów glikanowych małych PG, takich jak dekoryna, odbywa się w obrębie początkowych cystern aparatu Golgiego. Elongacja zaś łańcuchów GAG agrekanu zachodzi tuż przed sekrecją, w dystalnych częściach tegoż aparatu (*trans-Golgi network*). Stosowanie monezyny, jonoforu działającego na aparat Golgiego podobnie do brefeldyny A, pozwoliło ustalić, że również reakcje modyfikacji łańcuchów chondroityno-dermatanowych są przestrzennie oddzielone [96]. Siarczanowanie przy 6 atomie węgla reszt N-acetylogalaktozoaminy zachodzi w cysternach Golgiego, położonych bliżej siateczki śródplazmatycznej [96]. Modyfikacje, prowadzące do powstania łańcuchów DS i obejmujące epimeryzację reszt glukuronianowych oraz siarczanowanie reszt N-acetylogalaktozoaminy przy 4 atomie węgla, są natomiast ściśle ze sobą połączone i odbywają się w dystalnych częściach aparatu Golgiego [97, 98]. Tam także zachodzą reakcje siarczanowania reszt iduronianowych przy 2 atomie węgla [97, 98].

Biosynteza proteoglikanów keratanosiarczanowych poznana jest stosunkowo słabo [27]. Wydaje się, że synteza regionu łączącego KS typu rogówkowego może zachodzić podobnie do tworzenia fragmentów

oligosacharydowych glikoprotein osoczowych [16, 18, 36]. Wydłużanie i siarczanowanie łańcuchów keratynosiarczanowych zachodzi przy udziale enzymów, zlokalizowanych w dystalnych cysternach aparatu Golgiego, i odbywa się w sposób zbliżony do opisanego dla pozostałych, siarczanowanych GAG [16, 18].

Częściowa degradacja PG może zachodzić w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i odbywa się przy udziale endoglikozydaz oraz enzymów proteolitycznych [99]. Do tych pierwszych należą: hialuronoglikoaminidaza (hialuronidaza) — działająca na glikany chondroityno-dermatanowe i kwas hialuronowy oraz heparanoglikuronidaza — hydrolaza, depolimeryzująca siarczany heparanu [99]. Wśród proteinaz szczególną rolę przypisuje się metaloproteinazom [100, 101, 102].

Całkowita degradacja proteoglikanów zachodzi natomiast wyłącznie wewnątrzkomórkowo — w przedziale lizosomalnym i jest poprzedzona endocytozą cząsteczek PG [99, 103]. Ten ostatni proces odbywa się przy udziale swoistych receptorów [99, 103]. Dekoryna, a prawdopodobnie większość proteoglikanów dermatanosiarczanowych, oddziałuje ze wspomnianymi receptorami za pośrednictwem białka rdzeniowego [103]. Proteoglikany heparanosiarczanowe, przynajmniej te, syntetyzowane przez fibroblasty, wiążą się z receptorami za pomocą łańcuchów glikanowych [99]. Wchłonięte PG dermatano-chondroitynowe i heparanosiarczanowe mogą być kierowane na dwa niezależne szlaki degradacyjne, najlepiej poznane w komórkach warstwy ziarnistej jajników szczura [99, 104, 105]. Szlak pierwszy, bardzo szybki, jest przeznaczony m.in. dla HSPG, związanych z błoną poprzez glikozylfosfatydyloinozitol [104, 105]. Endocytowane PG są bezpośrednio transportowane do lizosomów, gdzie podlegają szybkiej degradacji [99, 104, 105]. Proteoglikany, kierowane na drugi szlak, podlegają najpierw — w tzw. przedziale przedlizosomalnym — proteolizie oraz ograniczonej degradacji łańcuchów glikanowych [104, 105]. Powstałe produkty pośrednie są gromadzone w komórkach, by po kilku godzinach ulec całkowitemu i szybkiemu rozpadowi w lizosomach. Znaczenie drugiego szlaku degradacyjnego nie jest całkowicie jasne [104, 105]. W przypadku hepatocytów stwierdzono, że gromadzące się frakcje siarczanów heparanu, zawierające szczególnie dużo 2-O-siarczanowanych reszt glukuronianowych, są transportowane do jądra, gdzie regulują prawdopodobnie aktywność proliferacyjną komórki [17].

Wymienione wyżej szlaki degradacyjne zbiegają się w lizosomach, gdzie proteoglikany lub ich fragmenty ulegają całkowitej hydrolizie [99, 106]. Rozpad łańcuchów glikanowych katalizowany jest przez wspomniany wcześniej rodzaj endoglikozydaz, a następnie przez szereg egzoglikozydaz i sulfataz [99, 106]. Do egzoglikozydaz należą: β -glukuronidaza i α -L-iduronidaza — odszczepiające końcowe reszty kwasowe, α -N-acetyloglikoaminidaza i β -N-acetyloheksoaminidaza — odszczepiające końcowe reszty heksozo-

amin oraz β -galaktozydaza — odrywająca końcowe reszty galaktozy w degradowanych łańcuchach keratynosiarczanowych. Wśród sulfataz są enzymy hydrolizujące estry siarczanowe w obrębie reszt kwasów heksozaminowych i heksozoamin. Egzoglikozydazy i sulfatazy działają w ściśle określonym porządku, zależnym od rodzaju degradowanego łańcucha [99, 106]. I tak, w przypadku fragmentów glikanów chondroityno-dermatanowych i heparanowych, proces rozpadu zaczyna się od działania β -glukuronidazy na wiązanie glikozydowe reszty kwasowej, zlokalizowanej na nie redukującym końcu łańcucha. Następnym etapem jest usunięcie grup siarczanowych w końcowej reszcie heksozoaminy, co poprzedza jej odszczepienie od degradowanego łańcucha. W zależności od tego, czy kolejną resztą, znajdującą się obecnie na końcu łańcucha, jest reszta glukuronianowa czy iduronianowa, do działania przystępuje β -glukuronidaza lub α -L-iduronidaza. Przedstawiona tu sekwencja zdarzeń powtarza się aż do rozpadu całego fragmentu glikanowego. W przypadku degradacji siarczanów keratanu najpierw następuje usunięcie grupy siarczanowej z ostatniej w łańcuchu reszty galaktozy [99, 106]. Potem, odszczepiona zostaje wspomniana reszta. W dalszym etapie, hydrolizie ulega grupa siarczanowa, przyłączona estrowo do — następnej w degradowanym łańcuchu — reszty N-acetyloglikoaminy. Reakcja ta poprzedza oderwanie reszty heksozoaminy od hydrolizowanego łańcucha KS. Opisany wyżej ciąg reakcji powtarza się aż do pełnego rozpadu łańcucha glikanowego [99, 106].

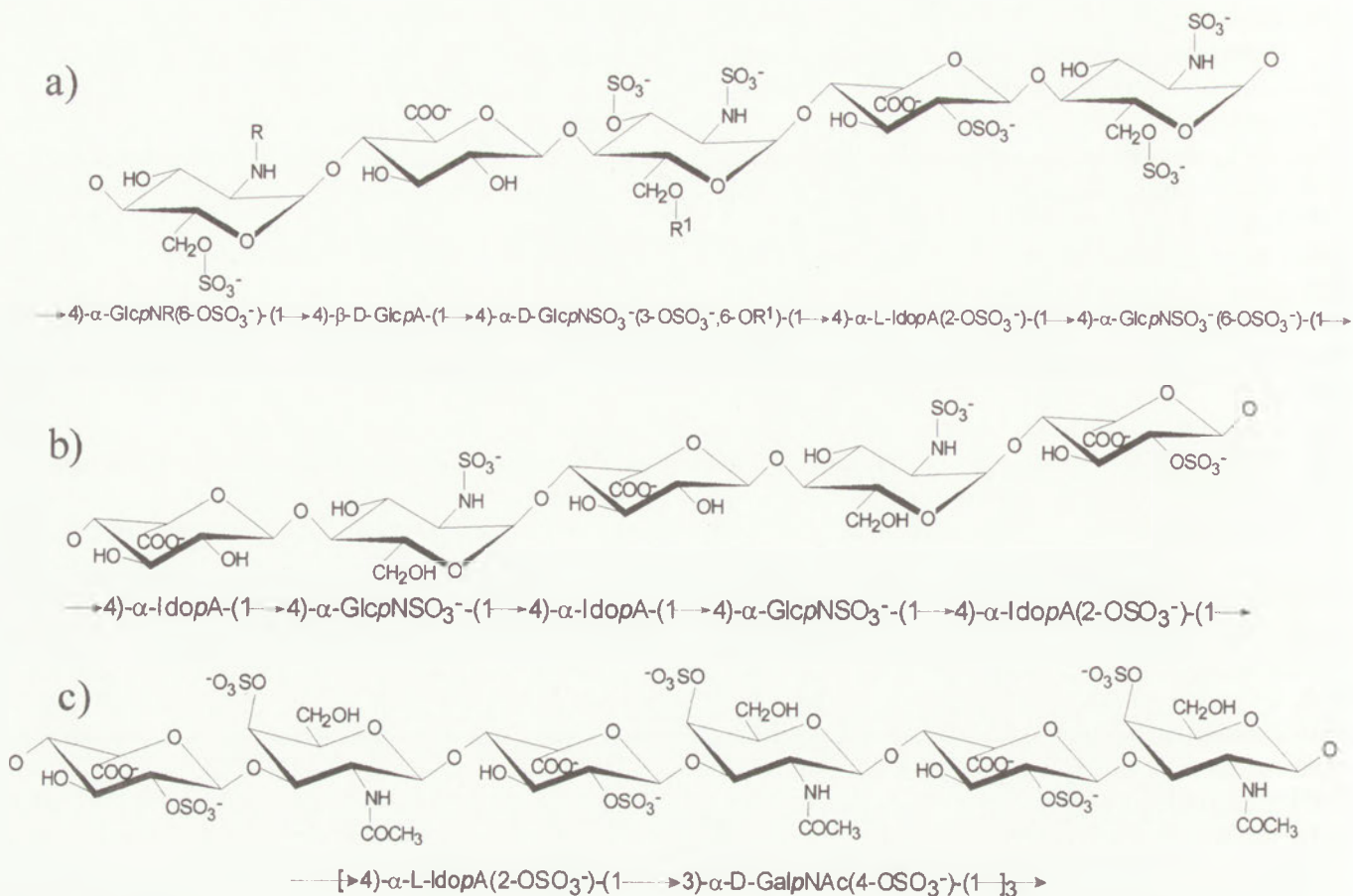
Genetycznie uwarunkowane braki enzymów degradujących GAG przejawiają się w postaci chorób o ciężkim przebiegu, ze spichrzaniem w komórkach oraz wydalaniem z moczem nie rozłożonych glikanów [99].

Do czynników regulujących metabolizm proteoglikanów i glikoaminoglikanów należą:

- hormony: somatotropina [107, 108], insulina [107], hormony steroidowe [109, 110],
- czynniki wzrostowe [111],
- stężenie tlenu w komórce [112],
- skład macierzy zewnątrzkomórkowej [113].

III. Biologiczne funkcje proteoglikanów

Spełnianie funkcji biologicznych przez PG jest uwarunkowane ich oddziaływaniem z różnymi cząsteczkami. W większości tych interakcji uczestniczą glikoaminoglikanowe składniki PG [2, 9]. Jednak do zaistnienia określonego efektu biologicznego konieczny jest zwykle współdziałanie białek rdzeniowych [2]. Łańcuchy glikoaminoglikanowe charakteryzują się dużą gęstością ładunku elektrycznego i wchodzi w interakcje głównie za pośrednictwem oddziaływań elektrostatycznych [2, 9, 114]. Coraz więcej dowodów wskazuje, że owe interakcje wymagają jednak określonej struktury łańcucha glikanowego. Antykoagula-



Ryc. 3. Sekwencje łańcuchów glikozoaminoglikanowych PG, swoiście oddziałujące z różnymi cząsteczkami białkowymi:

a) sekwencja łańcuchów HS, swoiście wiążąca antytrombinę III; R = COCH₃ lub SO₃⁻;

R¹ = SO₃⁻ lub H,

b) sekwencja łańcuchów HS, swoiście wiążąca FGF 2,

c) sekwencja łańcuchów DS, swoiście wiążąca heparynowy kofaktor II.

GalpNAc — N-acetylogalaktozoamina (forma piranozowa), GlcPA — kwas glukuronowy (forma piranozowa), GlcPNAc — N-acetyloglukozoamina (forma piranozowa), GlcPNSO₃ — N-siarczanoglukozoamina (forma piranozowa), IdopA — kwas iduronowy (forma piranozowa).

cyjne właściwości pewnych populacji heparyn i siarczanów heparanu związane są z obecnością pentasacharydu, z unikalną 3-O-siarczanowaną resztą N-siarczanowanej glukozoaminy [9, 14]. Strukturę tego pentasacharydu przedstawia rycina 3a. Także wiązanie siarczanów heparanu z czynnikiem wzrostowym fibroblastów 2 (FGF 2) wymaga występowania specjalnej, pentasacharydowej sekwencji, zawierającej reszty N-siarczanowanej glukozoaminy i 2-O-siarczanowego iduronianu (Ryc. 3b) [115]. Do zaistnienia biologicznego efektu wspomnianego czynnika wzrostowego niezbędny jest już jednak 12-sacharydowy fragment łańcucha glikanowego, zawierający — obok wymienionego wyżej pentasacharydu, odcinek z 6-O-siarczanowanymi resztami glukozoaminy [116]. Prawdopodobnie, opisana wyżej sekwencja łańcucha HS wiążące równocześnie FGF2 i jego tzw. receptor o wysokim powinowactwie [114]. Z kolei, wiązanie czynnika wzrostowego hepatocytów wydaje się zależne od obecności w łańcuchach HS 6-O-siarczanowanych N-siarczanowanych reszt glukozoaminy [117]. Izolowane z jąder komórkowych hepatocytów, frakcje HS o działaniu antyproliferacyjnym, charakteryzują się występowaniem unikalnych, 2-O-siarczanowanych

reszt kwasu glukuronowego [17]. Natomiast łańcuchy heparanosiarczanowe, biorące udział w interakcjach proteoglikanów komórek śródbłonna naczyniowego z L-selektynami, posiadają niespotykane — w przypadku glikozoaminoglikanów — reszty glukozoaminy, o nie podstawionych grupach aminowych [118]. Obecność w łańcuchach glikanowych siarczanów dermatanu heksasacharydowej sekwencji, zawierającej 3 reszty 2-O-siarczanowanego iduronianu jest konieczna do aktywacji przez te GAG heparynowego kofaktora II (Ryc. 3c) [14, 119].

Białka, wchodzące w interakcje ze składnikami glikanowymi PG, charakteryzują się obecnością w miejscach oddziaływań w obrębie łańcucha polipeptydowego, tzw. sekwencji zgodności [9, 114]. Sekwencje te cechują się występowaniem 2 reszt aminokwasów zasadowych (najczęściej argininy), odległych od siebie o ok. 20 Å i rozdzielonych fragmentem łańcucha o konformacji typu α-helisy lub β-struktury [9, 114].

Białka rdzeniowe na różne sposoby uczestniczą w spełnianiu przez PG ich funkcji. Komponent białkowy może kotwiczyć łańcuchy glikanowe PG w określonych miejscach — na błonie komórkowej lub

Tabela 1.

Funkcje biologiczne najlepiej scharakteryzowanych proteoglikanów.

Typ proteoglikanów	Występowanie	Funkcje biologiczne	Piśmien- nictwo
Agrekany	chrząstki	1. utrzymywanie elastyczności chrząstek stawowych, 2. zatrzymywanie wody i jonów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, 3. udział w organizacji struktury macierzy zewnątrzkomórkowej — tworzenie agregatów z HA.	1, 12, 27
Wersikany	luźna tkanka łączna różnych narządów, mięśnie gładkie, chrząstki, ściana naczyń krwionośnych, centralny i obwodowy układ nerwowy	1. hamowanie adhezji komórek, 2. udział w organizacji struktury macierzy zewnątrzkomórkowej — tworzenie agregatów z HA, wpływ na morfologię utkania kolagenowego.	38, 122, 123
Neurokany	tkanka nerwowa	1. udział w organizacji struktury macierzy zewnątrzkomórkowej — tworzenie agregatów z HA, 2. regulacja wzrostu aksonów, 3. hamowanie adhezji neuronów.	39
Dekoryny	wszystkie typy tkanki łącznej, bogate w kolageny typu I i II	1. udział w fibrogeniezie kolagenu, 2. przeciwdziałanie mineralizacji kolagenu, 3. hamowanie adhezji komórek przez oddziaływanie z fibronektyną, 4. hamowanie adhezji fibroblastów do trombospondyny, 5. modulowanie działania TGFβ.	6, 66, 121, 124-127
Biglikany	ściana naczyń krwionośnych, kość, chrząstki, błony komórkowe keratynocytów	1. hamowanie adhezji komórek przez oddziaływanie z fibronektyną, 2. hamowanie aktywności TGFβ, 3. udział w regulacji funkcji keratynocytów.	6, 26, 66, 121
Fibromoduliny	chrząstki, ścięgna	udział w fibrogeniezie kolagenu.	6, 44, 57
Lumikany	rogówka, wątroba, mięśnie, chrząstki	utrzymywanie przezroczystości rogówki.	44, 125, 128
Perlekany	błony podstawne komórek śród-błonkowych i nabłonkowych, przykomórkowa macierz fibroblastów płucnych i komórek raka okrężnicy, macierz zewnątrzkomórkowa chrząstki	1. udział w tworzeniu struktury błon podstawnych, 2. regulacja przepuszczalności błon podstawnych w kłębuszkach nerkowych, 3. udział w adhezji komórek śródbłonka i hepatocytów, 4. udział w rozwoju tkanki mięśniowej, 5. wiązanie czynników wzrostowych: GM-CSF, FGF2, Il-3.	7, 8, 9, 44 68, 69, 71
Sydekan-1, fibroglikan (sydekan-2), N-sydekan (sydekan-3), amfiglikan (sydekan-4).	błony komórek nabłonkowych, limfocytów B oraz komórek różnicujących się błony komórkowe fibroblastów i hepatocytów błony komórek nerwowych embriionów szczurzych w większej ilości — na błonach komórek tkanki łącznej i nabłonka	1. udział w zjawisku adhezji komórek: — udział w organizacji struktury nabłonka, — regulacja funkcji receptorów integrynowych. — wiązanie antyadhezyjnych glikoprotein macierzy zewnątrzkomórkowej: tenascyny i trombospondyny, — wpływ na organizację cytoszkieletu, 2. udział w procesach różnicowania i proliferacji przez: — pełnienie roli koreceptorów (FGF2) lub receptorów (FGF1, plejotrofina, midkina) czynników wzrostowych.	28, 31, 74, 75, 77-79
Agryny	synapsy neuronów ruchowych, błony podstawne nabłonka kanałików nerkowych	1. udział w regeneracji synaps zakończeń nerwowo-ruchowych, 2. udział w różnicowaniu obszaru postsynaptycznego zakończeń nerwowo-ruchowych m.in. przez:	44, 72, 73

Tabela 1 c.d.

Typ proteoglikanów	Występowanie	Funkcje biologiczne	Piśmiennictwo
Agryny		<ul style="list-style-type: none"> — wpływ na tworzenie skupisk receptora acetylocholinowego, — wpływ na syntezę i kumulację esterazy acetylocholinowej. 	
Betaglikany	błony komórkowe prawdopodobnie wszystkich typów komórek	udział w procesach proliferacji i różnicowania przez: <ul style="list-style-type: none"> — pełnienie roli koreceptora dla TGFβ, — wiązanie FGF2. 	29, 120
Proteoglikany 6B4	błony komórek Golgiego w mózgu szczurów	udział w rozwoju mózdzku	39
Trombomoduliny	błony komórek śródbłonna naczyniowego	udział w regulacji hemostazy przez: <ul style="list-style-type: none"> — współudział w aktywacji białka C, — hamowanie działania trombiny na fibrynogen i czynnik V, — stymulację inaktywacji trombiny przez antytrombinę. 	14, 84
Rodzina CD44	błony komórek układu krwiotwórczego, nabłonków, fibroblastów, limfocytów, komórek tkanki nerwowej	udział w zjawiskach adhezji, migracji, proliferacji i różnicowania przez: <ul style="list-style-type: none"> — oddziaływania z komponentami macierzy: kwasem hialuronowym, fibronektyną, kolagenem, — wpływ na organizację cytoszkieletu. 	1, 30, 46
Glipikany	fibroblasty, komórki śródbłonna naczyń, komórki ziarniste szczurzych jajników	1. udział w regulacji hemostazy 2. udział w zjawisku adhezji przez oddziaływania z fibronektyną	3, 21, 22, 80
Cerebroglukany	komórki embrionalnych mózgów szczurzych	udział w procesach różnicowania neuronów.	21, 39, 81
Proteoglikany serglycyłowe	ziarnistości wydzielnicze mastocytów, bazofili, komórek naturalnie cytotoksycznych, eozynofili, limfocytów T, płytek krwi, komórek w białaczkach promielocytarnych	1. udział w regulacji aktywności enzymów przez wiązanie zasadowych proteaz, 2. udział w tworzeniu i utrzymywaniu określonych warunków fizykochemicznych wakuoli wydzielniczych przez: <ul style="list-style-type: none"> — utrzymywanie elektroobjętości ziarnistości wydzielniczych, — zagęszczanie cząsteczek podlegających wydzielaniu. 	2, 5, 9, 19

w macierzy zewnątrzkomórkowej i nadawać jednocześnie tym łańcuchom orientację przestrzenną, niezbędną do zaistnienia ich biologicznej aktywności [2, 9]. Białka rdzeniowe PG przezbłonowych mogą także brać udział w transdukcji sygnału z przestrzeni zewnętrznej, poprzez łańcuchy GAG, do wnętrza komórki [2, 28, 31]. Białka te mogą także reagować z różnymi cząsteczkami, niezależnie od składników glikanowych PG [2, 6, 7, 28, 29, 120, 121].

Przykłady biologicznych funkcji PG przedstawiono w tabeli 1.

Artykuł otrzymano 12 maja 1997 r.

Zaakceptowano do druku 3 czerwca 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Hardingham TE, Fosang AJ (1992) *FASEBJ* 6: 861-870
2. Kjellen L, Lindahl U (1991) *Annu Rev Biochem* 60: 443-475
3. Fransson LA (1987) *ITBS* 12: 406-411
4. Höök M, Kjellen L, Johansson S, Robinson J (1984) *Annu Rev Biochem* 53: 847-869
5. Stevens RL, Kamada MM, Serafin WE (1988) *Cur Topics Microbiol Immun* 140: 93-108
6. Kresse H, Hausser H, Schönherr E (1993) *Experientia* 49: 403-416
7. Murdoch AD, Iozzo RV (1993) *Virchows Archiv A Pathol Anat* 423: 237-242
8. Paulsson M (1992) *Crit Rev Biochem Molec Biol* 27: 93-127
9. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD (1991) *Physiol Rev* 71: 481-525
10. Scott JE (1988) *Biochem J* 252: 313-325
11. Głowacki A, Koźma EM, Olczyk K, Kucharz EJ (1995) *Post Biochem* 41: 139-148
12. Żak I (1995) *Post Biol Komórki* 22: 317-341
13. Kennedy JF (1979) *Proteoglycans — biological and chemical aspects in human life*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York, str. 29-44
14. Bourin MC, Lindahl U (1993) *Biochem J* 289: 257-264
15. Oeben M, Keller R, Stuhlsatz HW, Greiling H (1987) *Biochem J* 248: 85-93

16. Stuhlsatz HW, Keller R, Becker G, Oeben M, Lennartz L, Fisher DC, Greiling H (1989) W: Greiling H, Scott JE (red) Keratan sulphate — chemistry, biology, clinical pathology. The Biochemical Society, London, str. 1-11
17. Fedarko NS, Conrad HE (1986) *J Cell Biol* **102**: 587-599
18. Greiling H (1994) W: Jolles P (red) Proteoglycans. Birkhauser Verlag, Basel, str 101-122
19. Gallagher JT, Lyon M, Steward WP (1986) *Biochem J* **236**: 313-325
20. Lindahl U (1989) W: Lane DA, Lindahl U (red) Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications. Hodder and Stoughton, London, Melbourne, Auckland, str 159-190
21. David G (1993) *FASEB J* **7**: 1023-1030
22. David G, Dannels A, Duerr J, Grootjans J, Mertens G, Nackaerts K, Romaris M, Schrurs B, Steinfeld R, Vekemans S (1995) *Atherosclerosis* **118**: (suppl): S57-S67
23. Comper WD, Laurent TC (1978) *Physiol Rev* **58**: 255-315
24. Gallagher JT, Turnbull JE, Lyon M (1992) W: Lane DA, Björk J, Lindahl U (red) Heparin and related polysaccharides. Plenum Press, New York, str 49-57
25. Nieduszynski IA, Huckerby TN, Dickenson JM, O'Rowan GM, Gui-Hua T, Bayliss MT (1990) *Biochem Soc Trans* **18**: 792-793
26. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Gehron Robey P (1990) *J Histochem Cytochem* **38**: 1549-1563
27. Carney SL, Muir H (1988) *Physiol Rev* **68**: 858-910
28. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**: 365-393
29. Lopez-Cassillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J (1991) *Cell* **67**: 785-795
30. Ruiz P, Schwärzler Ch, Gunthert U (1995) *BioEssays* **17**: 17-24
31. Salmivirta M, Jalkanen M (1995) *Experientia* **51**: 863-872
32. Poole A (1986) *Biochem J* **236**: 1-14
33. Fransson LA, Cheng F, Yoshida K, Heinegard D, Malmström A, Schmidtchen A (1993) W: Scott JE (red) Dermatan sulphate proteoglycans. Chemistry, biology, chemical pathology. Portland Press, London and Chapel Hill, str 11-26
34. Malmström A, Carlstedt J, Aberg L, Fransson LA (1975) *Biochem J* **151**: 477-489
35. Fransson LA, Havsmark B, Silverberg I (1990) *Biochem J* **269**: 381-388
36. Hascall VC, Midura RJ (1989) W: Greiling H, Scott JE (red) Keratan sulphate — chemistry, biology, clinical pathology. The Biochemical Society, London, str 66-73
37. Bode-Leśniewska B, Dours-Zimmermann MT, Odermatt BF, Briner J, Heitz PU, Zimmermann DR (1996) *J Histochem Cytochem* **44**: 303-312
38. Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M, Bruckner-Tuderman L (1994) *J Cell Biol* **124**: 817-825
39. Margolis RK, Margolis RU (1993) *Experientia* **45**: 429-446
40. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y (1994) *J Biol Chem* **269**: 10119-10126
41. Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y (1991) *J Biol Chem* **266**: 894-902
42. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK (1992) *J Biol Chem* **267**: 19536-19547
43. Zimmermann DR, Ruoslahti E (1989) *EMBO J* **8**: 2975-2981
44. Iozzo RV, Murdoch AD (1996) *FASEB J* **10**: 598-614
45. Perkins SJ, Nealis A, Dudhia J, Hardingham TE (1989) *J Mol Biol* **206**: 737-753
46. Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H (1994) *Curr Opin Cell Biol* **6**: 726-733
47. Goldstein LA, Zhou DFH, Picker LJ, Minty CN, Bargatze RF, Ding JF, Butcher EC (1989) *Cell* **56**: 1063-1072
48. Fosang AJ, Hardingham TE (1989) *Biochem J* **269**: 801-809
49. Halberg DF, Proulx G, Doege K, Yamada Y, Drickamer K (1988) *J Biol Chem* **263**: 9486-9490
50. Rosenberg LC, Choi HU, Tang LH, Johnson TL, Pal S, Webber C, Reiner A, Poole A (1985) *J Biol Chem* **260**: 6304-6313
51. Scott PG, Nakano T, Dodd CM (1995) *Biochim Biophys Acta* **1244**: 121-128
52. Vogel KG, Evanko SP (1987) *J Biol Chem* **262**: 13607-13613
53. Shinomura T, Kimata K (1992) *J Biol Chem* **267**: 1265-1270
54. Eggen KH, Malmstrom A, Kolset SO (1994) *Biochim Biophys Acta* **1204**: 287-297
55. Schönherr E, Beavan LA, Hausser H, Kresse H, Culp LA (1993) *Biochem J* **290**: 893-899
56. Järveläinen HT, Kinsella MG, Wight TN, Sandel LJ (1991) *J Biol Chem* **266**: 23274-23281
57. Plaas AHK, Neame PJ, Nivens CM, Reiss L (1990) *J Biol Chem* **265**: 20634-20641
58. Asundi VK, Dreher KL (1992) *Eur J Cell Biol* **59**: 314-321
59. Blochberger TC, Vergens JP, Hempel J, Hassell JR (1992) *J Biol Chem* **267**: 347-352
60. Krusius T, Ruoslahti E (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7683-7687
61. Neame PJ, Choi HU, Rosenberg LC (1989) *J Biol Chem* **264**: 8653-8661
62. Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D (1989) *EMBO J* **8**: 2601-2604
63. Scholzen T, Solorush M, Suzuki S, Reiter R, Morgan JL, Buchberg AM, Siracusa LD, Iozzo RV (1994) *J Biol Chem* **269**: 28270-28281
64. Scott JE, Cummings Ch (1995) *Biochemical Soc Transactions* **23**: 515S
65. Svensson L, Heinegard D, Oldberg A (1995) *J Biol Chem* **270**: 20712-20716
66. Yamaguchi Y, Mann D, Ruoslahti E (1990) *Nature (Lond)* **346**: 281-284
67. Couchman JR, Kapoor R, Sthanam M, Wu RR (1996) *J Biol Chem* **271**: 9595-9602
68. Kallunki P, Trygvason K (1992) *J Cell Biol* **116**: 559-571
69. Heremans A, Van Der Schuren B, De Cock B, Paulsson M, Cassiman JJ, Van Den Berghe H, David G (1988) *J Cell Biol* **109**: 3199-3211
70. Koda JE, Bernfield M (1981) *J Biol Chem* **259**: 11763-11770
71. Frenette GP, Ruddon RW, Krzesicki RF, Naser JA, Peters PB (1989) *J Biol Chem* **264**: 3078-3084
72. Tsen G, Halfler W, Kroger S, Cole GJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 3392-3399
73. Hagen SG, Michael AF, Butkowski RJ (1993) *J Biol Chem* **268**: 7261-7269
74. David G, van der Schueren B, Marynen P, Cassiman JJ, Van den Berghe H (1992) *J Cell Biol* **118**: 961-969
75. Yanagishita M (1993) *Acta Pathol Jap* **43**: 283-293
76. Kojima T, Shworak NW, Rosenberg RD (1992) *J Biol Chem* **267**: 4870-4877
77. Mali M, Jaakkola P, Arvilommi AM, Jalkanen M (1990) *J Biol Chem* **265**: 6884-6889
78. Upholt WB, Koshor RA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3271-3275
79. Carey DJ, Stahl RC, Tucker B, Bendt KA, Cizmeci-Smith G (1994) *Experimental Cell Res* **214**: 12-21
80. David G, Lories V, Decock B, Marynen P, Cassiman JJ, Van den Berghe H (1990) *J Cell Biol* **111**: 3165-3169
81. Stipp CS, Litwack ED, Lander AD (1994) *J Cell Biol* **124**: 149-155
82. Watanabe K, Yamaguchi Y (1994) *Mol Biol Cell* **5**: 301-307
83. Filmus JJ, Church G, Buick RN (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 4243-4248
84. Esmon CT (1989) *J Biol Chem* **264**: 4743-4746
85. Stoddart RW (1984) W: Stoddart RW (red) Polysaccharide assembly in Eukaryotes. Macmillan Publishing Company, New York, str 179-261

86. Sawhney RS, Hering TM, Sandell LJ (1991) *J Biol Chem* **266**: 9231-9240
87. Kornfeld R, Kornfeld S (1985) *Ann Rev Biochem* **5**: 631-664
88. Lindahl U, Kusche M, Lindholdt K, Oscarrson LG (1989) *Ann NY Acad Sci USA* **556**: 36-50
89. Nuwayhid N, Glaser JH, Johnson JC, Conrad HE, Hauser SC, Hirschberg CB (1986) *J Biol Chem* **261**: 12936-12941
90. Hoffman HP, Schwartz NB, Rodén L, Prockop DJ (1984) *Connect Tiss Res* **12**: 151-164
91. Rodén L, Ananth S, Campbell P, Curenton T, Ekborg G, Manzella S, Pillion D, Meezan E (1992) W: Lane DA, Björk J, Lindahl U (red) Heparin and related polysaccharides. Plenum Press, New York, str 1-20
92. Fritz TA, Lugerma FN, Sarkar AK, Esko JP (1994) *J Biol Chem* **269**: 300-307
93. Unger E, Pettersson I, Eriksson UJ, Lindahl U, Kjellen L (1991) *J Biol Chem* **266**: 8671-8674
94. Wong-Palms S, Plaas AHK (1995) *Arch Biochem Biophys* **319**: 383-392
95. Ratcliffe A, Fryer P, Hardingham TE (1985) *J Cell Biol* **101**: 2355-2365
96. Hoppe W, Glössl J, Kresse H (1985) *Eur J Biochem* **152**: 91-97
97. Malmström A, Cöster L, Fransson LA, Hagner-McWhirter A, Westergren-Thorsson G (1993) W: Scott JE (red) Dermatan sulphate proteoglycans. Chemistry, biology, chemical pathology. Portland Press, London and Chapel Hill, str 129-138
98. Silbert JE, Silbert CK, Humphries DE, Sugumarán G (1993) W: Scott JE (red) Dermatan sulphate proteoglycans. Chemistry, biology, chemical pathology. Portland Press, London and Chapel Hill, str 147-158
99. Kresse H, Glössl J (1987) *Adv Enzymol* **60**: 217-311
100. Girard MT, Matsubara M, Kublin C, Tessier MJ, Cintron Ch, Fini ME (1993) *J Cell Sci* **104**: 1001-1011
101. Maquart FX, Gillery P, Kalis B, Borel JP (1994) *Eur J Dermatol* **4**: 91-97
102. Mauviel A, Kähäri VM, Kurkinen M, Evans CH, Uitto J (1992) *J Cell Biochem* **50**: 53-61
103. Hauser H, Ober B, Quentin-Hoffmann E, Schmidt B, Kresse H (1992) *J Biol Chem* **267**: 11559-11564
104. Yanagishita M (1992): Lane DA, Björk J, Lindahl U (red) Heparin and related polysaccharides. Plenum Press, New York, str 113-120
105. Yanagishita M, Hascall VC (1992) *J Biol Chem* **267**: 9451-9454
106. Freeman C, Hopwood J (1992) W: Lane DA, Björk J, Lindahl U (red) Heparin and related polysaccharides. Plenum Press, New York, str 121-134
107. Thøgersen VB, Heickendorff L, Ledet T (1996) *Eur J Endocrinol* **134**: 326-330
108. Zhang CZ, Li H, Bertold PM, Young WG, Waters MJ (1995) *J Dent Res* **74**: 1636-1643
109. Kimoto S, Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV (1994) *Endocrinol* **135**: 2423-2431
110. Kähäri VM, Häkkinen L, Westermarck J, Larjava H (1995) *J Invest Dermatol* **104**: 503-508
111. Nietfeld JJ (1993) *Experientia* **49**: 456-469
112. Scott JE, Haigh M (1988) *J Anat* **158**: 95-108
113. Greve H, Blumberg P, Schmidt G, Schlumberger W, Rauterberg J, Kresse H (1990) *Biochem J* **269**: 149-155
114. Spillmann D, Lindahl U (1994) *Curr Opin Struct Biol* **4**: 677-682
115. Maccarana M, Casu B, Lindahl U (1993) *J Biol Chem* **268**: 23898-23905
116. Guimond S, Maccarana M, Olwin BB, Lindahl U, Rapraeger AC (1993) *J Biol Chem* **268**: 23906-23914
117. Lyon M, Deakin JA, Mizuno K, Nakamura T, Gallagher JT (1994) *J Biol Chem* **269**: 11216-11223
118. Norgard-Sumnicht K, Varki A (1995) *J Biol Chem* **270**: 12012-12024
119. Maimone MM, Tollefsen DM (1990) *J Biol Chem* **265**: 18263-18271
120. Attisano L, Wrana JL, Lopez-Casillas F, Massagué J (1994) *Biochim Biophys Acta* **1222**: 71-80
121. Lewandowska K, Choi HU, Rosenberg LC, Zardi L, Culp LA (1987) *J Cell Biol* **105**: 1443-1454
122. Yamagata M, Kimata K (1994) *J Cell Sci* **107**: 2581-2590
123. Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K (1988) *J Biol Chem* **264**: 8012-8018
124. Schmidt G, Robenek H, Harrach B, Glössl J, Nolte V, Hörmann H, Richter H, Kresse H (1987) *J Cell Biol* **104**: 1683-1691
125. Scott JE (1993) W: Scott JE (red) Dermatan sulphate proteoglycans. Chemistry, biology, chemical pathology. Portland Press, London and Chapel Hill, str 165-181
126. Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T (1994) *J Biol Chem* **269**: 32634-32638
127. Winnemöller M, Schön P, Vischer P, Kresse H (1992) *Eur J Cell Biol* **59**: 47-55
128. Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR (1993) *Exp Eye Res* **56**: 635-648

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

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

KOMUNIKAT

Komisji Słownictwa Biochemicznego

1. Antagoniści czy antagonisty?

Stosowanie liczby mnogiej wyrazów „agonista, antagonistą” na określenie substancji chemicznych budzi wiele kontrowersji. Po konsultacji z językoznawcą prof. dr Janem Miodkiem Komisja ustaliła co następuje:

Formy „agoniści, antagoniści” są niewłaściwe, gdyż można je stosować jedynie w odniesieniu do rzeczowników osobowych (np.: antagoniści działali...) Rzeczowniki nieosobowe przybierają formy „agonisty, antagonisty” (np. agonisty działały...).

Za godne zalecenia Komisja uważa nazwy wprowadzone przez prof. dr Ryszarda Piękosia: **agon** i **antagon**. Określają one bardzo dobrze właściwe im działanie i nie budzą zastrzeżeń w liczbie mnogiej: agony i antagony.

2. Cytosol czy cytosol?

Używając spolszczonych nazw należy się kierować ich oryginalnym źródłosłowem łacińskim lub greckim, a nie formą przetworzoną w innych językach, np. w niemieckim. Poprawną formą jest:

cytosol a nie cytozol

lizosom a nie lizozom

ekson (od: ekspresja) a nie egzon, itp.

Przewodnicząca Komisji Słownictwa Biochemicznego
Prof. dr hab. Janina Kwiatkowska-Korczak

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

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

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

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

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

Geny otyłości

Obesity genes

JULIAN ŚWIERCZYŃSKI¹,
ZDZISŁAW KOCHAN²,
JOANNA KARBOWSKA³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Geny otyłości
 - II-1. Geny *ob* (obese) i *db* (diabetes)
 - II-2. Gen *fat*
 - II-3. Gen *tub*
 - II-4. Gen *agouti*
- III. Leptyna-kluczowy element w przekazywaniu informacji pomiędzy tkanką tłuszczową a centralnym układem nerwowym
 - III-1. Rola leptyny, Ob-R, NPY, MSH i MC4-R w regulacji spożycia pokarmów
 - III-2. Wyniki doświadczeń wskazujących na istnienie genów *ob* i *db*
 - III-3. Leptyna jako lek odchudzający?
- IV. Tkanka tłuszczowa jako narząd wydzielniczy

Wykaz stosowanych skrótów: ACTH (ang. *adrenocorticotrophic hormone*) — adrenokortykotropina; BMI (ang. *body mass index*) — wskaźnik masy ciała; IL-6 — interleukina-6; MSH (ang. *melanocyte stimulating hormone*) — hormon melanotropowy; MC4-R — receptor hormonu melanotropowego; NPY — neuropeptyd Y; Ob-R — receptor leptyny; TNF — czynnik martwicy nowotworu; WHO — Światowa Organizacja Zdrowia; Y5 — receptor neuropeptydu Y.

I. Wstęp

Otyłość jest najczęściej definiowana jako zaburzenie homeostazy przemian energetycznych ustroju, prowadzące do zwiększenia masy tkanki tłuszczowej, a w konsekwencji do zwiększenia masy ciała. Dla oceny wielkości masy ciała stosuje się zwykle *Wskaźnik Masy Ciała* (ang. *Body Mass Index* — *BMI*), który oblicza się ze wzoru: $BMI = \text{masa ciała w kg} / (\text{wzrost w m})^2$. Jego wartość liczbową jest ściśle związana z zawartością tłuszczu w organizmie. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) wartość BMI w zakresie 18,5-25 kg/m² odpowiada prawidłowej masie ciała, natomiast wartości powyżej 25 kg/m² wskazują na różny stopień otyłości.

Otyłość, obok chorób nowotworowych i degeneracyjnych, stanowi jeden z ważniejszych problemów

Contents:

- I. Introduction
- II. Obesity genes
 - II-1. *ob* and *db* genes
 - II-2. *fat* gene
 - II-3. *tub* gene
 - II-4. *agouti* gene
- III. Leptin—the important element of the signalling pathway between adipose tissue and central nervous system
 - III-1. Role of leptin, Ob-R, NPY, MSH and MC4-R in regulation of food intake
 - III-2. Results of experiments suggesting the existence of *ob* and *db* genes
 - III-3. Leptin as an antiobesity drug?
- IV. Adipose tissue as an endocrine organ

współczesnych czasów. Powszechnie wiadomo, że jest ona nie tylko czynnikiem ryzyka w cukrzycy, w chorobach układu krążenia, wątroby i nerek, ale także utrudnia ich leczenie. Ponadto należy pamiętać, że otyłości nie da się wyleczyć. Można jej jedynie skutecznie zapobiegać stosując odpowiednią dietę, wysiłek fizyczny oraz odpowiednie leki [1]. U podstaw otyłości leży dodatni bilans energetyczny spowodowany nadmiernym spożyciem pokarmów z jednoczesnym ograniczeniem wysiłku fizycznego [1]. Etiologia otyłości nie jest znana, a wśród jej przyczyn wymienia się najczęściej czynniki genetyczne, neurogenne, psychiczne, hormonalne i środowiskowe [1-5]. Badania przeprowadzone na myszach z mutacją w genie *ob* lub *db* wskazują, że otyłość może być dziedziczna. U ludzi otyłość wykazuje charakter rodzinny, jednak bezpośrednich dowodów na dziedziczne przekazywanie otyłości do tej pory nie przedstawiono. Dlatego też powszechnie panuje przekonanie, że dziedziczy się predyspozycje do otyłości, a nie samą otyłość. Jednak badania prowadzone przez wiele lat nad otyłością u bliźniąt jednojajowych wychowywanych oddzielnie wskazują, że czynniki środowiskowe (warunki życia, częstość, jakość i ilość spożywanych posiłków) odgrywają niewielką rolę w rozwoju otyłości [6]. Te wyniki sugerowały, że czynniki genetyczne muszą odgrywać ważną rolę w rozwoju otyłości również u ludzi [6]. W wielu laboratoriach na świecie poszukiwano genów, które mogłyby kontrolować ilość

¹ Prof. dr hab., ² dr, ³ mgr, Katedra i Zakład Biochemii A.M. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

spożywanych pokarmów oraz aktywność fizyczną i w konsekwencji zapobiegać otyłości. Wydaje się, że muszą istnieć grupy genów, które współdziałając ze sobą kontrolują masę ciała. Mutacje w obrębie tych genów mogłyby prowadzić do otyłości.

II. Geny otyłości

Intensywne badania prowadzone przez wiele lat doprowadziły do sklonowania pięciu genów, które obecnie zalicza się do genów otyłości (Tab. 1).

II-1. Geny *ob* (obese) i *db* (diabetes)

Duże znaczenie dla zrozumienia etiologii otyłości może mieć niedawno odkryty u myszy, szczurów i u ludzi gen otyłości (gen *ob*). Metodą pozycyjnego klonowania scharakteryzowano myszy gen otyłości [7, 8], a następnie jego szczurze [9] i ludzkie [10] homologi. Ekspresja tego genu zachodzi wyłącznie w tkance tłuszczowej (białej i brunatnej) [7] i jest regulowana zarówno przez hormony jak i czynniki dietetyczne [7, 8, 11]. Wykazano, że głodzenie szczurów powoduje szybki spadek ilości mRNA leptyny (produktu genu *ob*) [11], natomiast karmienie uprzednio głodzonych zwierząt powoduje w ciągu kilku godzin znaczny wzrost poziomu tego mRNA [11]. Stężenie mRNA leptyny w tkance tłuszczowej szczura wykazuje również zmiany dobowe. Jego poziom zwiększa się w godzinach nocnych, w kilka godzin po

rozpoczęciu spożywania pokarmu, i spada w dzień, kiedy szczury nie spożywają paszy [11]. Głodzenie zwierząt całkowicie znosi te dobowe zmiany stężeń mRNA leptyny, co wskazuje, że są one zależne od pobierania pokarmu [11]. Pięciokrotny wzrost stężenia mRNA leptyny stwierdzono u szczurów podanych wielokrotnie powtarzanym cyklem głodzenia-karmienia [12]. Należy dodać, że u tak traktowanych zwierząt aktywność enzymów lipogenetycznych w białej tkance tłuszczowej wzrasta wielokrotnie [13]. Znaczny spadek ilości mRNA leptyny obserwowano u szczurów z doświadczalną cukrzycą wywołaną streptozotocyną, a podanie insuliny miało niewielki wpływ na poziom tego mRNA [14]. Wyniki tych doświadczeń należy jednak interpretować z pewną ostrożnością, ponieważ długotrwałe traktowanie zwierząt streptozotocyną powoduje redukcję masy tkanki tłuszczowej i zmniejszenie wielkości adipocytów. W związku z tym spadek stężenia mRNA leptyny może być skutkiem działania streptozotocyny na adipocyty. Jednorazowe podanie insuliny głodzonemu szczurom powoduje znaczny wzrost ilości mRNA leptyny [11]. Badania na hodowlach komórkowych jednoznacznie wskazują, że insulina reguluje ekspresję genu *ob* na poziomie transkrypcji [15]. Podanie insuliny szczurom powoduje także wzrost stężenia leptyny w surowicy [16]. Insulina dodana do hodowli tkankowej również powoduje wzrost stężenia leptyny w środowisku inkubacyjnym [15]. Wyniki tych doświadczeń jednoznacznie wskazują, że insulina odgrywa istotną rolę w regulacji

Tabela 1.

Geny otyłości u myszy.

Gen	Chromosom, Dziedziczenie, Rok sklonowania	Miejsce ekspresji	Produkt genu i mechanizm jego działania
<i>ob</i> <i>obese</i>	6 Autosomalne, Cecha recesywna 1994	Tkanka tłuszczowa	Leptyna („hormon sytości”, hormon odchudzający) białko o m.c. 16 kD wydzielane przez adipocyty do krwi, łączy się z receptorem leptyny (Ob-R) w podwzgórzu, a w konsekwencji hamuje syntezę NPY (hormon łaknienia). Podana (egzogenna) leptyna powoduje zmniejszenie spożycia pokarmów i spadek masy ciała.
<i>db</i> <i>diabetes</i>	4 Autosomalne, Cecha recesywna 1995	Podwzgórze, splot naczyniówkowy, inne narządy (?)	Receptor leptyny (Ob-R), białko o m.c. około 81 kD. Przyłączenie leptyny do receptora powoduje jego dimeryzację, której skutkiem jest zahamowanie syntezy NPY (i prawdopodobnie innych neuropeptydów).
<i>fat</i>	8 Autosomalne, Cecha recesywna 1995	Tkanki endokryjne i neuroendokryjne	Karboksypeptydaza E, enzym katalizujący przemianę proinsuliny w insulinę.
<i>A^y</i> <i>agouti</i>	2 Autosomalne, Cecha dominująca 1992	Skóra u myszy normalnych, wszechobecny u mutantów	Agouti, peptyd, antagonist receptoru (MC4-R) hormonu melanotropowego (MSH). Hamowanie przez peptyd agouti MC4-R jest prawdopodobnie przyczyną otyłości u myszy <i>A^y</i> .
<i>tub</i> <i>tubby</i>	7 Autosomalne, Cecha recesywna 1996	podwzgórze, oko, jądra	Tubby, białko zbudowane z 505 aminokwasów, mechanizm działania nieznan.

syntezy leptyny. Ostatnio opublikowane dane sugerują, że leptyna może również regulować syntezę i sekrecję insuliny z komórek β trzustki [17]. Wykazano bowiem obecność receptora leptyny w tych komórkach [17]. Na tej podstawie sugeruje się, że leptyna może zapobiegać otyłości poprzez hamowanie sekrecji insuliny, obniżając jej stężenie w surowicy [17]. Wykazano również, że ekspresja szczurzego genu otyłości jest indukowana przez glukokortykoidy, co prowadzi do obniżenia spożycia pokarmu, a w konsekwencji do spadku masy ciała [18]. Duży wpływ na ekspresję genu *ob* wywiera ekspozycja zwierząt na zimno, która prowadzi do zwiększonego wydatku energetycznego, szczególnie u małych gryzoni. U myszy poddanych przez 18 godzin działaniu niskiej temperatury (5°C) obserwowano całkowity zanik mRNA leptyny [19]. Podobne zmiany w poziomie mRNA leptyny wywołuje traktowanie zwierząt noradrenaliną lub agonistą β -adrenergicznym, izoprenaliną [19]. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że układ sympatyczny może odgrywać istotną rolę w regulacji ekspresji genu *ob* [19].

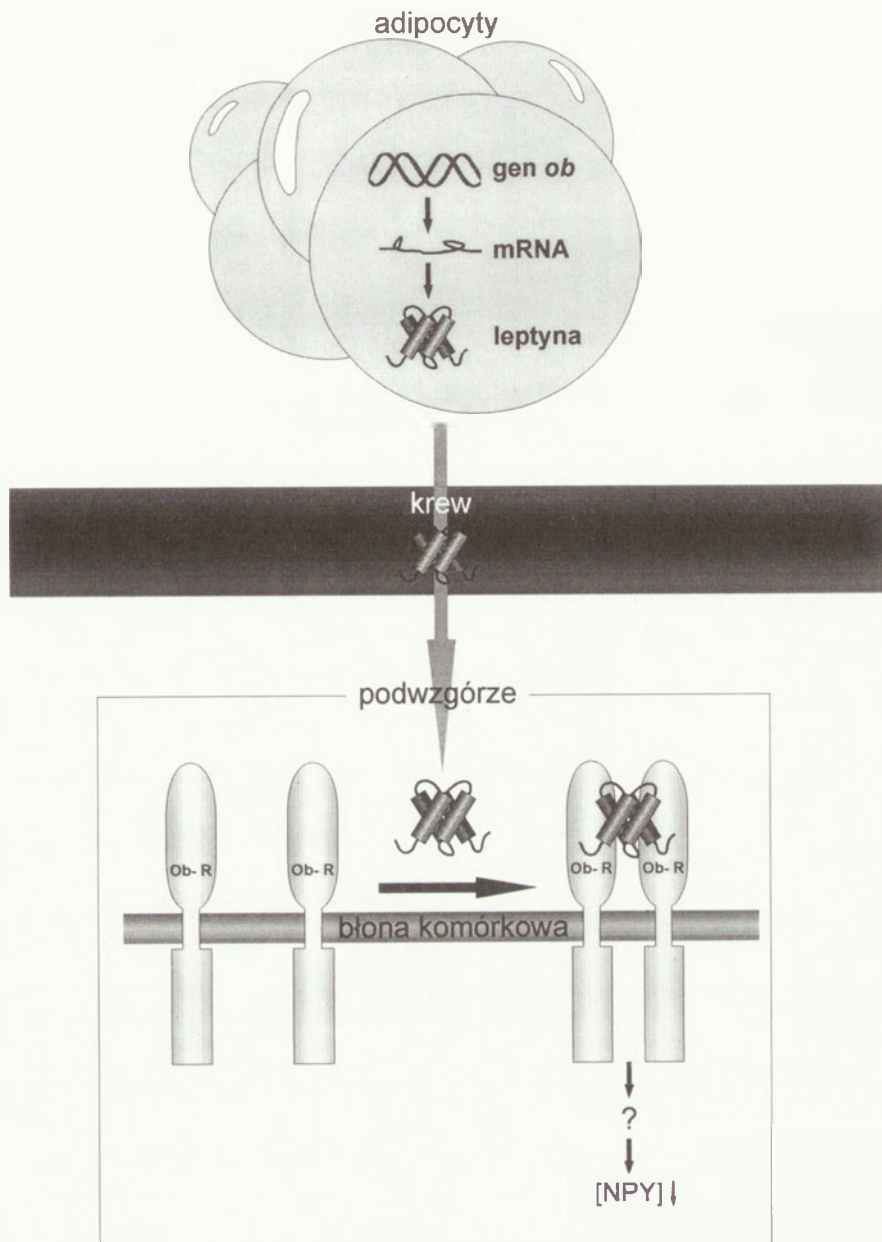
Ekspresja genu *ob* w tkance tłuszczowej jest różna i zależy od jej lokalizacji w organizmie. U szczurów najwyższą ekspresję obserwowano w tkance tłuszczowej najądrzy, nieco niższą w okołonerkowej tkance tłuszczowej i najniższą w tkance podskórnej [20]. Insulina stymuluje ekspresję genu *ob* w tkance tłuszczowej najądrzy i okołonerkowej, nie wywiera natomiast wpływu na ekspresję tego genu w podskórnej tkance tłuszczowej [20]. To zróżnicowanie między poszczególnymi rodzajami tkanki tłuszczowej wynika prawdopodobnie z różnej wielkości adipocytów. Większe adipocyty cechuje wyższa ekspresja genu *ob* i odwrotnie [21]. Wynika z tego, że każda komórka tłuszczowa może indywidualnie przesyłać sygnały o własnym stanie energetycznym (zasobach triacylogliceroli) do centralnego układu nerwowego.

Leptyna (gr. *leptos* — delikatny, cienki, mały) jest białkiem o m.c. około 16 kD i wykazuje wysoki stopień homologii z białkami należącymi do rodziny cytokin [22]. Jest ono wydzielane przez adipocyty do krwi i transportowane do podwzgórza [23]. W podwzgórzu łącząc się z odpowiednim dla niego receptorem (Ob-R), kodowanym przez gen *db* [24, 25] hamuje biosyntezę i uwalnianie neuropeptydu Y (NPY) [23]. Receptor Ob wykazuje wysoki stopień homologii z białkami należącymi do rodziny receptorów cytokin [24], szczególne podobieństwo wykazuje do receptora IL-6 [24]. Punktowa mutacja (G→T) tego genu prowadzi do otyłości u myszy [25]. Wzrost stężenia neuropeptydu Y w podwzgórzu zwiększa spożycie pokarmów, natomiast spadek stężenia prowadzi do efektu przeciwnego [26-28]. W wielu modelach doświadczalnych wykazano związek wysokiego stężenia NPY w podwzgórzu z otyłością [26-28]. Ponadto dokomorowe podanie NPY powoduje, że szczury normalne (nieotyle) w krótkim czasie stają się

otyle [26-28]. Molekularny mechanizm działania NPY nie jest dokładnie znany. Wiadomo, że zwiększa on stężenie insuliny, ACTH i kortykosteronu w surowicy szczurów [29]. Zwiększone stężenie tych hormonów (szczególnie insuliny) może prowadzić do wzrostu aktywności lipazy lipoproteinowej w białej tkance tłuszczowej, a w konsekwencji do nadmiernej akumulacji lipidów.

Ostatnio opisano nowy typ receptora NPY i nazwano go Y5 [30]. Receptor Y5 jest białkiem zbudowanym z 456 aminokwasów, sprzężonym z cyklazą adenylanową, a mRNA tego białka stwierdzono głównie w podwzgórzu [30]. Receptor Y5 jest odpowiedzialny za regulację spożycia pokarmów [30]. W przypadku mutacji genu *ob* (np. u myszy genetycznie otyłych *ob/ob*) dochodzi do syntezy nieprawidłowej leptyny, która prawdopodobnie nie hamuje syntezy neuropeptydu Y, co wywołuje nadmierne łaknienie i otyłość [31]. Mechanizm działania leptyny na podwzgórze przedstawiono na rycinie 1. Produkowana i wydzielana przez adipocyty do krwi leptyna przedostaje się do podwzgórza. Tu powoduje dimeryzację receptora leptyny znajdującego się na powierzchni komórek podwzgórza. Prowadzi to do zahamowania syntezy NPY i prawdopodobnie innych neuropeptydów.

Sklonowanie genów *ob* i *db* oraz określenie właściwości i funkcji biologicznej ich produktów białkowych stwarza nowe możliwości poznania molekularnych podstaw otyłości. Rycina 2 przedstawia współdziałanie leptyny i jej receptora w regulacji spożycia pokarmów. Adipocyty syntetyzują i wydzielają do krwi leptynę, która po przedostaniu się do podwzgórza łączy się ze zlokalizowanym tam receptorem leptyny (Ob-R) hamując syntezę i uwalnianie NPY. Jeśli adipocyty wydzielają niewielkie ilości leptyny, to jej stężenie we krwi i w podwzgórzu spada. Wynikiem tego jest zwiększona produkcja NPY, a w konsekwencji zwiększone spożycie pokarmów. Wzrost stężenia glukozy we krwi (w wyniku spożywania pokarmów), stymuluje uwalnianie insuliny z trzustki, a z kolei wzrost stężenia insuliny we krwi powoduje zwiększoną syntezę i uwalnianie leptyny z tkanki tłuszczowej do krwi. Leptyna przedostając się do podwzgórza hamuje syntezę NPY, co prowadzi do obniżenia apetytu oraz spadku spożycia pokarmu i w konsekwencji do spadku stężenia insuliny — hormonu stymulującego syntezę leptyny. W ten sposób produkty genów *ob* i *db* stanowią uzupełniający się system hormon-receptor (leptyna — Ob-R), przy pomocy którego informacje o zasobach energetycznych ustroju (zawartych głównie w tkance tłuszczowej) są przekazywane do centralnego układu nerwowego. Leptyna i jej receptor stanowią zatem istotne ogniwo w sprzężeniu zwrotnym przekazywania informacji z tkanki tłuszczowej do centralnego układu nerwowego, którego zadaniem jest utrzymanie stałej masy ciała. Jest rzeczą oczywistą, że zaburzenie tego procesu musi prowadzić do otyłości. Redukcja masy ciała w wyniku zwiększonej syntezy



Ryc. 1. Mechanizm działania leptyny. Leptyna powoduje dimeryzację receptora znajdującego się na powierzchni komórek podwzgórza, wywołując zahamowanie syntezy i wydzielania neuropeptydu Y.

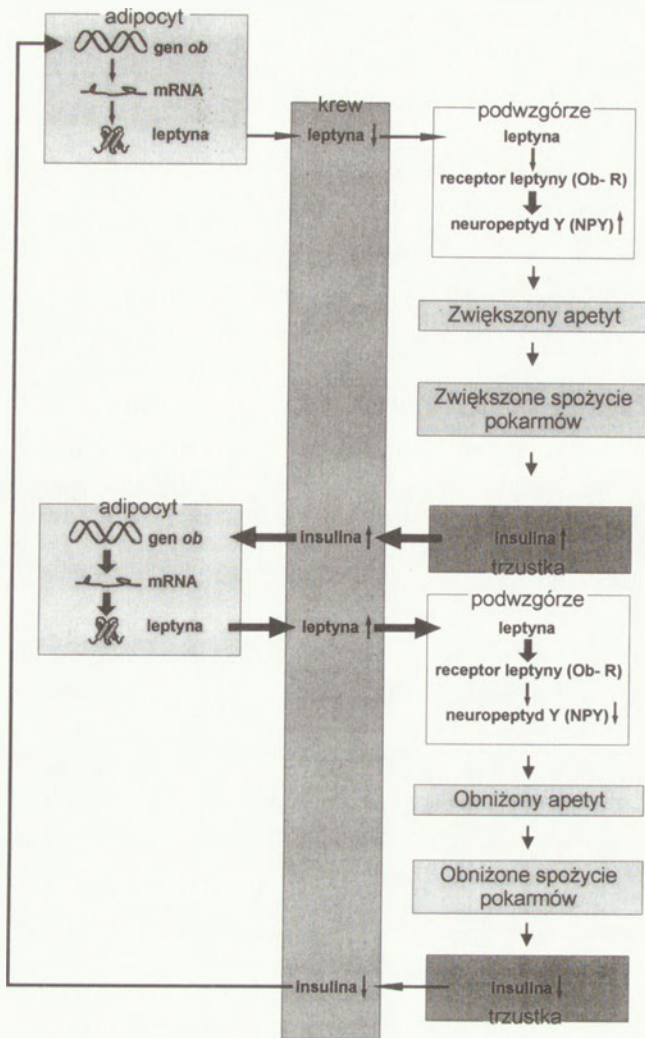
leptyny może być skutkiem zmniejszenia pobierania pokarmów oraz zwiększonego wydatku energetycznego (Ryc. 2 i 4). Z kolei zwiększony wydatek energetyczny jest wynikiem zwiększonej aktywności fizycznej oraz zwiększonej termogenezy w brunatnej tkance tłuszczowej [32].

W wielu ośrodkach naukowych poszukiwano czynników regulujących ekspresję genu otyłości *in vivo*. Stwierdzono zwiększoną ekspresję genu *ob* u zwierząt genetycznie otyłych, np.: myszy *ob/ob* i *db/db* [7, 33-36]. U myszy *ob/ob* otyłość jest prawdopodobnie związana z produkcją nieprawidłowej (krótszej) leptyny. W przypadku myszy *db/db* przyczyną otyłości wydaje się być nieprawidłowa budowa receptora leptyny. Podskórne podanie myszom *ob/ob* leptyny powoduje znaczne obniżenie masy ciała [37]. Badania nad ekspresją genu *ob* u ludzi wykazały u osobników otyłych jego nadekspresję [38-40] oraz znacznie wyższe stężenie leptyny w surowicy [41-46]. Tak więc w przeciwieństwie do myszy *ob/ob* czy *db/db* u ludzi otyłych ilość leptyny jest proporcjonalna do ilości

posiadanej tkanki tłuszczowej. Jedną z przyczyn nadekspresji genu *ob*, a w konsekwencji zwiększonej sekrecji leptyny do krwi u ludzi otyłych, może być powiększenie rozmiarów adipocytów. Ponadto nie stwierdzono różnic w sekwencji mRNA genu *ob* ludzi otyłych i „chudych” [38]. Wydaje się więc mało prawdopodobne, aby przyczyny otyłości u ludzi i myszy *ob/ob* były takie same. Za powstawanie otyłości u ludzi może być odpowiedzialna np. zmniejszona wrażliwość na leptynę, przyspieszona degradacja leptyny (w adipocytach lub we krwi) i/lub nieprawidłowa budowa receptora leptyny w podwzgórze.

II-2. Gen *fat*

Kolejnym opisanym genem, zaliczanym do genów otyłości, jest gen *fat*. Mutacja w tym genie prowadzi do umiarkowanej otyłości i hiperinsulinemii u myszy [47]. Myszy ze zmutowanym genem *fat* prawidłowo reagują na insulinę egzogenną. Sugerowało to, że u tych zwierząt produkowana jest nieaktywna insulina.



Ryc. 2. Współdziałanie leptyny, insuliny i receptora leptyny w regulacji spożycia pokarmów.

Ostatnie badania wskazują, że przyczyną tych zaburzeń może być obniżona aktywność karboksypeptydazy E (zwanej również karboksypeptydazą H), jednego z enzymów katalizujących przemianę proinsuliny w insulinę w komórkach β trzustki [48]. Związek pomiędzy obniżeniem lub brakiem aktywności karboksypeptydazy E a otyłością nie jest znany. Można jedynie przypuszczać, że obniżony poziom aktywnej (dojrzałej) insuliny (wysoki stosunek stężenia proinsuliny do insuliny hiperproinsulinemia) może prowadzić do zmniejszenia syntezy i sekrecji leptyny z adipocytów, a tym samym do spadku jej stężenia we krwi. Skutkiem tego może być nadmierna produkcja NPY, hiperfagia i otyłość (Ryc. 1 i 2).

Opisano także przypadek otyłości u ludzi związany z nieprawidłową przemianą proinsuliny w insulinę, lecz nie wiadomo czy u podstaw tego zaburzenia leży obniżona aktywność karboksypeptydazy E [49].

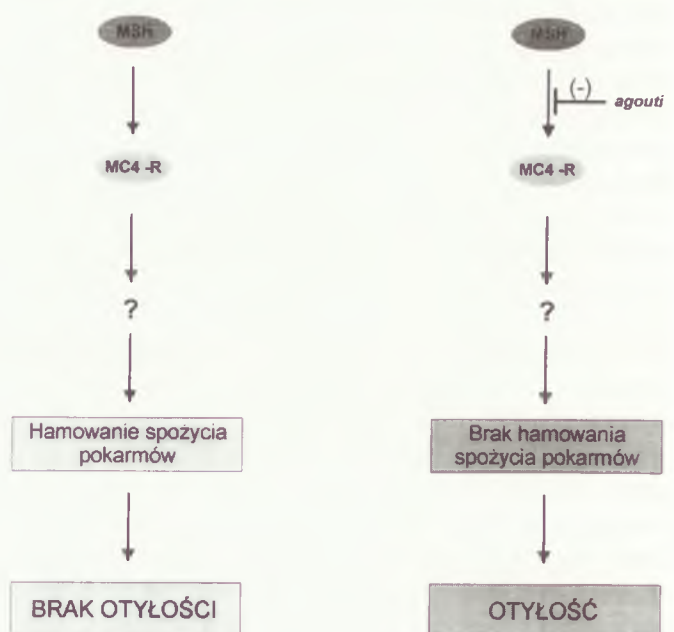
II-3. Gen *tub*

Mutacja w genie *tub* powoduje u myszy umiarkowaną otyłość z jednoczesną utratą słuchu i degeneracją siatkówki [49]. Pomimo sklonowania genu *tub*, funkcja jego produktu białkowego nie została dotych-

czas określona [50, 51]. Wiadomo jedynie, że gen ten koduje powstawanie białka tubby, zbudowanego z 505 aminokwasów i zlokalizowanego w cytosolu [50, 51]. Biorąc pod uwagę główne miejsce powstawania tego białka (podwzgórze) można przypuszczać, że odgrywa ono bliżej nieokreśloną rolę w regulacji równowagi energetycznej ustroju [52].

II-4. Gen *agouti*

Gen *agouti* (A^y) został odkryty i sklonowany w 1992 r. [53]. Ulega on ekspresji wyłącznie w skórze i warunkuje zmianę zabarwienia włosów u myszy. Białko *agouti* wiąże się z receptorem hormonu melanotropowego (MC4-R), hamując w ten sposób wiązanie się z tym receptorem hormonu melanotropowego (MSH). Zmutowany gen A^y ulega ekspresji prawdopodobnie we wszystkich narządach [52]. Mutacja w obrębie tego genu prowadzi do umiarkowanej otyłości i cukrzycy. Zaobserwowano, że mutacja w obrębie genu MC4-R lub brak tego genu u myszy (ang. *knockout mouse*) prowadzi do otyłości podobnej do obserwowanej w przypadku mutacji genu A^y [52, 54, 55]. Stało się to podstawą hipotezy, że produkt genu A^y może powodować otyłość poprzez wiązanie się z receptorem MC-4. W celu weryfikacji tej hipotezy syntetyzowano związki, które wykazywały właściwości antagonistów lub agonistów receptora MC-4 [54]. Podanie zwierzętom agonistów MC4-R obniżało spożycie pokarmów. Równoczesne podanie antagonistów receptora MC-4 całkowicie znosiło ten efekt. Te wyniki sugerowały, że agonisty receptora MC-4 (np. MSH) hamują łaknienie, co może zapobiegać otyłości. Z kolei antagonisty receptora MC-4 indukują łaknienie, a w konsekwencji mogą prowadzić do otyłości. Badania Fan i wsp. [54] wskazują, że białko *agouti* antagonizuje działanie agonistów MC4-R, tzn. działa



Ryc. 3. Rola hormonu melanotropowego (MSH), jego receptora (MC4-R) i białka *agouti* w regulacji spożycia pokarmów.

jak antagoniści MC4-R, a skutkiem jego działania jest również otyłość. Z badań tych wynika, że MSH i MC-4 mogą odgrywać ważną rolę w kontroli spożycia pokarmów (Ryc. 3).

III. Leptyna-kluczowy element w przekazywaniu informacji pomiędzy tkanką tłuszczową a centralnym układem nerwowym

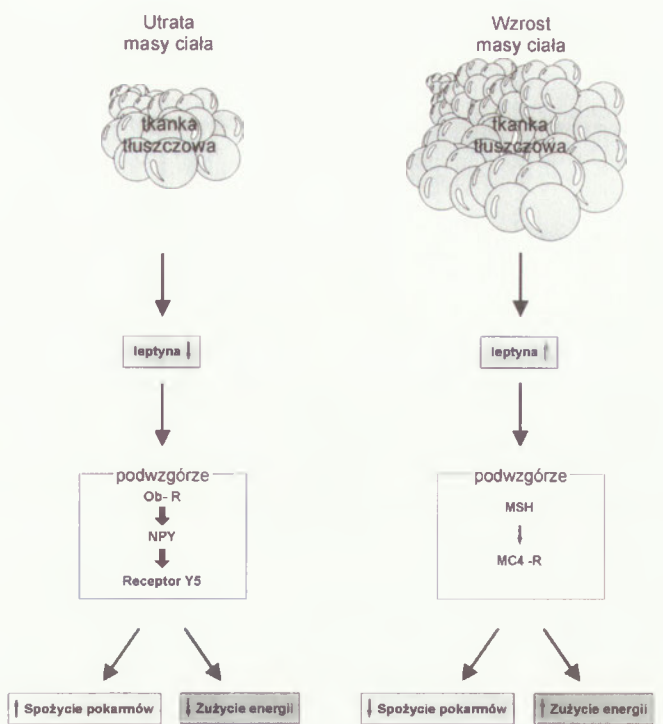
III-1. Rola leptyny, Ob-R, NPY, MSH i MC4-R w regulacji spożycia pokarmów

Początkowo rola leptyny w regulacji masy ciała zwierząt (u ludzi problem ten jest prawdopodobnie znacznie bardziej złożony) wydawała się stosunkowo prosta (Ryc. 1 i 2). W miarę kontynuowania badań obraz ten ze względu na prostotę staje się coraz bardziej skomplikowany. Wskazują na to również wyniki dotyczące roli MC4-R oraz jego agonistów i antagonistów w regulacji kontroli spożycia pokarmów.

Według Friedmana i wsp. [56] MSH i MC4-R stanowią również ważne ogniwo w przekazywaniu sygnałów w odpowiedzi na nadmierne spożywanie pokarmów (otyłość), natomiast w odpowiedzi na głodzenie funkcję tę spełnia NPY i jego receptor (Ryc. 4). Głodzenie prowadzi do utraty masy ciała (masy tkanki tłuszczowej), a w konsekwencji do zmniejszonej produkcji i sekrecji leptyny do krwi. Niskie stężenie leptyny w podwzgórzu powoduje, że tylko niewielka ilość receptora leptyny występuje w formie dimeru (aktywnej), co prowadzi do wzrostu stężenia NPY. Neuropeptyd Y łącząc się z receptorem Y5 powoduje wzrost łaknienia i ograniczenie wydatku energetycznego, umożliwiając odbudowę masy tkanki tłuszczowej. W przypadku braku leptyny lub syntezy jej nieprawidłowej formy zwierzęta nie mogą kontrolować spożycia pokarmu (przypomina to stan ciągłego głodu) i w konsekwencji stają się otyłe (jak np. myszy *ob/ob*). Jeśli myszy te będą traktowane leptyną, spożycie pokarmu spadnie, a następnie ustąpią objawy związane z otyłością. Wysokie stężenie leptyny działając poprzez MSH i MC4-R prowadzi do spadku spożycia pokarmu i zwiększonego wydatku energetycznego (Ryc. 4).

III-2. Wyniki doświadczeń wskazujących na istnienie genów *ob* i *db*

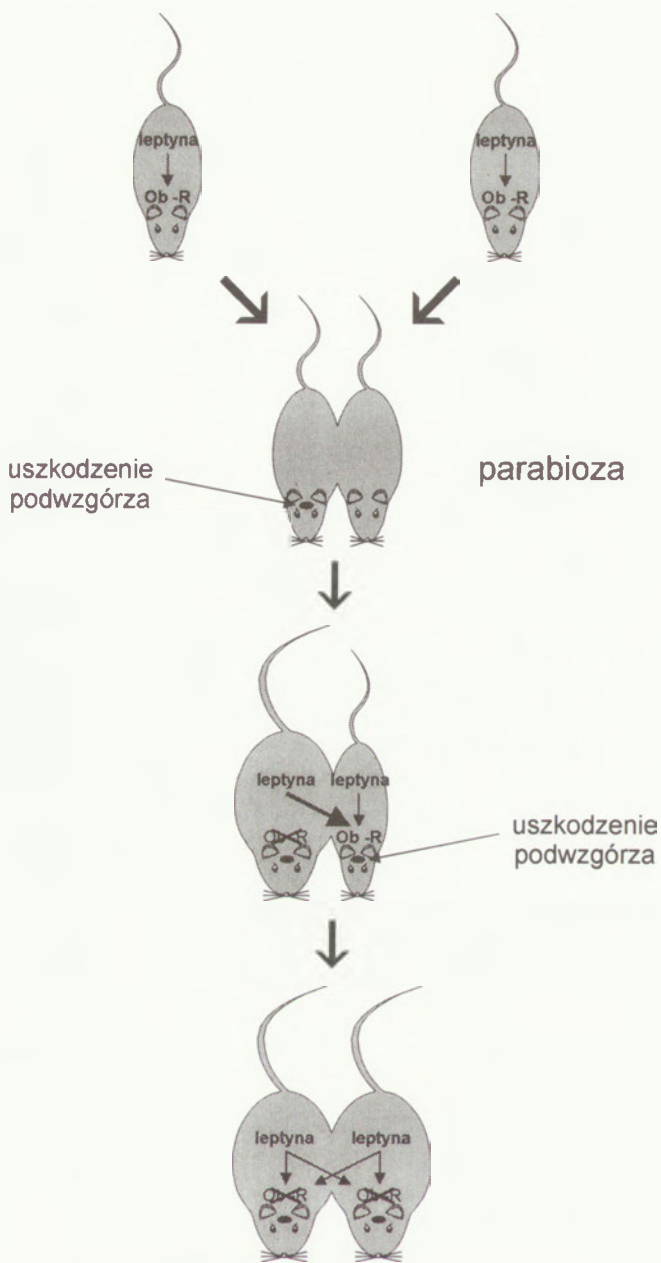
Odkrycie genu *ob* i jego produktu białkowego — leptyny oraz genu *db* i kodowanego przez niego receptora leptyny przyczyniło się do wyjaśnienia wielu zjawisk obserwowanych przez fizjologów i sugerujących, że informacje o masie tkanki tłuszczowej są przekazywane do centralnego układu nerwowego, przypuszczalnie do ośrodka sytości. Nie określono jednak budowy i właściwości substancji, za pomocą której te informacje są przekazywane. Postulowano, że substancje powstające w tkance tłuszczowej pod wpływem spożytych pokarmów uwalniają się do krwi i tą



Ryc. 4. Mechanizmy regulujące spożycie pokarmów i zużycie energii w zależności od masy tkanki tłuszczowej zwierzęcia.

drogą dostają się do centralnego układu nerwowego, gdzie, działając na ośrodek sytości, hamują łaknienie [57]. Substancją tą, jak się dzisiaj wydaje, może być leptyna. Określenie właściwości i funkcji produktów genów *ob* i *db* umożliwi wyjaśnienie wyników doświadczeń, w których chirurgicznie połączono dwa zwierzęta (parabioza) [58]. Po uszkodzeniu podwzgórza u jednego ze zwierząt, stwierdzono u niego dużego stopnia otyłość, natomiast jego partner przestał jeść i stracił na wadze, przy czym zmiana ta spowodowana była utratą tłuszczu i białka. Szczur z uszkodzonym podwzgórzem spożywał nadmierne ilości pokarmu i wydzieliał jednocześnie do krwi leptynę, która działając na podwzgórze partnera powodowała u niego zahamowanie spożycia pokarmu. Zwierzę z uszkodzonym podwzgórzem nie reagowało na leptynę, spożywało nadmierne ilości pokarmu i tyło (Ryc. 5). Uszkodzenie podwzgórza chudemu zwierzęciu powodowało szybki przyrost masy jego ciała [58]. Wyniki tego doświadczenia wskazywały, że do krwi zwierząt wydzielana jest substancja (leptyna), która kontroluje spożycie pokarmu, a decydującą rolę w tej kontroli odgrywa podwzgórze (zlokalizowany w błonach komórkowych tej struktury mózgowej receptor leptyny).

Połączono chirurgicznie myszy otyłe *db/db* z myszami otyłymi *ob/ob* oraz myszy *db/db* i myszy *ob/ob* ze zwierzętami z grupy kontrolnej (Ryc. 6). Parabioza myszy *db/db* z osobnikami z grupy kontrolnej spowodowała zahamowanie spożycia pokarmu przez myszy kontrolne, parabioza myszy *ob/ob* z kontrolnymi spowodowała zahamowanie przyrostu masy ciała u myszy *ob/ob*, natomiast parabioza myszy *db/db* z myszami *ob/ob* spowodowała znaczny spadek masy ciała u myszy *ob/ob*. Wyniki tego doświadczenia sugerowały, że



Ryc. 5. Skutki uszkodzenia podwzgórza zwierząt połączonych chirurgicznie (parabioza). Połączono chirurgicznie parę zwierząt, a następnie jednemu zwierzęciu uszkodzono podwzgórze. Zwierzę z uszkodzonym podwzgórzem staje się otyłe, ponieważ jest niewrażliwe na leptynę z powodu braku receptora, zaś jego partner chudnie (głównie pod wpływem leptyny produkowanej w nadmiarze przez zwierzę z uszkodzonym podwzgórzem). Uszkodzenie podwzgórza chudemu zwierzęciu powoduje również jego tycie spowodowane brakiem wrażliwości na leptynę z powodu braku receptora.

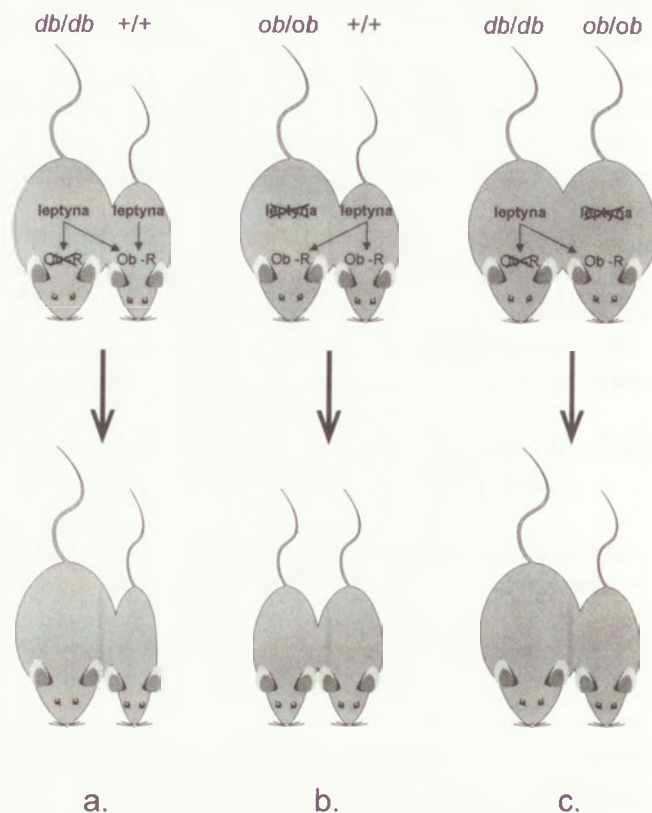
myszki *db/db* produkują duże ilości substancji (dzisiaj możemy stwierdzić, że jest to leptyna) hamującej łaknienie u myszy kontrolnych, same zaś nie są na tę substancję wrażliwe (gdyż nie mają prawidłowego receptora leptyny). Z kolei myszy *ob/ob* nie produkują substancji hamującej łaknienie (leptyny), ale są na nią wrażliwe (posiadają prawidłowo działający receptor). Można więc przypuszczać, że otyłość u zwierząt może być spowodowana zarówno brakiem, jak i syntezą nieprawidłowej substancji sygnałowej (myszy *ob/ob*) oraz brakiem albo nieprawidłową budową receptora

tej substancji (myszy *db/db*).

Parabioza była stosowana i opisywana przez wielu autorów. Harris [59, 60] połączyła chirurgicznie dwa jednomiesięczne szczury, a następnie hodowała je przez kolejne 3-4 miesiące. Otyłość u jednego z partnerów spowodowano nadmiernym karmieniem (podając przy pomocy sondy dożołądkowej podwójne dawki pokarmu). W tym doświadczeniu obserwowano również spadek masy ciała u drugiego z partnerów. Według Harris [59, 60], spadek masy ciała zwierzęcia spowodowany był zahamowaniem biosyntezy kwasów tłuszczowych, co zostało potwierdzone zarówno badaniami *in vivo* jak i *in vitro*. Wyniki tych doświadczeń sugerowały, że nadmierne spożywanie pokarmu indukuje powstawanie substancji hamujących lipogenezę. Według Harris i wsp. [59, 60], substancją tą może być glikoproteina o masie cząsteczkowej około 30 kilodaltonów. W świetle ostatnich badań wydaje się, że substancją tą jest leptyna.

III-3. Leptyna jako lek odchudzający?

Odkrycie genów *ob* i *db* może mieć również znaczenie praktyczne, stwarza bowiem nowe możliwości leczenia otyłości, oparte na podstawach molekularnych. Podawanie leptyny lub syntetycznych agonistów receptora leptyny jak również farmakologicznie stymulowana nadekspresja genu *ob* i stymulacja uwalniania leptyny z adipocytów do krwi mogłoby stanowić istotny element programu terapii odchudzającej. Problem ten komplikuje jednak fakt, że molekularne



Ryc. 6. Skutki parabiozy a) myszy *db/db* z myszami z grupy kontrolnej; b) myszy *ob/ob* z myszami z grupy kontrolnej; c) myszy *db/db* z myszami *ob/ob*.

podstawy otyłości u ludzi i zwierząt są różne.

IV. Tkanka tłuszczowa jako narząd wydzielniczy

Odkrycie, że adipocyty produkują i wydzielają do krwi leptynę, stawia w nowym świetle rolę tkanki tłuszczowej. Tkanka ta, traktowana przez wiele lat jako magazyn energii zapasowej, staje się w świetle badań ostatnich kilku lat tkanką odgrywającą ważną rolę w regulacji metabolizmu całego organizmu. Warto wspomnieć, że oprócz leptyny produkowane i wydzielane przez tkankę tłuszczową są także inne substancje, jak np. adypsyna [61, 62] i TNF α [63]. Szczególną rolę w regulacji masy ciała i zapobieganiu otyłości przypisywano adypsynie. Potwierdzeniem tego miała być obserwacja wskazująca, że stężenie adypsiny w surowicy jest znacznie obniżone u otyłych gryzoni [64, 65]. Późniejsze badania wykazały jednak, że adypsyna ma budowę podobną do czynnika D systemu wiązania dopełniacza [66]. Przypuszcza się więc, że białko to pełni raczej funkcję odpornościową, a nie regulującą masę ciała.

Biorąc pod uwagę obfitość danych, które uzyskano w ostatnich latach prowadząc badania nad genami otyłości można stwierdzić, że nastąpiły „tłuste lata” w dziedzinie badań nad molekularnymi podstawami otyłości.

Podziękowania

Autorzy dziękują Panu Prof. dr hab. Mariuszowi M. Żydowo z Katedry i Zakładu Biochemii AMG za cenne merytoryczne wskazówki w czasie redagowania pracy. Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez KBN 4 PO5D 086 12.

Artykuł otrzymano 14 kwietnia 1997 r.

Zaakceptowano do druku 6 czerwca 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Bray GA (1991) *Nutrition Rev* **49**: 33-45
2. Guillaume M, Bjorntorp P (1996) *Horm Metab Res* **28**: 573-581
3. Brownell KD, Rodin J (1994) *Amer Psychologist* **49**: 781-791
4. Langhans W, Scharer E (1992) *World Rev Nutr Diet* **70**: 1-67
5. Vanderschueren-Lodeweyckx M (1993) *Horm Res* **40**: 23-30
6. Ferrell RE (1993) *Human Biology* **65**: 967-975
7. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) *Nature (Lond)* **372**: 425-432
8. He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M (1995) *J Biol Chem* **270**: 28887-28891
9. Murakami T, Shima K (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 944-952
10. Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shimoto M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Inazawa J, Nakao K (1995) *J Biol Chem* **270**: 27728-27733
11. Saladin R, DeVos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J (1995) *Nature (Lond)* **377**: 527-529
12. Karbowska J, Kochan Z, Świerczyński J (praca w przygotowaniu do druku)
13. Kochan Z, Karbowska J, Świerczyński J (1997) *Metabolism* **46**: 10-17
14. Becker DJ, Ongemba LM, Brichard V, Henquin J-C, Brichard SM (1995) *FEBS-Letters* **371**: 324-328
15. Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BCH, Friedman JM, Ailhaud G, Dani Ch (1996) *J Biol Chem* **271**: 2365-2368
16. Hardie LJ, Rayner DV, Holmes S, Trayhurn P (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 660-665
17. Kieffer T, Heller SR, Habener JF (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 522-527
18. DeVos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B (1995) *J Biol Chem* **270**: 15958-15961
19. Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV (1995) *Biochem J* **311**: 729-733
20. Zheng D, Jones JP, Usala J, Dohm GL (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 434-437
21. Trayhurn P, Rayner DV (1996) *Biochem Soc Trns* **24**: 565-570
22. Campfield LA, Smioth FJ, Burn P (1996) *Horm Metab Res* **28**: 619-632
23. Billington CJ, Levine AS (1996) *Current Biol* **6**: 920-923
24. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) *Cell* **83**: 1263-1271
25. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lekey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996) *Cell* **84**: 491-495
26. Rohner-Jeanrenaud F (1995) *Int J Obesity* **19**: 517-534
27. Stephens TW (1996) *Nature (Lond)* **381**: 377-378
28. Schwartz MW, Seely RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996) *J Clin Invest* **98**: 1101-1106
29. Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B (1996) *Horm Metab Res* **28**: 642-648
30. Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL (1996) *Nature (Lond)* **382**: 168-171
31. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, Mackellar W, Rosteck PR Jr, Schoner B, Smith D, Tinsley FC, Zhang X-Y, Heiman M (1995) *Nature (Lond)* **377**: 530-532
32. Giacobino JP (1996) *Horm Metab Res* **28**: 633-637
33. Maffei M, Fei H, Lee G-H, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6957-6960
34. Frederick RC, Lollmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahl BB, Lowell BB, Flier JS (1995) *J Clin Invest* **96**: 1658-1663
35. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) *Science* **269**: 543-546
36. Campfield LA, Smith FJ, Guises Y, Devos R, Burn P (1995) *Science* **269**: 546-549
37. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) *Science* **269**: 540-543
38. Considine RV, Considine EL, Williams C, Nyce MR, Magosin SA, Bauer TL, Rosato EL, Colberg J, Caro JF (1995) *J Clin Invest* **95**: 2986-2988
39. Hamilton BS, Paglia D, Kwan AYM, Deitel M (1995) *Nature Med* **1**: 953-956
40. Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M (1995) *Nature Med* **1**: 950-953
41. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF

- (1996) *N Engl J Med* **334**: 292-295
42. Hassink SG, Sheslow DV, De Lancey E, Open-
tanova I, Considine RV, Caro JF (1996) *Pediatrics* **98**:
201-203
 43. Hosoda K, Yasuno A, Masuzaki H, Ogawa Y,
Miyawaki T, Hiraoka J, Hanaoka I, Nomura T,
Fuisawa Y, Yoshimasa Y, Nishi S, Yamori Y,
Nakao K (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **221**: 234-239
 44. Malmstrom R, Taskinen M-R, Karonen S-L,
Yki-Jarvinen H (1996) *Diabetologia* **39**: 993-996
 45. McGregor GP, Desaga JF, Ehlenz K, Fisher A,
Heese F, Hegele A, Lammer C, Peiser C, Lang RE
(1995) *Endocrinology* **137**: 1501-1504
 46. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriau-
ciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C,
Caro JF (1996) *J Clin Invest* **97**: 1344-1347
 47. Coleman DL, Eicher EM (1990) *J Hered* **88**: 424-427
 48. Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina
PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen
BJ, Leiter EH (1995) *Nature Genetics* **10**: 134-142
 49. O'Rahilly S, Gray H, Humphreys PJ, Krook A,
Polonsky KS, White A, Gibson S, Taylor K, Carr
C (1995) *N Engl J Med* **333**: 1386-1390
 50. Noben-Trauth K, Naggert JK, North MA, Nis-
hima PM (1996) *Nature (Lond)* **380**: 534-538
 51. Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC,
Wu Y, Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L,
Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Su P,
Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C,
Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J,
Chen H, Glucksmann-Kuis MA, Moore KJ (1996)
Cell **85**: 281-290
 52. Spiegelman BM, Flier JS (1996) *Cell* **87**: 377-389
 53. Bultman S, Michaud E, Woychik R (1992) *Cell* **71**:
1195-1204
 54. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hraby VJ,
Cone RD (1997) *Nature (Lond)* **385**: 165-168
 55. Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD (1986) *Nature*
(Lond) **381**: 415-418
 56. Friedman JM (1997) *Nature (Lond)* **385**: 119-120
 57. Weigle DS (1994) *FASEB J* **8**: 302-310
 58. Martin RJ, White BD, Hulsey MG (1991) *American
Scientist* **79**: 528-541
 59. Harris RBS, Martin RJ (1989) W: Lardy H, Straatman
F (red) Hormones, Thermogenesis and Obesity. Elsevier Scien-
ce Publishing Co. New York: 233-243
 60. Harris RBS (1990) *FASEB J* **4**: 3310-3318
 61. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ,
Flier JS, Hunt CE, Spiegelman BM (1987) *Science*
237: 402-405
 62. Rosen BS, Cook KS, Yaglom J, Groves DL, Vola-
nakis JE, Damm D, White T, Spiegelman BM
(1989) *Science* **244**: 1483-1487
 63. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM
(1993) *Science* **259**: 141-148
 64. Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM
(1987) *Science* **237**: 405-408
 65. Spiegelman BM, Frank M, Green H (1983) *J Biol
Chem* **258**: 10083-10088
 66. White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lo-
well BB, Usher P, Flier JS, Spiegelman BM (1992)
J Biol Chem **267**: 9210-9213

Terminacja transkrypcji bakteryjnej

Transcription termination in bacteria

KRYSTYNA I. WOLSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Terminacja transkrypcji niezależna od białka Rho
- III. Rho-zależna terminacja transkrypcji
 - III-1. Terminatory Rho-zależne
 - III-2. Właściwości białka Rho
 - III-3. Modele terminacyjnego działania białka Rho
- IV. Inne białka terminacyjne: NusA i NusG
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Rho-independent transcription termination
- III. Rho-dependent transcription termination
 - III-1. Rho-dependent terminator sequences
 - III-2. Characterization of Rho protein
 - III-3. Models of Rho action
- IV. Other termination proteins: NusA and NusG
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: *rut* (ang. *Rho utilization site*) — segment RNA wiążący białko Rho; *tsp* (ang. *transcription stop point*) — 3' koniec transkryptu; *pz* — pary zasad; *aa* — aminokwas; *NTP* — rybonukleozydotrifosforan.

I. Wstęp

Transkrypcja DNA to złożony, wieloetapowy pro-

ces, który można podzielić na trzy kolejne fazy: inicjację, elongację i terminację. W bakteriach transkrypcja zachodzi z udziałem jednego enzymu, DNA-zależnej polimerazy RNA, a cały proces kontrolowany jest zarówno przez sygnały genetyczne działające na poziomie DNA lub RNA, jak i przez liczne białka regulacyjne [1-3].

Zaangażowana w proces transkrypcji polimeraza RNA wchodzi w skład bardzo trwałego, trójskładnikowego kompleksu DNA-enzym-RNA, którego okres półtrwania wynosi kilka godzin [4]. Stabilność

* Dr hab., Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Nowy Świat 67, 00-046 Warszawa

kompleksu zapewniająca wydajną transkrypcję długich segmentów DNA implikuje zarazem konieczność istnienia specjalnych sygnałów oraz współdziałania specyficznych czynników umożliwiających terminację transkrypcji i rozpad kompleksu elongacyjnego na części składowe [5]. W tym miejscu należy podkreślić, że niezaburzony proces terminacji transkrypcji w ściśle określonych miejscach jest warunkiem koniecznym skoordynowanej ekspresji materiału genetycznego [6].

Nie istnieją dotychczas jednoznaczne dane eksperymentalne pozwalające określić kolejność odłączania się poszczególnych składników kompleksu transkrypcyjnego [7]. Dane uzyskane przez Arndta i Chamberlina [8] sugerują jedynie, że polimeraza RNA odłącza się od matrycy dopiero po oddysocjowaniu transkryptu.

Spotykane w genomie bakterii specyficzne sekwencje umożliwiające rozpad kompleksów transkrypcyjnych i stanowiące barierę dla procesu elongacji — terminatory transkrypcji — można podzielić na dwie klasy. Pierwsza klasa terminatorów, zwanych terminatorami właściwymi (ang. *intrinsic terminators*) pełni swoją funkcję niezależnie od działania jakichkolwiek czynników terminacyjnych, w szczególności terminacyjnego białka Rho [9]. Funkcjonowanie drugiej klasy terminatorów całkowicie zależy od aktywności białka Rho i dlatego są one definiowane jako terminatory Rho-zależne [10, 11].

Terminatory transkrypcji określają miejsca, w których szybkość uwalniania transkryptu z trójskładnikowego kompleksu przewyższa szybkość dodawania następnego nukleotydu do rosnącego łańcucha RNA [12]. Czynniki wpływające na szybkość elongacji np. stężenie substratu lub zmiany mutacyjne polimerazy RNA, znajdują odbicie w wydajności funkcjonowania terminatorów [13].

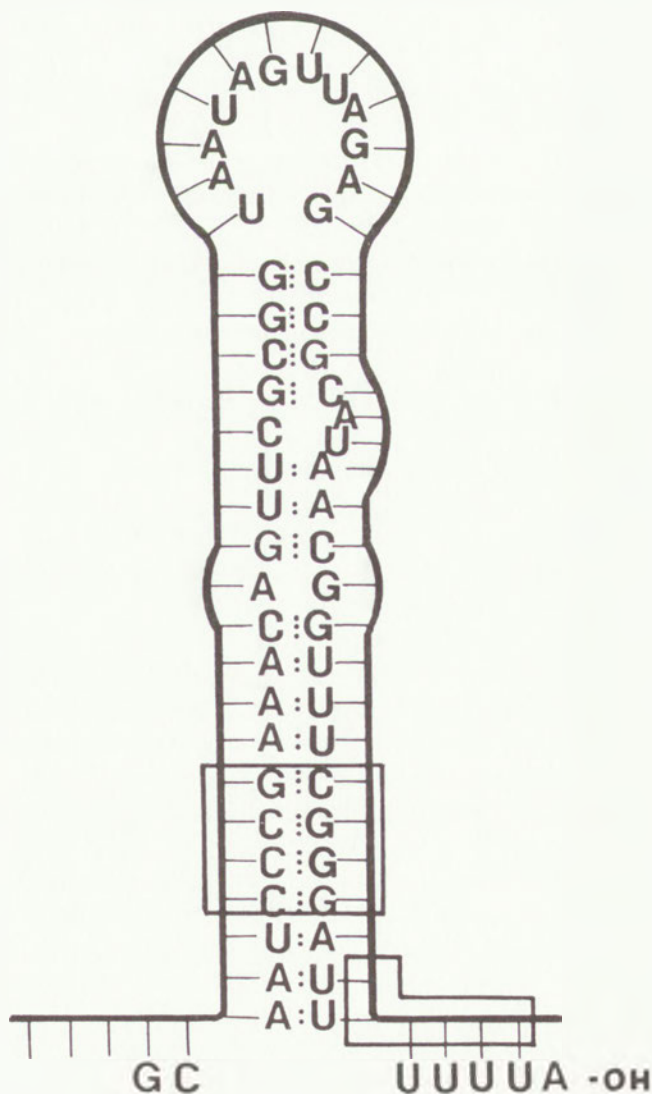
Struktura terminatorów właściwych i mechanizm terminacji Rho-niezależnej transkrypcji, struktura Rho-zależnych terminatorów, budowa białka Rho oraz hipotetyczne modele jego terminacyjnej aktywności zostaną przedstawione w kolejnych częściach artykułu. Czytelnik znajdzie też dodatkowe informacje dotyczące działania dwóch innych białek terminacyjnych: NusA i NusG.

II. Terminacja transkrypcji niezależna od białka Rho

Wszystkie dotychczas zidentyfikowane terminatory właściwe charakteryzują się ściśle określoną strukturą [9, 14-17]. Dwie cechy tej struktury zasługują na podkreślenie: 1) sekwencja palindromowa bogata w pary GC, obejmująca około 20 pz oraz 2) następujący po niej ciąg reszt dA w nici kodującej. Taka budowa terminatora determinuje strukturę końca 3' transkryptu RNA, który ma charakterystyczną drugorzędową formę typu „pętla i trzonek”. Ta zazwyczaj stabilna struktura poprzedza ciąg reszt U. Schemat

budowy terminatora na poziomie transkryptu ilustruje rycina 1.

Obie wyżej wymienione cechy budowy terminatorów są niezwykle istotne dla wydajnej terminacji transkrypcji [4]. Zmiany prowadzące do destabilizacji struktury drugorzędowej [18-21] lub dające ten sam efekt przyłączenie oligonukleotydów DNA komplementarnych do wchodzącego w skład trzonka odcinka 5' RNA [22], znacznie obniża wydajność terminacji. Według powszechnie przyjętego poglądu, rola drugorzędowej struktury typu „pętla i trzonek” polega na zwolnieniu elongacji transkrypcji związanym z wydłużeniem pauzowania polimerazy RNA, co z kolei pozwala na zajście dalszych zmian prowadzących w rezultacie do rozpadu kompleksu transkrypcyjnego [4]. Jak wykazały dane uzyskane przez Arndta i Chamberlina [23], zmiany te polegają głównie na osłabieniu interakcji między rdzeniem polimerazy RNA a świeżo powstałym transkrypcyjnym w miejscu jego związania przez enzym. Dokładna analiza mutacyjna terminatora *tR2* bakteriofaga λ wykazuje, że nie tylko możliwość utworzenia stabilnej struktury drugorzędowej ale także specyficzna sekwencja wchodzącego w jej



Ryc. 1. Struktura terminatora właściwego. Sekwencje ważne funkcjonalnie ujęto w ramki.

skład RNA może mieć znaczenie dla terminacji transkrypcji [18].

Mutacyjne zmiany w ciągu reszt adeninowych znajdują również odbicie w wydajności terminacji [19]. Ciąg reszt dA w nici kodującej zhybrydowany z ciągiem reszt U stanowiących koniec 3' transkryptu tworzy strukturę mało stabilną [24]. Przyczyną niestabilności jest deformacja podwójnej helisy typu A charakterystycznej dla hybrydów DNA-RNA. Obniżona stabilność hybrydu prowadzi do oddysocjowania RNA z kompleksu transkrypcyjnego. Ostatnio wykazano, że reszty dA uczestniczą, a nawet mają kluczowe znaczenie w blokadzie procesu elongacji, zatrzymując przesuwanie się polimerazy RNA po matrycy [25].

Istnieje wiele dowodów eksperymentalnych wskazujących na udział w terminacji także sekwencji poprzedzających i sekwencji następujących po opisanej powyżej strukturze terminatora [26-28]. Sekwencje poprzedzające terminator wpływają prawdopodobnie na zmiany konformacyjne enzymu, utrwalając jego kontakt z transkrypcyjnym [2, 28-30]. Możliwość wpływu na transkrypcję sekwencji następujących po terminatorze, nie ulegających transkrypcji ale mających kontakt z enzymem, została zasugerowana przez wyniki badań Lee i wsp. [31]. Badacze ci przeprowadzili analizę wielu nie ulegających transkrypcji sekwencji DNA następujących po naturalnych miejscach pauzowania polimerazy RNA i wykazali, że mają one wpływ na czas półtrwania pauzującego kompleksu transkrypcyjnego. Sekwencje te obejmują co najmniej 14 nukleotydów za miejscem pauzowania, co odpowiada granicy oddziaływań DNA z polimerazą RNA nie obejmujących centrum katalitycznego enzymu [31a].

III. Rho-zależna terminacja transkrypcji

III-1. Terminatory Rho-zależne

Rho-zależne terminatory transkrypcji obejmują odcinki długości 100-200 pz i składają się z dwóch wyodrębnionych części [2, 4, 10, 32-38].

Część 5' terminatora stanowi region *rut*, którego minimalna długość wynosi 85 pz [39, 40]. Transkrypt sekwencji *rut* jest miejscem początkowego związania białka Rho [41-44]. Region *rut* nie charakteryzuje się żadnymi ścisłymi wymaganiami dotyczącymi struktury bądź sekwencji. Funkcjonalność regionu uzależniona jest jedynie od spełnienia dwóch, dość liberalnych warunków, którymi są: 1) względnie duża liczba reszt cytydynowych w połączeniu z małą liczbą reszt guanozynowych oraz 2) jednoniciowość RNA (brak struktur drugorzędowych) [45-47]. Badania mutacyjne wykazały, że minimalna liczba reszt cytydynowych w tym regionie musi wynosić jedynie 5-6, a ich pozycja może być dowolna [48-49].

Sekwencja części 3' Rho-zależnego terminatora obejmuje około 100 pz. Kinetyczne badania wykazały,

że w tym regionie znajdują się naturalne miejsca warunkujące przerwy elongacyjne nawet w nieobecności białka Rho [50-51].

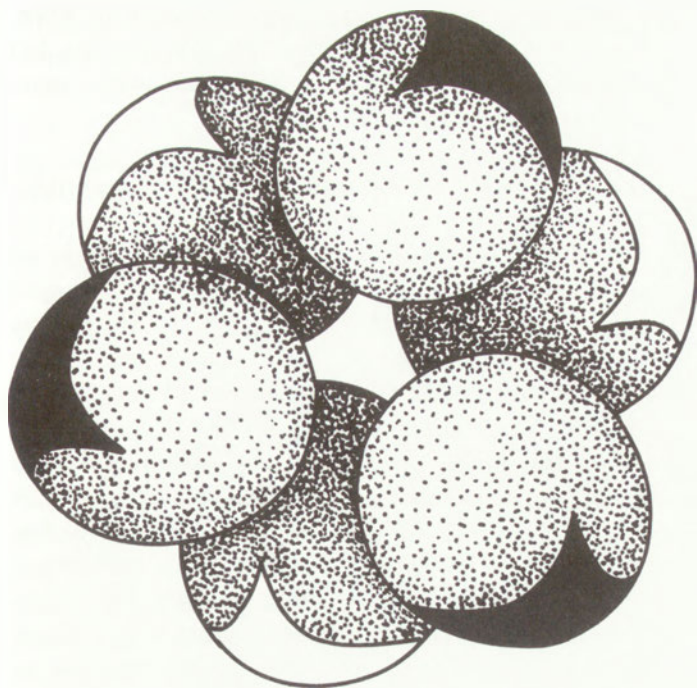
Szybkość elongacji transkrypcji mierzona szybkością dodawania nukleotydów do rosnącego łańcucha RNA waha się znacznie, zależnie od pozycji matrycy [16, 33, 51]. Polimeraza RNA pauzuje podczas transkrypcji sekwencji, w których można wyróżnić aż pięć cech charakterystycznych. Najważniejszą z nich jest zdolność do tworzenia krótkiej, drugorzędowej struktury typu „szpilki do włosów”. Koniec 3' tej drugorzędowej struktury wyprzedza koniec 3' RNA w zatrzymanym trójskładnikowym kompleksie transkrypcyjnym o 10-11 nukleotydów [4]. Z reguły nie wszystkie cząsteczki polimerazy RNA respektują przerwy transkrypcyjne, a czas pauzowania polimerazy RNA jest różny [16]. Przyjmuje się, że funkcjonalna rola pauzowania, przynajmniej podczas transkrypcji mRNA, polega na skoordynowaniu transkrypcji i translacji [4].

W Rho-zależnych terminatorach białko Rho osiąga kompleks transkrypcyjny w umiejscowionych za sekwencją *rut* miejscach determinujących pauzowanie polimerazy RNA i powoduje oddysocjowanie transkryptu. Miejsce terminacji transkrypcji w Rho-zależnym terminatorze nie jest stałe i może być położone w odległości do kilkudziesięciu pz, co jest przyczyną obserwowanej heterogenności końca 3' transkryptów [53-55].

Brak ściśle określonej sekwencji sprawia, że Rho-zależne terminatory występują bardzo często w DNA bakteryjnym i fagowym nie tylko na końcach genów, lecz również w ich obrębie lub w odcinkach liderowych poprzedzających geny strukturalne [36, 56]. Funkcjonowanie terminatorów wymaga nieobecności rybosomów pokrywających RNA i uniemożliwiających zwiążanie z nimi białka Rho a więc nie może zachodzić gdy transkrypt ulega translacji [57]. Uzależnienie funkcjonowania Rho-zależnych terminatorów od translacji jest szczególnie ważnym czynnikiem regulacyjnym w przypadku lokalizacji terminatora w sekwencjach kodujących białko.

III-2. Właściwości białka Rho

Aktywną formą białka Rho, produktu genu *rho* wyizolowanego i zsekwencjonowanego po raz pierwszy przez Pinkham i Platta w 1983 r. [58], jest heksamer [59-60]. Homologi Rho wyodrębnione z różnych niespokrewnionych bakterii są silnie konserwowane, identyczność sekwencji aminokwasowej wynosi minimum 50% [61-62]. Tylko nieliczne bakterie, w tym *Streptomyces* sp., *Mycobacterium* sp. i *Micrococcus luteus*, które mają wysoką zawartość par GC i których RNA charakteryzuje się bardziej rozbudowaną strukturą drugorzędową, kodują nieco odmienny i dłuższy, z powodu obecności insertów, polipeptyd Rho [63].



Ryc. 2. Schemat struktury heksameru Rho. W trzech nierównocennych dimerach zaznaczono trzy miejsca silnie wiążące RNA (czarne) i trzy miejsca słabo wiążące RNA (białe) leżące po jednej stronie płaskiego pierścienia.

Każdy, ze złożonych z 419 aa monomerów białka Rho ma kształt kuli o średnicy 4.2 nm. Sześć kulistych monomerów tworzy płaski pierścień (Ryc. 2) [64-68]. Rho zawiera domeny wiążące RNA i ATP [69-76]. Porównanie sekwencji aminokwasowej Rho i innych białek ujawniło obecność motywu charakterystycznego dla ATPazy [73] i motywu podobnego do sekwencji RNP1 eukariotycznych białek wiążących RNA [77]. Umieszczenie tych motywów w cząsteczce białka pokazano na rycinie 3.

Domena wiążąca RNA znajduje się we fragmencie złożonym z 116 N-końcowych aa [78]. W wiązaniu RNA kluczową rolę pełni sekwencja DGFGFLR rozciągająca się między resztami 60 i 66 [62, 79]. Sześć miejsc wiązania RNA w heksamerze zlokalizowanych jest w szczelinie obejmującej wszystkie monomeryczne podjednostki [80]. Tylko trzy, ułożone naprzemiennie miejsca zdolne są wiązać silnie RNA, trzy pozostałe mają dziesięciokrotnie obniżoną siłę wiązania. Związanie RNA z jakimkolwiek z monomerów stabilizuje konformację zdolną do silnego wiązania z jednoczesną

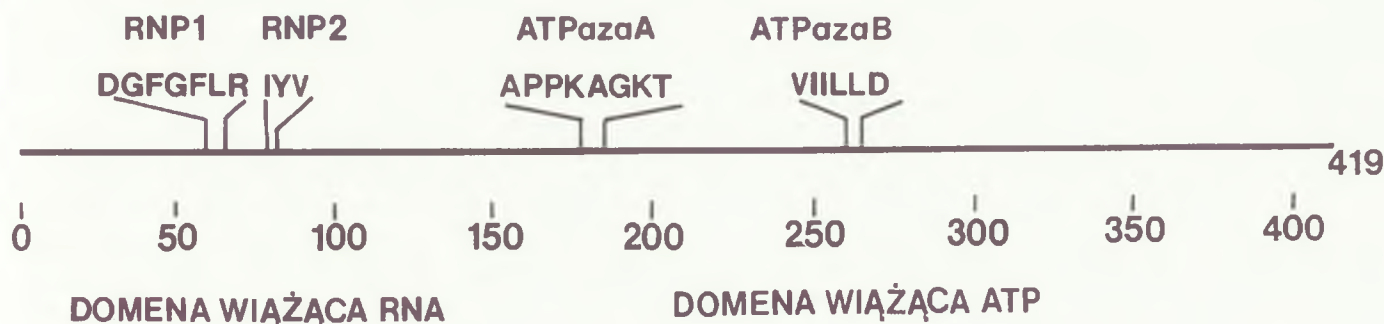
stabilizacją konformacji umożliwiającej słabe wiązanie RNA w podjednostce sąsiedniej [81].

Białko Rho ma aktywność enzymatyczną ATPazy [82-89]. Domena odpowiedzialna za wiązanie i hydrolizę ATP umiejscowiona jest w środkowej części białka [70]. Opierając się na podobieństwie sekwencji tej domeny z sekwencjami ATPazy o znanej strukturze krystalicznej, M i r a i w s p. przedstawili model trzeciorzędowej struktury środkowego odcinka Rho [90]. Wiązanie ATP zachodzi nawet w nieobecności RNA. Heksamer Rho może związać nawet 3 cząsteczki ATP w miejscach mających silne powinowactwo do nukleotydu i 3 cząsteczki w miejscach mających słabe powinowactwo [92-93]. Nie wiadomo, czy miejsca silnie wiążące RNA i ATP znajdują się w tych samych monomerach [4]. Dodanie RNA do kompleksu Rho-ATP stymuluje aktywność ATPazy [93, 94], która jest niezbędna do terminacji i odłączenia RNA od kompleksu transkrypcyjnego [95-97].

Miejsca silnie wiążące RNA zdolne są również do wiązania DNA, jego związanie nie indukuje jednak hydrolizy ATP [78]. Opierając się na badaniach dotyczących aktywności ATPazy przez mieszaniny RNA i DNA, R i c h a r d s o n zaproponował istnienie dodatkowego miejsca wiążącego specyficznie RNA w reakcji zależnej od uprzedniego związania i hydrolizy ATP [87]. Właściwości mutanta *rho1*, którego defekt w oddziaływaniach z RNA uwidacznia się jedynie w obecności ATP potwierdzają sugestie R i c h a r d s o n a [98].

Rho posiada również aktywność helikazy. Wydaje się, że ta aktywność, manifestująca się zdolnością do rozwijania dupleksów DNA-RNA istniejących na końcu 3' świeżo powstałego transkryptu [87], jak również dupleksów RNA-RNA [99, 100], jest istotna dla terminacji transkrypcji. Helikaza Rho jest unikalna i nie wykazuje pokrewieństwa sekwencji z innymi helikazami RNA zawierającymi charakterystyczne motywy DEAD lub DEAH [76].

Terminacyjna aktywność białka Rho hamowana jest przez białko *Psu* [10]. Białko *Psu*, kodowane przez satelitarnego faga P4 hamuje Rho-zależną terminację w wielu terminatorach położonych zarówno w genomie faga P2, który jest fagiem helperem dla P4, jak i na chromosomie i plazmidach *E. coli* [102]. Brak zlokalizowanego działania wskazuje, że *Psu* jest bezpośred-



Ryc. 3. Diagram sekwencji polipeptydu Rho. Zaznaczono domeny wiążące RNA i ATP oraz motywy RNP1, ATPazaA i ATPazaB. Objaśnienia w tekście.

nim inhibitorem Rho, jakkolwiek molekularny mechanizm inhibicji nie jest poznany.

III-3. Modele terminacyjnego działania białka Rho

Do niedawna istniały trzy modele tłumaczące sposób w jaki białko Rho wiążące się początkowo w miejscu *rut* działa w odległym regionie *tsp*. Modele te zostały schematycznie przedstawione na Ryc. 4. Pierwszy postuluje zapętlenie odcinka RNA przedzielającego miejsca *rut* i *tsp*. Model ten został obalony przez Steinmetza i wsp. [103], którzy wykazali, że wprowadzenie między *rut* a *tsp* sekwencji hamujących przesuwanie się Rho po RNA hamuje funkcję terminacyjną białka. Drugi model zakłada jednokierunkowe przesuwanie się Rho po RNA wykorzystujące energię pochodzącą z hydrolizy ATP i jednocześnie implikuje odłączenie białka z *rut* i następnego jego związanie z sekwencjami 3' transkryptu. Ta hipoteza, obecnie mniej faworyzowana niż kilka lat temu, została zaproponowana przez grupę von Hippela [104]. W dużym skrócie, badacze ci zakładają, że przyczyną ruchu Rho w kierunku końca 3' RNA jest indukowana przez hydrolizę ATP zmiana konformacji miejsc silnie- i słabo wiążących RNA w heksamerze białka [105-107]. Trzeci model, pokrewny drugiemu, tłumaczy dotarcie przez białko Rho do sekwencji *tsp* metodą przesuwania się po RNA, lecz z jednoczesnym utrzymaniem kontaktu z sekwencją *rut*. Kontakt z sekwencją *rut* jest ścisły i biorą w nim udział miejsca Rho silnie wiążące RNA, natomiast oddziaływania z końcem 3' transkryptu są słabsze, zależą od hydrolizy ATP i biorą w nich udział miejsca Rho słabo wiążące RNA. Kontakt z 3'-końcowym odcinkiem transkryptu wyzwala aktywność helikazową Rho. Połączenie Rho z miejscami silnie wiążącymi gwarantuje aktywację ATPazy, natomiast miejsca słabo wiążące umożliwiają odłączenie i ponowne przyłączenie się białka do transkryptu. Model ten zaproponowany przez Platta [10] i mający obecnie najwięcej zwolenników znalazł potwierdzenie w wynikach eksperymentów Steinmetza i Platta [100], którzy badali wiązanie na

filtrach trawionego RNAzą H kompleksu Rho-RNA. Model Platta posiada jeden słaby punkt, którym jest brak próby wytłumaczenia jednokierunkowości przesuwania się Rho po RNA.

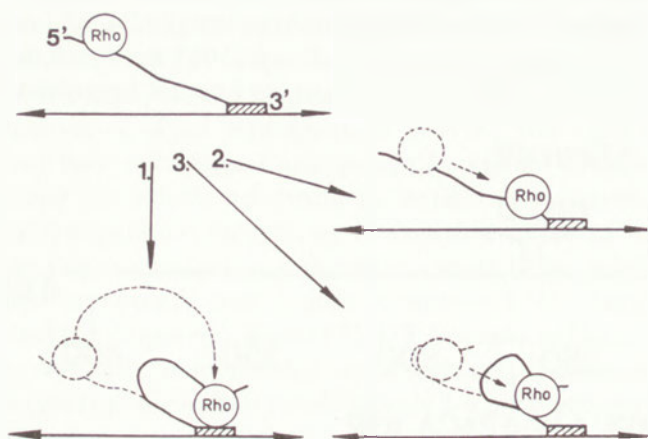
IV. Inne białka terminacyjne: NusA i NusG

Białko NusA, produkt genu *nusA* *E. coli* wiąże się z rdzeniem polimerazy RNA [108] i zwalnia szybkość elongacji transkrypcji na skutek wydłużenia przerw transkrypcyjnych [50, 109-113]. Wydaje się, że właśnie ta cecha białka NusA wpływa na zwiększoną wydajność transkrypcji obserwowaną w kilku terminatorach właściwych [109, 114-116]. Efekt białka NusA na Rho-zależną terminację jest przeciwny. NusA zdolne jest do supresji Rho-zależnych terminatorów, mimo że uczestniczy w wiązaniu Rho z polimerazą RNA [47, 117]. Ten różnorodny, zależny od rodzaju terminatora i od aktywności białka Rho, wpływ NusA na terminację sprawia, że białko to uważane jest za modulator transkrypcji, a nie jedynie za czynnik terminacyjny.

Drugie białko *E. coli*, NusG, jest ważnym kofaktorem Rho-zależnej terminacji [118]. Zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu białka w wyniku jego ekspresji z plazmidu występującego w dużej liczbie kopii prowadzi do supresji niektórych mutantów *rho* [119]. Funkcja terminacyjna NusG zależy od terminatora, od wewnątrzkomórkowego, ilościowego stosunku białek Rho i NusG i od szybkości elongacji transkrypcji; wraz ze wzrostem tej szybkości zwiększa się uzależnienie sprawnego działania Rho od wspomagającej funkcji kofaktora NusG [120-122]. Białko NusG zdolne jest do wiązania zarówno Rho jak i rdzenia polimerazy RNA [122, 123]. Nehrke i Platt [124] wykazali istnienie trójskładnikowego kompleksu polimeraza RNA-NusG-Rho w terminatorze *trp'*. Molekularne szczegóły działania NusG nie są wyjaśnione. Być może, NusG zmienia wzajemne oddziaływania polimerazy RNA z RNA (lub DNA) wspomagając Rho-zależne odłączanie się transkryptu [2]. Według eleganckiej hipotezy przedstawionej przez Richardsona i Greenblatta [4], białko NusG umożliwia luźne związanie Rho z kompleksem transkrypcyjnym już na początku fazy elongacyjnej, co z kolei ułatwia odnalezienie i specyficzne związanie się Rho z sekwencją *rut*.

V. Uwagi końcowe

Terminacja transkrypcji jest skomplikowanym procesem uzależnionym od istnienia sygnałów strukturalnych działających na poziomie świeżo powstałego transkryptu i od aktywności białek terminacyjnych. Białka te mogą bezpośrednio oddziaływać z polimerazą RNA. Przykładem jest omówione dokładnie białko Rho i białko Nun bakteriofaga HK022 *E. coli* [125]. Mogą też, jak białko TRAP *Bacillus subtilis*,



Ryc. 4. Modele terminacyjnego działania białka Rho wg Steinmetza i wsp. (1990). Wytłumaczenie w tekście.

wpływać na możliwość tworzenia i na stabilność terminatorów [126].

Bardzo wiele czynników, z których najbardziej znaczącą grupę stanowią tzw. białka antyterminacyjne, negatywnie reguluje terminację, uniemożliwiając utworzenie struktur terminatorów (białko BglG *E. coli* [127, 128] lub hamując działania białek terminacyjnych (wspomniane uprzednio białko Psu faga P4).

Omówienie antyterminacji transkrypcji i licznych sposobów jej regulacji przekracza zakres tego opracowania. Warto jednak wspomnieć o antyterminacyjnej roli wymienionych wyżej białek terminacyjnych, NusA i NusG. Białka te pełnią istotną rolę w antyterminacji transkrypcji bakteriofaga λ i wraz z białkiem fagowym N i dwoma innymi białkami *E. coli*, NusB i NusE, modyfikują polimerazę RNA do tzw. formy elongacyjnej, która nie reaguje na sygnały terminacyjne [119, 123, 129-134]. W tym konkretnym przypadku, przyczyną podwójnej i przeciwstawnej funkcji biologicznej NusA i NusG jest istnienie dwóch różnych kompleksów, w skład których te białka mogą wchodzić. Współdziałanie z Rho prowadzi do terminacji, współdziałanie z N (antyterminacyjne białko fagowe) umożliwia wydajną antyterminację transkrypcji.

Artykuł otrzymano 25 lutego 1997 r.

Zaakceptowano do druku 6 maja 1997 r.

Piśmiennictwo

- Adhya S, Gottesman M (1978) *Annu Rev Biochem* **47**: 967-996
- Das A (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 893-930
- Record MT Jr, Reznikoff WS, Craig MI, McQuade K I, Schlax PJ (1996) W: Neidhardt NC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (red) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, Am Soc Microbiol, Washington DC, str 792-810
- Richardson JP, Greenblatt J (1996) W: Neidhardt NC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (red) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, Am Soc Microbiol, Washington DC, str 822-848
- Wilson K S, von Hippel PH (1994) *J Mol Biol* **244**: 36-51
- Richardson JP (1993) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**: 1-30
- Andrews C, Richardson JP (1985) *J Biol Chem* **260**: 5826-5831
- Arndt KM, Chamberlin MJ (1988) *J Mol Biol* **202**: 271-285
- Rosenberg M, Court D (1979) *Annu Rev Genet* **13**: 319-353
- Platt T (1994) *Mol Microbiol* **11**: 983-990
- Wolska KI (1994) *Acta Microbiol Polon* **43**: 9-19
- von Hippel PH, Yager TD (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2307-2311
- McDowell JC, Roberts JW, Jin DJ, Gross C (1994) *Science* **266**: 822-825
- Brendel V, Hamm GH, Trifonov EN (1986) *J Biomol Struct Dyn* **3**: 705-723
- Carafa Y, Brody DE, Themes C (1990) *J Mol Biol* **216**: 835-838
- Kassavetis GA, Chamberlin MJ (1981) *J Biol Chem* **256**: 2777-2786
- Yager TD, von Hippel PH (1987) W: Neidhardt FC, Ingraham JC, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (red) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Am Soc Microbiol, Washington DC, str 1241-1275
- Cheng S-W, Lynch EC, Leason KR, Court DL, Shapiro BA, Friedman DI (1991) *Science* **254**: 1205-1207
- Lynn SP, Kasper LM, Gardner JF (1988) *J Biol Chem* **263**: 472-479
- Ryan T, Chamberlin MJ (1983) *J Biol Chem* **258**: 4690-4693
- Yang MT, Gardner JF (1989) *J Biol Chem* **264**: 2634-2639
- Fisher RF, Yanofsky C (1983) *J Biol Chem* **258**: 9208-9212
- Arndt K, Chamberlin MJ (1990) *J Mol Biol* **211**: 79-108
- Martin JH, Tinco IJ (1980) *Nucl Acids Res* **8**: 2295-2299
- Nudler E, Kashelev M, Nikiforov V, Goldfarb A (1995) *Cell* **81**: 351-358
- Reynolds R, Bermudez-Cruz RM, Chamberlin MJ (1992) *J Mol Biol* **224**: 31-51
- Reynolds R, Chamberlin MJ (1992) *J Mol Biol* **224**: 53-63
- Telesnitsky A, Chamberlin MJ (1989) *Biochemistry* **28**: 5210-5218
- Goliger JA, Yang XJ, Guo HC, Roberts JW (1989) *J Mol Biol* **205**: 331-341
- Telesnitsky AP, Chamberlin MJ (1989) *J Mol Biol* **205**: 315-330
- Lee DN, Phung L, Stewart J, Landick R (1990) *J Biol Chem* **265**: 15145-15153
- Landick R, Yanofsky C (1984) *J Biol Chem* **259**: 11550-11555
- Galloway JL, Platt T (1988) *J Biol Chem* **263**: 1761-1767
- Lau L-F, Roberts JW, Wu R (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6171-6175
- Lau LF, Roberts JW, Wu R, Georges F, Narang SA (1984) *Nucl Acids Res* **12**: 1287-1299
- Madden KA, Landy A (1989) *Gene* **76**: 271-280
- Richardson JP (1990) *Biochim Biophys Acta* **1048**: 127-138
- Richardson LV, Richardson JP (1996) *J Biol Chem* **271**: 21597-21603
- Zalatan F, Galloway-Salvo J, Platt T (1993) *J Biol Chem* **268**: 17051-17056
- Hart CM, Roberts JW (1994) *J Mol Biol* **237**: 255-263
- Morgan W-D, Bear DG, von Hippel PH (1984) *J Biol Chem* **259**: 8664-8671
- Chen C-YA, Richardson JP (1987) *J Biol Chem* **262**: 11292-11299
- Faus I, Richardson JP (1990) *J Mol Biol* **212**: 53-66
- Gallupi GR, Richardson JP (1980) *J Mol Biol* **138**: 513-539
- Richardson JP (1970) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **35**: 127-133
- Alifano P, Rivellini F, Limauro D, Bruni CB, Carlomagno S (1991) *Cell* **64**: 553-563
- Morgan WD, Bear DG, Lichman BL, von Hippel PH (1985) *Nucl Acids Res* **13**: 3739-3754
- Lau LF, Roberts JW (1985) *J Biol Chem* **260**: 574-584
- Hart CM, Roberts JW (1991) *J Biol Chem* **266**: 24140-24148
- Zalatan F, Platt T (1992) *J Biol Chem* **268**: 17051-17056
- Lau LF, Roberts JW, Wu R (1983) *J Biol Chem* **258**: 9391-9397
- Morgan WD, Bear DG, von Hippel PH (1983) *J Biol Chem* **258**: 9565-9574
- Jin DJ, Burgess RR, Richardson JP, Gross CA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1453-1457
- Lau LF, Roberts JW, Wu R (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6171-6175
- Morgan WD, Bear DG, von Hippel PH (1983) *J Biol Chem* **258**: 9553-9564
- Wu AM, Christie GE, Platt T (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2913-2917
- Richardson JP (1991) *Cell* **64**: 1047-1049
- Richardson JP, Grimley C, Lowery C (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 1725-1728
- Pinkham JL, Platt T (1983) *Nucl Acides Res* **11**: 3531-3545
- Finger LR, Richardson JP (1981) *Biochemistry* **20**:

- 1640-1645
60. Finger LR, Richardson JP (1982) *J Mol Biol* **156**: 203-219
 61. Biville F, Guiso N (1985) *J Gen Microbiol* **131**: 2953-2960
 62. Opperman T, Richardson JP (1994) *J Bacteriol* **176**: 5033-5043
 63. Nowatzke WL, Richardson JP (1996) *J Biol Chem* **271**: 742-747
 64. Bear DG, Hicks PS, Escudero KW, Andrews CL, McSwiggen JA, von Hippel PH (1988) *J Mol Biol* **194**: 623-635
 65. Geiselman J, Yager TD, Gill SC, Calmettes P, von Hippel PH (1992) *Biochemistry* **31**: 111-121
 66. Gogol EP, Seifried SE, von Hippel PH (1991) *J Mol Biol* **221**: 1127-1138
 67. Oda T, Takanami M (1972) *J Mol Biol* **71**: 799-802
 68. Seifried SE, Bjornson KP, von Hippel PH (1991) *J Mol Biol* **221**: 1139-1151
 69. Bear DG, Andrews CL, Singer JL, Morgan WD, Grant RA, von Hippel PH, Platt T (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1911-1915
 70. Dolan JW, Marshall NF, Richardson JP (1990) *J Biol Chem* **265**: 5747-5754
 71. Dombroski AJ, Brennan CA, Spear P, Platt T (1988) *J Biol Chem* **263**: 18802-18809
 72. Dombroski AJ, LaDine JR, Cross RL, Platt T (1988) *J Biol Chem* **263**: 18810-18815
 73. Dombroski AJ, Platt T (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2538-2542
 74. Dombroski AJ, Platt T (1990) *J Bacteriol* **172**: 7389-7400
 75. Geiselman J, Yager TD, von Hippel PH (1992) *Protein Sci* **1**: 861-873
 76. Richardson JP (1996) *J Biol Chem* **271**: 1251-1254
 77. Query CC, Bentley RC, Keene JD (1989) *Cell* **57**: 89-101
 78. Modrak D, Richardson JP (1994) *Biochemistry* **33**: 8292-8299
 79. Brennan CA, Platt T (1991) *J Biol Chem* **266**: 17293-17305
 80. Bear DG, Peabody DS (1988) *Trends Biochem Sci* **13**: 343-347
 81. McSwiggen JA, Bear DG, von Hippel PH (1988) *J Mol Biol* **199**: 609-622
 82. Brennan CA, Dombroski AJ, Platt T (1987) *Cell* **48**: 945-952
 83. Faus I, Richardson JP (1989) *Biochemistry* **28**: 3510-3517
 84. Lowery-Goldhammer C, Richardson JP (1974) *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 2003-2007
 85. Lowery C, Richardson JP (1977) *J Biol Chem* **252**: 1375-1380
 86. Lowery C, Richardson JP (1977) *J Biol Chem* **252**: 1381-1385
 87. Richardson JP (1982) *J Biol Chem* **257**: 5760-5766
 88. Richardson JP, Carey JP (1982) *J Biol Chem* **257**: 5767-5771
 89. Tsurushita N, Shigesada K (1989) *J Biol Chem* **210**: 23-37
 90. Miwa Y, Horiguchi T, Shigesada K (1995) *J Mol Biol* **254**: 815-837
 91. Geiselman J, von Hippel PH (1992) *Protein Sci* **1**: 850-860
 92. Wang Y, von Hippel PH (1993) *J Biol Chem* **268**: 13947-13955
 93. Stitt BL (1988) *J Biol Chem* **263**: 11130-11137
 94. Wang Y, von Hippel PH (1993) *J Biol Chem* **268**: 13940-13946
 95. Howard B, deCrombrugge B (1976) *J Biol Chem* **251**: 2520-2524
 96. Richardson JP, Conaway R (1980) *Biochemistry* **19**: 4293-3299
 97. Shigesada K, Wu C-W (1980) *Nucl Acids Res* **8**: 3355-3369
 98. Zheng C, Friedman DI (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7543-7547
 99. Brennan CA, Steinmetz EJ, Spear P, Platt T (1990) *J Biol Chem* **265**: 5440-5447
 100. Steinmetz EJ, Platt T (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1401-1405
 101. Linderoth NA, Calendar RI (1991) *J Bacteriol* **173**: 6722-6731
 102. Isaksen ML, Rishovd ST, Calendar R, Linquist BH (1992) *Virology* **188**: 831-839
 103. Steinmetz EJ, Brennan CA, Platt T (1990) *J Biol Chem* **265**: 18408-18413
 104. Geiselman J, Wang Y, Seifried SE, von Hippel PH (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7754-7758
 105. Engel D, Richardson JP (1984) *Nucl Acids Res* **12**: 7389-7400
 106. Geiselman J, Seifried SE, Yager TD, Liang C, von Hippel PH (1992) *Biochemistry* **31**: 121-132
 107. Seifried SE, Easton JB, von Hippel PH (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10454-10458
 108. Greenblatt J, Li J (1981) *Cell* **24**: 421-428
 109. Farham PJ, Greenblatt J, Platt T (1982) *Cell* **29**: 945-951
 110. Fisher RF, Yanofsky C (1983) *J Biol Chem* **258**: 8146-8150
 111. Simons RW, Kleckner N (1983) *Cell* **34**: 683-691
 112. Kingston RE, Chamberlin MJ (1981) *Cell* **27**: 523-531
 113. Lee DN, Landick R (1992) *J Mol Biol* **228**: 759-777
 114. Grayhack EJ, Yang X, Lau LF, Roberts JW (1985) **42**: 259-269
 115. Greenblatt J, McLimont M, Hanly S (1981) *Nature (Lond)* **292**: 215-220
 116. Schmidt MC, Chamberlin MJ (1987) *J Mol Biol* **195**: 809-818
 117. Schmidt MC, Chamberlin MJ (1984) *J Biol Chem* **259**: 15000-15002
 118. Sullivan SL, Gottesman ME (1992) *Cell* **68**: 989-994
 119. Sullivan SL, Ward DF, Gottesman ME (1992) *J Bacteriol* **174**: 1339-1344
 120. Burova E, Gottesman ME (1995) *Mol Microbiol* **17**: 633-641
 121. Burns C, Richardson JP (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4732-4742
 122. Li J, Mason SW, Greenblatt J (1993) *Genes Dev* **7**: 161-172
 123. Li J, Horowitz R, McCracken S, Greenblatt J (1992) *J Biol Chem* **267**: 6012-6019
 124. Nehrke K W, Platt T (1994) *J Mol Biol* **243**: 830-839
 125. Robert J, Sloan SB, Weisberg RA, Gottesman ME, Robledo R, Harbrecht D (1987) *Cell* **51**: 483-492
 126. Babitze P, Yanofsky C (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 133-138
 127. Houman F, Diaz-Torres MR, Wright A (1990) *Cell* **62**: 1153-1163
 128. Mahadevan S, Reynolds AE, Wright A (1987) *J Bacteriol* **169**: 2570-2578
 129. Das A, Wolska K (1984) *Cell* **38**: 165-173
 130. Das A, Ghosh B, Barik S, Wolska K (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4070-4074
 131. Ghosh B, Das A (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6305-6309
 132. Goda Y, Greenblatt J (1985) *Nucl Acids Res* **13**: 2569-2582
 133. Horwitz RJ, Li J, Greenblatt J (1987) *Cell* **51**: 631-641
 134. Mogridge J, Mah F-T, Greenblatt J (1995) *Genes Dev* **9**: 2831-2844

Wyspy CpG — jedyne niezmetylowane odcinki DNA charakterystyczne dla promotorów genów kręgowców

CpG islands — the unmethylated fragments of DNA in vertebrate genome

GRZEGORZ IRA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Cechy wysp CpG
 - II-1. Położenie wysp CpG w stosunku do genów i rozmieszczenie wysp w chromosomie
 - II-2. Odmienna struktura chromatyny w obrębie wysp CpG
- III. Związek metylacji genomu z występowaniem wysp CpG
 - III-1. Metylacja genomu kręgowców
 - III-2. Dlaczego wyspy CpG pozostają niezmetylowane?
 - III-3. Wyjątkowa metylacja wysp CpG
- IV. Wyspy CpG w genomie kręgowców
 - IV-1. Wyspy CpG jako markery genów
 - IV-2. Wyspy CpG u kręgowców zimnokrwistych
 - IV-3. Korelacje między częstością występowania wysp CpG, typem izochor i prążków chromosomalnych u ssaków
- V. Pochodzenie i ewolucja wysp CpG

Contents:

- I. Introduction
- II. Properties of CpG islands
 - II-1. Location of CpG islands relative to the genes and distribution of island in the chromosome
 - II-2. Alternative chromatin structure at CpG islands
- III. Methylation and CpG islands
 - III-1. Methylation of vertebrate genome
 - III-2. Why CpG islands remain unmethylated?
 - III-3. Exceptional methylation of CpG islands
- IV. CpG islands in vertebrate genomes
 - IV-1. CpG islands as gene markers
 - IV-2. CpG islands of cold-blooded vertebrates
 - IV-3. Correlations between frequency of CpG islands and type of isochores and chromosomal bands in mammalian genomes
- V. Origin and evolution of CpG islands

Wykaz stosowanych skrótów: izochora — długi odcinek DNA (300kb) jednolity pod względem składu zasad; **sekwencja GC** (ang. *GC box*) — sekwencja bogata w GC leżąca w obrębie promotora niektórych genów eukariotycznych, najczęściej genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1; **sekwencja TATA** (ang. *TATA box*) — sekwencja leżąca w obrębie promotora wielu genów eukariotycznych polimerazy II, miejsce wiązania czynnika TFIIID; **geny metabolizmu podstawowego** (ang. *housekeeping genes*) — geny niezbędne do utrzymania metabolizmu komórkowego, których ekspresja nie podlega regulacji; **sekwencja CAAT** (ang. *CAAT box*) — sekwencja regulatorowa leżąca w obrębie promotora wielu genów eukariotycznych; **imprinting genomowy** — zmiany w genie pojawiające się w czasie spermatogenezy i oogenezy, czego rezultatem jest odmiennosc alleli pochodzących od matki i ojca już we wczesnych stadiach zarodkowych. Może być spowodowany odmiennym wzorcem metylacji alleli matki i ojca; **fragmenty HpaII, HTF** (ang. *HpaII tiny fragments*) — drobne fragmenty DNA pochodzące głównie z obszaru wysp CpG uzyskane za pomocą trawienia DNA enzymem restrykcyjnym HpaII, którego sekwencja specyficzna znajduje się najczęściej w obrębie wysp CpG.

I. Wstęp

Metylacja jest najczęściej występującą modyfikacją DNA u Eucaryota, gdzie ulega jej tylko jedna z czte-

rech zasad, cytozyna. W wielu genomach zwierzęcych współistnieją zmetylowane i niezmetylowane sekwencje DNA. Poziom i rozkład zmetylowanego DNA w obrębie genomów bezkręgowców i kręgowców jest różny. Genom bezkręgowców składa się z długich, na przemian występujących, trwale zmetylowanych i niezmetylowanych sekwencji. Zmetylowane odcinki chromosomu obejmują zazwyczaj mniej niż 1/3 genomu. U niektórych gatunków (np. *Drosophila melanogaster*) metylacja jest ledwie wykrywalna lub w ogóle się jej nie stwierdza. W wolnej od metylacji części genomu bezkręgowców znajdują się wszystkie dotąd zmapowane geny. U kręgowców niezmetylowana frakcja DNA obejmuje jedynie 1-2% genomu tworząc tzw. wyspy CpG [1-4].

Wyspy CpG odkryte w genomie mysim [5] są sekwencjami długości 0.5-2 kb. Charakteryzują się one (i) wysoką zawartością guaniny i cytozyny (G+C powyżej 60%), (ii) licznymi, niezmetylowanymi dinukleotydami CpG, które jedynie w ich obrębie pojawiają się z częstością zbliżoną do oczekiwanej (stosunek częstotliwości obserwowanej do oczekiwanej wynosi tu powyżej 0.6, poza wyspami natomiast około 0.2), (iii) występowaniem tzw. sekwencji GC (ang. *GC box*, miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego, Sp1).

Ze względu na wysoką zawartość nukleotydów G+C i brak metylacji, w obrębie wysp CpG stosunkowo często występuje sekwencja CCGG. Ten tetra-

* Mgr, Pracownia Genetyki, IBIOS, UMK, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

nukleotydy rozpoznawany jest przez restryktazę HpaII wrażliwą na metylację, co umożliwia oddzielenie segmentów „wyspowego” DNA od pozostałości genomu jako tzw. fragmentów HpaII (inaczej HTF od HpaII Tiny Fragments). Wyspy zawierają także miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne przecinające w obrębie rzadkich sekwencji bogatych w G+C i niezmetylowane dinukleotydy CpG (np. enzymy NotI i SacI). W praktyce oznacza to, że często ponad 80% takich miejsc znajduje się w obrębie wysp CpG.

Wyspy CpG sąsiadują lub pokrywają się z końcami 5' wszystkich genów metabolizmu podstawowego i znacznej części genów specyficznych tkankowo. Nie-równomierny rozkład w genomie niezmetylowanego dinukleotydu CpG i jego preferencyjne występowanie na końcu 5' pewnych genów wykazali jako pierwsi McClelland i Ivarie [6] oraz Tykocinski i Max [4]. Specyficzne położenie wysp CpG wykorzystuje się do poszukiwania i klonowania genów. Wysepki te mają tzw. „otwartą” strukturę chromatyny i mogą wskazywać miejsca oddziaływań między czynnikami transkrypcyjnymi i promotorami.

II. Cechy wysp CpG

II-1. Położenie wysp CpG w stosunku do genów i rozmieszczenie wysp w chromosomie

Chociaż geny, których sekwencja sąsiaduje lub pokrywa się częściowo z odcinkami DNA o charakterze wyspy CpG mają bardzo różną długość (od kilku do kilkuset kb) to najczęściej wyspy obejmują pierwszy ekson. Można jednak wśród wszystkich wysp CpG wyróżnić te, które leżą w środku lub na początku genu, i te które obejmują cały gen. Geny metabolizmu podstawowego zawsze zawierają wyspę CpG na swym końcu 5' (tab. 1). W kilku wypadkach wykazano, że jeden gen obejmować może dwie wyspy CpG [3].

Wyspy CpG mogą występować co kilkadziesiąt tysięcy par zasad, ale mogą też być oddzielone milionami par zasad [7-8]. Wyniki analizy dużych fragmentów ludzkiego genomu, w których zmapowano wyspy CpG, wskazują na występowanie średnio jednej wyspy na 36 kb [9]. Średnią tę wyliczono biorąc pod uwagę fragmenty DNA, które opisano jako bogate w wyspy CpG. W dużej części genomu (55%) wyspy CpG występują bardzo rzadko (raz na kilka milionów par zasad). Częstość ich występowania zwiększa się wraz ze wzrostem aktywności transkrypcyjnej chromatyny. Ponad 80% wysp CpG leży w stanowiącej 45% genomu części odpowiadającej prążkom R (patrz IV-3).

II-2. Odmienna struktura chromatyny w obrębie wysp CpG

Wyspy CpG obejmują najczęściej promotory i początkową część genów, co już sugeruje tzw. „otwarty”

Tabela 1.

Położenie wysp CpG w stosunku do jednostki transkrypcyjnej w zbadanych genach (na podstawie [83]).

Położenie wysp CpG względem genu	Geny metabolizmu podstawowego	Geny tkankowo-specyficzne
całość genu	11	7
początek genu	84	45
początek i środek genu	7	11
środek genu	—	39
poza genem	—	2

charakter chromatyny w ich obrębie. Chromatyna taka charakteryzuje się niewielką gęstością upakowania nukleosomów, wysokim stopniem acetylacji histonów H3 i H4 i małą zawartością histonu H1 [10]. Niewielka gęstość upakowania nukleosomów jest charakterystyczna dla struktury aktywnych promotorów, ułatwia ona wiązanie białek regulatorowych z DNA i wiąże się z występowaniem miejsc nadwrażliwych na działanie nukleazy [11, 11a]. Podobnie mała zawartość histonu H1 ułatwiać może wiązanie czynników transkrypcyjnych [12-13]. Histon ten wykazuje większe powinowactwo do zmetylowanego DNA [14-15], wobec czego niezmetylowane wyspy CpG byłyby tu „z natury” zubożone w histon H1. Należy dodać jednak, że nie we wszystkich badaniach stwierdzono preferencyjne wiązanie histonu H1 ze zmetylowanym DNA [16]. Podobnie, związek acetylacji histonów z transkrypcją nie jest do końca wyjaśniony. Jedni badacze mówią o ścisłej zależności pomiędzy aktywnością transkrypcyjną genu i acetylacją N-końców histonów [11], podczas gdy inni wykazują brak wyraźnej korelacji [17]. Porównano stopień acetylacji chromatyny w obrębie aktywnego i nieaktywnego genu β globiny kurczaka. Wynik wyraźnie wskazuje, że ekspresji tego genu towarzyszy zwiększona acetylacja chromatyny (ściślej mówiąc, rdzeniowych histonów nukleosomów). Wykazano także dodatni wpływ acetylacji histonów H3 i H4 (zwłaszcza H4) na wiązanie czynników transkrypcyjnych z specyficznymi sekwencjami [18-19]. Stymulujący wpływ zacetylowanych histonów na wiązanie białek regulatorowych może wynikać ze zredukowania oddziaływań dodatnio naładowanego N-końca histonów z ujemnie naładowanymi grupami fosforowymi szkieletu DNA bądź też konformacyjnymi zmianami w nukleosomie. Inne badania wskazują, że o ile heterochromatyna jest znacznie mniej acetylowana niż euchromatyna to nie ma zależności pomiędzy aktywnością transkrypcyjną i poziomem acetylacji chromatyny, tj. poziomem acetylacji histonów nie wzrasta gdy gen ulega aktywacji [17, 20]. Być może więc acetylacja określa jedynie potencjalną aktywność transkrypcyjną genu, a nie odgrywa roli w bezpośrednim inicjowaniu transkrypcji [20]. Poziom acetylacji histonów zasocjowanych z DNA w obrębie wyspy CpG nie oznaczałby więc, że gen, któremu ta wyspa towarzyszy, jest transkrypcyjnie aktywny, a tylko to, że

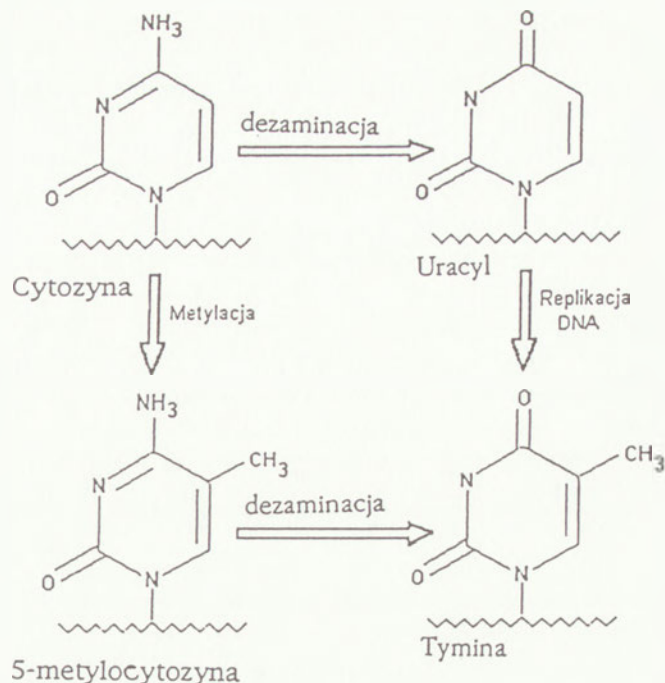
spełnia on jeden z warunków wymaganych do zainicjowania transkrypcji. Nie zaobserwowano podwyższonego poziomu acetylacji chromatyny w obrębie wysp CpG w porównaniu do pozostałej części genu i regionów bezpośrednio przyległych. Dla przykładu gen *c-myc*, jak każdy gen metabolizmu podstawowego, zawiera na końcu 5' wyspę CpG. Poziom acetylacji histonów jest tu równy dla całego genu i regionów przyległych [17]. Biorąc pod uwagę wszystkie cechy struktury chromatyny w obrębie wysp CpG i ich specyficzne położenie na końcu 5' genów należy spodziewać się szczególnej roli tych odcinków DNA w procesie transkrypcji.

Należy zadać jeszcze pytanie czy charakterystyczna struktura chromatyny w obrębie wyspy CpG jest wynikiem zachodzenia tam transkrypcji, czy też wynika z charakterystycznego składu zasad i braku metylacji. Wydaje się, że transkrypcja pełni tu główną rolę. Specyficzne tkankowo geny mające wyspy CpG (np. geny rodziny α globiny u człowieka) w tkankach, w których nie ulegają ekspresji leżą w obrębie chromatyny nieaktywnej [10]. Z drugiej strony brak metylacji wysp CpG (niezależny od aktywności transkrypcyjnej powiązanych z nimi genów) i prawdopodobnie wynikające z tego osłabienie wiązania histonu H1 [14] oraz stała acetylacja [17] może wpływać na utrzymanie przynajmniej częściowo tzw. „otwartej” struktury chromatyny. Problem ten nie był jednak systematycznie badany.

III. Związek metylacji genomu z występowaniem wysp CpG

III-1. Metylacja genomu kręgowców

U kręgowców jedyną zasadą, która ulega metylacji jest cytozyna [21]. Ponad 90% 5-metylocytozyny znajduje się w mającym charakter palindromu dinukleotydu CpG [22-23], choć może ona także występować w trinukleotydu CpNpG, gdzie N oznacza dowolną zasadę [24]. Po zakończeniu replikacji DNA metylotransferaza 5-cytozyny metyluje dinukleotydy CpG w nowej nici zgodnie z wzorcem istniejącym na nici rodzicielskiej. Dinukleotyd CpG występuje u kręgowców z częstością znacznie niższą niż pozostałe dinukleotydy. Stanowi ona około 20% wartości wyliczonej na podstawie składu nukleotydów C i G [25]. Jedynie w obrębie wysp CpG dinukleotyd CpG występuje z oczekiwaną częstością, co związane jest z brakiem metylacji cytozyny. Powszechnie uważa się, że niski poziom CpG w genomie kręgowców wynika ze skłonności metylocytozyny do dezaminacji. Dezaminacja metylocytozyny prowadzi do zmiany cytozyny na tymidynę (Ryc. 1) i do powstania niesparowanych zasad T/G, co indukuje system naprawy DNA. System ten wycina jedną ze źle sparowanych zasad i zastępuje ją zasadą poprawnie sparowaną [25-28]. Najczęściej naprawa niesparowanych zasad przywraca pierwotną



Rys. 1. Tranzycja cytozyny do tyminy w DNA. Dezaminacja 5-metylocytozyny zachodzi o wiele częściej niż dezaminacja cytozyny. Dezaminacja 5-metylocytozyny prowadzi bezpośrednio do tyminy, natomiast dezaminacja cytozyny prowadzi do powstania uracylu, który replikuje jako tymina, jeśli nie zostanie naprawiony (na podstawie [11]).

sekwencję, jednak nie wystarcza to do utrzymania na stałym poziomie metylocytozyny zarówno u *E. coli* jak i w komórkach ssaków [29]. Konsekwencją częstej dezaminacji 5-metylocytozyny są mutacje leżące u podłoża wielu chorób genetycznych i nowotworowych człowieka [30-31]. Aż 35% punktowych mutacji wywołujących choroby genetyczne znaleziono w dinukleotydu CpG [32-33]. Powyżej 90% tych mutacji to tranzycje C do T i G do A, pojawiające się z 42-krotnie wyższą częstością niż by to wynikało z przypadkowych mutacji.

Czy metylacja DNA występująca powszechnie w genomie kręgowców ma jedynie negatywne skutki, czy też jest niezbędnym elementem funkcjonowania komórek? Okazało się, że w przeciwieństwie do zwierząt w ogóle nie wykazujących metylacji DNA (np. *Drosophila melanogaster*), ssaki wymagają odpowiedniego wzorca metylacji do rozwoju. Niszcząc funkcjonalny gen metylotransferazy w liniach zarodkowych myszy wykazano, że brak metylacji powoduje zaburzenia rozwoju i śmierć embrionu [34]. Metylacja jest też zapewne jednym z mechanizmów imprintingu genomowego tj. zmian w genach pojawiających się w czasie spermatogenezy i oogenezy, czego rezultatem jest odmienność alleli pochodzących od matki i ojca [35]. Prócz tego metylacja pełni zasadniczą funkcję w inaktywacji jednego z chromosomów X u samic ssaków [36] oraz w regulacji transkrypcji [35]. Rozpoznano dwa alternatywne mechanizmy hamowania transkrypcji przez metylację: (i) bezpośrednio poprzez wpływ na zmianę struktury chromatyny i uniemożliwienie wiązania czynników transkrypcyjnych z promotorem, (ii)

pośrednio poprzez białka, które wiążą się specyficznie ze zmetylowanym DNA blokując dostęp aktywatorów transkrypcji [38, 38a]. Kilka dobrze scharakteryzowanych czynników transkrypcyjnych (np. AP-2, CREB/ATF, E2F) nie wiąże się z rozpoznawanym przez siebie miejscem, jeśli jest ono zmetylowane. Są jednak czynniki, jak Sp1, rozpoznające specyficzne sekwencje bogate w CpG, niezależnie od tego czy są one zmetylowane czy nie. Do białek blokujących transkrypcję i wiążących się ze zmetylowanym DNA należą (i) MeCP1, wiążący się z zmetylowaną sekwencją zawierającą co najmniej dwaście dinukleotydów CpG, (ii) MeCP2, któremu wystarcza do wiązania jeden zmetylowany dinukleotyd CpG, (iii) MDPB1 i MDPB2 wiążące się z dłuższymi sekwencjami zawierającymi zmetylowany dinukleotyd CpG [26-31].

Należy podkreślić, że nie wiadomo, czy metylacja jest przyczyną, czy skutkiem opisanych procesów tj. inaktywacji chromosomu X, zmiany poziomu ekspresji genów, zmiany struktury chromatyny czy imprintingu genomowego. Nie jest wykluczone, że metylacja DNA jedynie utwierdza stan nieaktywności genu, który został wywołany zmianą w strukturze chromatyny [45].

III-2. Dlaczego wyspy CpG pozostają niezmetylowane?

Wyspy CpG są bardzo bogate w miejsca potencjalnego ataku metylotransferazy, jednak nie ulegają one metylacji stanowiąc jedyne niezmetylowane fragmenty DNA w genomach kręgowców, niezależnie od tego czy gen, z którym są powiązane jest aktywny czy też nie. Wyspy CpG są niezmetylowane w plemnikach, oocytach, jak i w dojrzałych komórkach wszystkich tkanek [46-47]. Istnieje kilka hipotez tłumaczących to zjawisko.

Jedną z nich zakłada, że wyspy CpG są słabym substratem metylotransferazy. Sklonowane, bogate w CpG fragmenty DNA są znacznie słabiej metylowane *in vitro* przez oczyszczoną metylotransferazę ludzką niż fragmenty ubogie w CpG. Hipoteza ta zawodzi, gdy bierze się pod uwagę metylację wysp CpG na nieaktywnym chromosomie X. Być może w tym wypadku jakiś kofaktor czyni wyspy CpG dostępnymi dla metylotransferazy [48].

Inna hipoteza sugeruje, że pewna frakcja histonów H1 (H1e-c) bierze udział w utrzymaniu stanu demetylacji wysp CpG. Histony tego rodzaju wiązałyby się z bogatymi w CpG regionami DNA i uniemożliwiały metylację [49].

Jeszcze inni autorzy proponują, że wyspy CpG są metylowane *de novo*, ale grupa metylowa jest potem specyficznie z tych miejsc usuwana. Jest to poparte wynikiem doświadczenia, w którym wykazano, że wyspy CpG częściowo zmetylowane *in vitro* tracą metylację po transfekcji do komórek embrionalnych myszy, podczas gdy region pozawyspowy może w tym

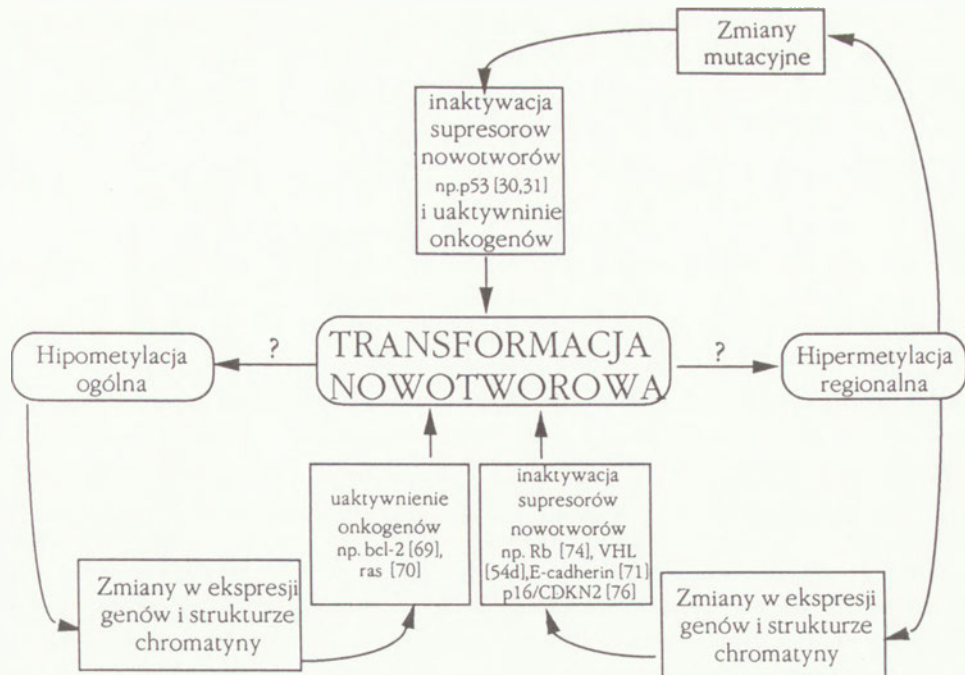
samym czasie pozostać zmetylowany, a nawet ulec dalszej metylacji. Demetylacja dotyczy jednak tylko wysp CpG częściowo zmetylowanych, całkowicie zmetylowane wyspy nie podlegają demetylacji [50-51].

Ostatnia hipoteza zakłada, że białka wiążące się z wyspami CpG blokują dostęp metylotransferazy do DNA [52-53]. Białka te byłyby fizyczną przeszkodą dla enzymu metylującego. Wykonano *in vivo* genomowy footprinting ludzkiego genu PGK1-1 (ang. *phosphoglycerate kinase-1*) leżącego na aktywnym chromosomie X powiązanego z wyspą CpG, i wykazano obecność wielu związanych z nią białek [54]. Na nieaktywnym chromosomie X, którego DNA jest zmetylowane wyspa CpG tego genu nie wiąże białek [55]. Genomowy footprinting wyspy CpG mysiego genu *aprt* (ang. *adenine phosphoribosyltransferase*) wykazał, że sekwencje GC są związane z licznymi cząsteczkami białek (najprawdopodobniej Sp1), a delecja lub mutacja sekwencji GC powoduje metylację *de novo* [53]. Wprowadzenie sekwencji rozpoznawanej przez Sp1 do zmetylowanego genu nie obejmującego wyspy, powoduje jego demetylację [56]. Wyciągnięto stąd wniosek, że sekwencje GC są niezbędne do utrzymania niezmetylowanych wysp. Transgeniczne wyspy CpG wprowadzone w dużej liczbie kopii są jednak metylowane co sugeruje, że białka wiążące się z wyspami i blokujące dostęp metylotransferazy wyczerpują się [57]. Obecnie wiadomo, że sekwencje GC są niezbędne do utrzymania wysp w stanie niezmetylowanym, jednak obecność miejsc wiązania Sp1 nie jest *per se* do tego wystarczająca [58]. Hipoteza ta nie tłumaczy dlaczego geny specyficzne tkankowo z wyspami CpG pozostają niezmetylowane nawet w tkankach, w których są nieaktywne i gdzie promotory tych genów nie wiążą aktywatorów transkrypcji.

III-3. Wyjątkowa metylacja wysp CpG

W szczególnych wypadkach wyspy CpG ulegają metylacji. W normalnych komórkach dochodzi do tego w nieaktywnym chromosomie X a także w genach objętych imprintingiem i w pseudogenach [47, 59]. Poza tym metylacji mogą ulegać wyspy CpG genów specyficznych tkankowo w procesie ustalania się nieśmiertelnych linii komórkowych [60]. Metylacja wysp CpG w obrębie genów, które ulegają ekspresji jest powiązana z ich represją i utratą produktu transkrypcji [61]. Tego typu represja jest przyczyną wielu chórów genetycznych. Metylacja wyspy CpG genu FMR-1 powiązana jest z zespołem łamliwego chromosomu X [62-63]. Metylacja wyspy CpG na końcu 5' promotora genu kodującego receptor estrogenu jest przyczyną niewrażliwości na hormon u kobiet chorych na raka sutka, co stanowi podstawowy problem w terapii [64]. Zmiany we wzorze metylacji są jednymi z najwcześniejszych i najczęstszych zmian w nowotworzeniu [65]. Nie wiadomo, czy metylacja jest jedną z przyczyn, czy konsekwencją transformacji nowo-

Ryc. 2. Hipotezy tłumaczące związek metylacji z transformacją nowotworową. Znakiem zapytania zaznaczono obecną niewiedzę czy hipo- bądź hipermetylacja jest jedną z przyczyn, czy konsekwencji transformacji nowotworowej.



nowotworowej. Udowodniono jednak, że obniżenie aktywności metylotransferazy redukuje w znacznym stopniu częstość występowania polipów przewodu pokarmowego u myszy [66].

Na rycinie 2 przedstawiono hipotezy tłumaczące w jaki sposób metylacja może wpływać na nowotworzenie. Całkowity poziom metylacji maleje w procesie transformacji nowotworowej [67], chociaż obserwuje się znacznie podwyższoną ekspresję metylotransferazy [68]. Opisano hipometylację kilku onkogenów powiązaną z ich uaktywnieniem w procesie nowotworzenia (Ryc. 2) [69-70]. Niektóre fragmenty DNA, w tym wyspy CpG wielu genów, ulegają przeciwnemu procesowi tj. hipermetylacji [71-74]. Dowiedzono, że podwyższony poziom metylotransferazy, w komórkach nowotworowych, może wywoływać metylację wysp CpG [75]. Metylacja wysp CpG jest powiązana z inaktywacją kilku genów o funkcji supresorów nowotworów. Tego rodzaju epigenetyczne wyciszenie było po raz pierwszy odkryte w genie *Rb1* (anty-onkogen), brak aktywności którego wywołuje retinoblastomę (glejaka siatkówki). Później wyciszenie takie opisano także dla genów innych supresorów jak np. *VHL*, *p16*, *E-cadherin* [71, 74, 76-78]. Jest prawdopodobne, że w procesie nowotworzenia, represja genów związanych ze wzrostem i różnicowaniem komórek wynika z metylacji ich wysp CpG. Opracowano dlatego bardzo czułą metodę opartą na reakcji PCR, umożliwiającą zbadanie stanu metylacji wysp CpG, która może znaleźć zastosowanie kliniczne (ang. *MSP* — *methylation specific PCR*) [79].

Pewnego rodzaju wyjątek stanowi wyspa CpG położona na końcu 3' genu *apoE* (ang. *apolipoprotein-E*), bowiem jest ona zmetylowana we wszystkich poddanych analizie tkankach za wyjątkiem plemników. Metylacja wyspy 3' nie powoduje represji genu *apoE*. Wskazywać to może na różnicę funkcjonalną

między wyspami na końcach 5' i 3', ponieważ metylacji tych pierwszych zawsze towarzyszy represja genu [80]. W jaki sposób metylotransferaza rozpoznaje, które z wysp metylować pozostaje zagadką. Podobnie, nie wiadomo jak rozpoznawane są geny podlegające metylacji w imprintingu genomowym.

IV. Wyspy CpG w genomie kręgowców

IV-1. Wyspy CpG jako markery genów

Występowanie wysp CpG raz na kilkadziesiąt tysięcy par zasad i fakt, że w ich obrębie znajduje się większość miejsc cięcia dla enzymów tnących rzadko, tzw. „enzymów CpG”, umożliwia ich wykorzystanie do tworzenia map restrykcyjnych dużych odcinków DNA [2, 81-82]. Przykładami enzymów wykorzystywanych do sporządzania tego typu map są *NotI* (rozpoznawana sekwencja GCGGCCGC) lub *NruI* (rozpoznawana sekwencja TCGCGA), dla których odpowiednio 82% i 75% miejsc cięcia znajduje się w obrębie wysp CpG. Aktywność obu jest blokowana przez metylację cytozyny.

Wyspy CpG są doskonałymi markerami genów, wyznaczają położenie wszystkich genów metabolizmu podstawowego i 40% genów specyficznych tkankowo [83]. Dzięki temu możliwe stało się poszukiwanie genów poprzez mapowanie wysp CpG. Izolowanie wysp CpG i używanie ich jako sond w poszukiwaniu genów, izolowaniu pełnych cDNA i określaniu położenia genów stało się powszechną techniką biologii molekularnej [82, 84-92]. Tworzenie bibliotek wysp CpG (ang. *CGI libraries*) ma tę zaletę nad bibliotekami cDNA, że każdy klon jest reprezentowany w równej liczbie kopii podczas gdy liczba poszczególnych klonów w bibliotekach cDNA zależy od poziomu transkrypcji danego genu. Biblioteki takie tworzy się za

pomocą kolumn pozwalających na frakcjonowanie DNA w zależności od poziomu metylacji dinukleotydu CpG [85]. Kolumny te są wypełnione żywicą związaną z domeną białka MeCP2 odpowiadającą za wiązanie metylowanych sekwencji DNA. Dane na temat bibliotek wysp CpG osiągalne są w serwerze WWW, URL, <http://biomaster.uio.no/cpgisle.html>. Do poszukiwania sekwencji transkrybowanych połączonych z wyspami CpG stosuje się reakcję PCR (tzw. *IR PCR* — *island rescue PCR*) w celu amplifikowania fragmentów DNA na granicy których znajdują się sekwencje rozpoznawane przez „enzymy CpG” [93].

Wyspy CpG posłużyły także do oceny przybliżonej liczby genów u człowieka i myszy [9]. Początkowo stwierdzono, że liczba wysp CpG, na haploidalny genom wynosi w przypadku człowieka 45.000 i myszy 37.000. Następnie ustalono, jaki procent zsekwencjonowanych genów powiązany jest z wyspami CpG. Spośród 152 ludzkich i 81 mysich genów odpowiednio 55.9% pierwszych i 46% drugich zawiera wyspy CpG. Biorąc pod uwagę powyższe dane ustalono całkowitą liczbę genów na około 80.000 w obu organizmach przy założeniu, że wszystkie wyspy CpG wiążą się z genami. Inne, niezależne obliczenia dały podobną proporcję genów w ludzkim genomie powiązanych z wyspami CpG [83]. W badaniach tych wykorzystano dane z banku genów bazy danych EMBL. Przeanalizowano 375 genów kodujących białka i 58 pseudogenów na obecność wysp CpG. Analiza genów transkrybowanych przez polimerazę I i III (rRNA i tRNA) wykazała, że wszystkie one zawierają regiony bogate w CpG. Geny rRNA są zestawami identycznych genów zorganizowanych w tandem. U człowieka całkowity transkrypt dla 18S, 5.8S i 28S rRNA ma długość 13 kb i prawdopodobnie jego większość, o ile nie całość bogata jest w CpG. Analiza 10 genów tRNA wykazała, że mają one krótkie regiony bogate w CpG, obejmujące jednostkę transkrypcji [83]. Geny transkrybowane przez polimerazę II podzielono na dwie grupy:

pierwsza grupa to geny metabolizmu podstawowego i geny ulegające ekspresji w większości tkanek, druga grupa to geny o ograniczonej transkrypcji i specyficzne tkankowo. Umożliwiło to poszukiwanie korelacji między wyspami CpG i rodzajem ekspresji powiązanych z nimi genów. Z 362 genów kodujących białka 156 nie było powiązanych z wyspą CpG (Tab. 2). Wszystkie należały do drugiej grupy. Wśród pozostałych 206 genów, które są powiązane z wyspami CpG, 102 należało do pierwszej grupy (wszystkie geny metabolizmu podstawowego) i 104 należało do drugiej grupy (40% wszystkich genów specyficznych tkankowo). Zanalizowano 58 pseudogenów, z czego 9 było powiązanych z wyspami CpG. Geny odpowiadające im, co nie było zaskoczeniem także zawierały wyspy CpG. Badanie objęło w sumie około 0.5% wszystkich genów genomu ludzkiego i może pozwolić na próbę oceny relacji między genami i wyspami CpG. Więcej niż połowa badanych genów (57%) była powiązana z wyspami CpG.

Poprawność oceny całkowitej liczby genów na podstawie liczby wysp uwarunkowana jest założeniem, że wszystkie wyspy CpG powiązane są z genami. Czy możliwe jest, że nie wszystkie wyspy powiązane są z genami? W celu sprawdzenia takiej możliwości poszukiwano transkryptów dla trzech przypadkowo wyizolowanych wysp CpG z mysiego DNA [94]. Dla dwu z nich odnaleziono transkrypty. Podobnie dla czterech przypadkowych wysp chromosomu X poszukiwano transkryptów i dla trzech odnaleziono je w komórkach HeLa [95]. Nieodnalezienie transkryptu dla jednej z wysp w pierwszym przypadku nie oznacza, że nie wiąże się ona z genem, ponieważ zbadano jedynie cztery tkanki, a wyspa ta może być powiązana z genem specyficznym tkankowo, którego transkrypt nie był obecny w tkankach objętych badaniami. Podobnie w drugim przypadku wyspa może się wiązać z genem specyficznym tkankowo. Nie odkryto i nie zmapowano dotychczas wysp CpG, o których na

Tabela 2.

Rodzaj i liczba genów powiązanych z wyspami CpG (na podstawie [83]).

Rodzaj genów	Wszystkie zbadane	Powiązane z CpG	Nie powiązane z CpG
geny transkrybowane przez polimerazę II: w tym	362	206 (57%)	156 (43%)
geny metabolizmu podstawowego	102	102 (100%)	—
geny specyficzne tkankowo	260	104 (40%)	156 (60%)
pseudogeny	58	9 (16%)	49 (84%)
geny tRNA	wszystkie zbadane były powiązane z wyspami CpG		
geny rRNA			

pewno można powiedzieć, że nie są związane z genami.

IV-2. Wyspy CpG u zimnokrwistych kręgowców

Początkowo opisano występowanie wysp CpG w genomie ssaków, ptaków, gadów, płazów i ryb [1], jednak późniejsze badania wykazały u zimnokrwistych kręgowców nieobecność lub bardzo niewielką liczbę fragmentów bogatych w G+C [96]. Analiza porównawcza wysp powiązanych z homologicznymi zsekwenconowanymi genami u zimno- i ciepłokrwistych kręgowców wykazała, że wyspy CpG zimnokrwistych jeśli występują, to są inne od wysp kręgowców ciepłokrwistych. Zawierają znacznie mniej G+C (poniżej 60%, a często mniej niż 50%), bardzo mało miejsc cięcia dla enzymu HpaII i enzymów restrykcyjnych tnących rzadko charakterystycznych dla typowych wysp CpG. Brak w nich również sekwencji GC. Jedyną cechą wysp kręgowców ciepłokrwistych, występującą w obrębie rzadkich wysp kręgowców zimnokrwistych była obecność niezmetylowanych dinukleotydów CpG z częstością zbliżoną do oczekiwanej. Bez względu na liczbę dinukleotydów CpG jest jednak u zimnokrwistych kręgowców znacznie niższa w obrębie wysp w porównaniu do kręgowców stałocieplnych. U zimnokrwistych często brak jest wysp CpG w genach homologicznych do genów zawierających wyspy CpG u ciepłokrwistych kręgowców. U przedstawicieli gadów, płazów i ryb wykazano brak lub bardzo niewielką ilość fragmentów HTF charakterystycznych dla wysp CpG. Jeśli one się pojawiły, z reguły wynikały z cięcia satelitarnego DNA lub rRNA [97-98]. A i s s a n i i B e r n a r d i uogólniają brak czy też występowanie w niewielkiej ilości fragmentów HTF na wszystkie kręgowce zimnokrwiste [97].

IV-3. Korelacja między częstością występowania wysp CpG, typem izochor i prążków chromosomalnych u ssaków

Genom ssaków jest mozaiką izochor, które pierwotnie określono jako długie (> 300 kb) segmenty DNA o jednolitym składzie zasad [7]. Izochory można podzielić na kilka rodzin. W genomie ludzkim, który jest typowy dla ssaków, wyróżnić można „lekkie” („light”), ubogie w G+C izochory L1 i L2, reprezentujące 62% genomu, ciężkie („heavy”) bogate w G+C [99, 100], izochory H1 i H2 oraz bardzo bogate w G+C izochory H3, obejmujące odpowiednio 31% i 3-4% genomu. Pozostałe 3-4% to satelitarny i rybosomalny DNA. Wiele badań wskazuje na to, że rozmieszczenie wysp CpG jak i genów w genomie stałocieplnych kręgowców nie jest równomierne ani przypadkowe [7, 8, 101, 102]. Pierwsze badane geny odkryto w izochorach bogatych w G+C. Dalsze geny także preferencyjnie mapowano w obrębie izochor bogatych w G+C. W izochorach L1, L2, H1, H2 i H3 poziom G+C i zawartość genów stopniowo rośnie od

L1 do H3. Liczba sekwencji kodujących osiąga maksimum w rodzinie izochor H3. W izochorach tych jest 7 razy więcej genów niż w bogatych w G+C izochorach H1 i do 20 razy więcej niż w ubogich w G+C izochorach L2. Stąd rodzina izochor H3 nazwana została rdzeniem genomu [7].

Niejednorodność chromosomów ssaków pod względem struktury i funkcji stanowi podstawę do ich różnicowego barwienia w wyniku którego na chromosomie uwidaczniają się prążki. Wyróżnia się prążki R i G. Do najbardziej popularnych metod służących do otrzymania prążków w chromosomach metafazowych należy barwienie roztworem Giemsy poprzedzone proteolitycznym trawieniem chromosomów. W wyniku otrzymuje się tzw. prążki G. Barwienie tym samym barwnikiem poprzedzone częściową cieplną denaturacją w roztworach soli daje prążki R. Domeny chromosomów nazywane prążkami G replikują późno, są stosunkowo bogate w zasady AT, mają zwartą strukturę chormatyny i są rozdzielone prążkami R o przeciwnych cechach (mniej skondensowane, wcześniej replikujące i bogatsze w G+C) (Tab. 3) [7, 8, 103-104]. Prążki G są złożone niemal wyłącznie z izochor ubogich w G+C, jedynie z dodatkiem nielicznych bogatych w G+C izochor z rodziny H1. Prążki R składają się z dwu rodzajów domen, T i R'. Prążki T są złożone głównie z izochor rodziny H2 i H3, natomiast prążki R' zawierają w równej ilości izochory bogate w G+C (głównie z rodziny H1) i ubogie izochory (Tab. 3) [7]. Moment replikacji wydaje się powiązany nie tyle z typem prążkowania ile z częstością występowania genów i ich ekspresją. U zimnokrwistych kręgowców, których chromosomy nie wykazują wcale lub wykazują bardzo słabe prążkowanie G/R również stwierdzono istnienie dwóch okresów replikacji — wczesnego i późnego. Poza tym geny specyficzne tkankowo replikują wcześniej w komórkach, w których ulegają ekspresji pomimo tego, że znajdują się często w obrębie prążków G [7, 104].

W izochorach H3, leżących w prążkach T, najbogatszych w G+C, wszystkie geny powiązane są z wyspami CpG. Skoro geny metabolizmu podstawowego mają zawsze wyspę CpG na końcu 5' powinny być zgrupowane w tych izochorach. C r a i g i B i c k m o r e za pomocą hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* potwierdzili, że wyspy CpG są preferencyjnie znajdowane we wcześnie replikujących regionach genomu — prążkach R [8].

Różne rodziny izochor są powiązane z różnymi strukturami chromatyny. Struktura chromatyny jest „otwarta” w izochorach bogatych w G+C i w wyspy CpG tj. izochorach H2 i H3, które znajdują się głównie w prążkach T. Prążki R i granice między prążkami R i G są delikatnymi miejscami chromosomu, przeważnie miejscami procesów rekombinacyjnych takich jak spontaniczne translokacje, wymiany siostrzanych chromatyd, aberracje chromosomowe. Częstość rekombinacji jest najwyższa w bogatych w GC izo-

Tabela 3.

Właściwości prążków G, R i T w chromosomach ssaków (na podstawie [7, 8, 102-103, 109]).

Prążki G	Prążki R	Prążki T
barwienie roztworem Giemsy po trawieniu proteazą	barwienie roztworem Giemsy po denaturacji cieplnej	barwienie jak w przypadku prążków R, wyższa temperatura denaturacji
mała gęstość genów obejmują 20% zmapowanych genów średnio 1 gen na 71 kb	duża gęstość genów obejmują 80% zmapowanych genów średnio 1 gen na 32 kb	bardzo duża gęstość genów średnio 1 gen na 14 kb
głównie geny specyficzne tkankowo z sekwencjami TATA i CAAT	geny metabolizmu podstawowego z promotorami typu GC (tj. z sekwencjami GC)	geny metabolizmu podstawowego z promotorami typu GC
mała liczba wysp CpG	duża liczba wysp CpG	bardzo duża liczba wysp CpG
stosunkowo bogate w AT, złożone z izochor L1 i L2	stosunkowo bogate w GC, złożone z izochor H1, H2 i H3	bardzo bogate w GC, złożone głównie z izochor H3
niski poziom acetylacji histonów	wysoki poziom acetylacji histonów	brak danych
liczne sekwencje powtarzające się bogate w AT np. Kpn	liczne sekwencje powtarzające się bogate w GC np. Alu	bardzo liczne sekwencje powtarzające się bogate w GC

chorach, szczególnie w H3 [7].

V. Pochodzenie i ewolucja wysp CpG

Poziom metylacji ma bezpośredni wpływ na liczbę dinukleotydów CpG w genomie zwierząt [105]. W genomach, gdzie metylacja jest znikoma lub nie wykrywalna, dinukleotyd CpG występuje na normalnym poziomie (np. u owadów). Jeśli genom uległ prawie całkowitej metylacji (np. u kręgowców, gdzie 98% genomu jest zmetylowane) poziom dinukleotydu CpG jest znacznie niższy od oczekiwanego. Jest też grupa zwierząt o cechach pośrednich (np. szkarłupnie), u których, przy częściowej metylacji genomu, obserwuje się nieduży deficyt dinukleotydu CpG [105a]. Wraz z obniżeniem poziomu dinukleotydu CpG u kręgowców poziom dinukleotydów TpG i CpA jest wyższy od oczekiwanego. Wynika to z mutacji zmetylowanej sekwencji CpG:CpG do TpG:CpA. Jedną z hipotez pochodzenia wysp CpG mówi, że mogą one reprezentować pozostałości długich niezmetylowanych odcinków DNA charakterystycznych dla bezkręgowców [25, 59]. Stopniowo niezmetylowana część genomu mogła maleć, aż do ograniczenia się do krótkich sekwencji u kręgowców, wysp CpG. Ważne jest to, że wysoki poziom niezmetylowanych CpG (choć nie wyższy od oczekiwanego na podstawie składu zasad) pozostał tylko w sekwencjach kodujących i regulatorowych (najczęściej promotor i pierwszy ekson) genów metabolizmu podstawowego i dużej części genów specyficznych tkankowo. Pozostałe sekwencje mają jedynie 20% wartości oczekiwanej dinukleotydu CpG. Wyspy CpG pozostały tylko w specyficznych regionach albo ze względu na selekcję skierowaną na ich

utrzymanie (przy braku selekcji w odniesieniu do części niekodującej), albo z powodu przeszkód uniemożliwiających zmetylowanie tych fragmentów DNA. Wydaje się, że wyspy pełnią ważne funkcje w genomie (tzw. „otwarta” struktura chromatyny, możliwość oddziaływań z białkami regulatorowymi) więc selekcja mogła odegrać pewną rolę w ich utrzymaniu.

Według Birda i Sveda obecny, niski poziom dinukleotydu CpG utrzymuje się na stałym poziomie i jest wynikiem równowagi istniejącej między utratą zmetylowanych CpG i pojawianiem się nowych dinukleotydów CpG [59]. Przykładem takiej równowagi mogą być zmiany obserwowane u człowieka w pseudogenie $\Psi\alpha 1$ globiny, który nie ma wyspy CpG podczas gdy występuje ona w funkcjonalnym genie $\alpha 1$ globiny. Ustalono, że z 70 dinukleotydów CpG obecnych w funkcjonalnym genie $\alpha 1$ globiny w pseudogenie pozostały jedynie 4, chociaż 3/4 sekwencji jest nie zmienione [59, 106]. Co ważne, w pseudogenie, w wyniku mutacji pojawiło się 8 nowych dinukleotydów CpG. U innych ssaków (szympan, pawian, królik) sekwencja $\alpha 1$ globiny jest bardziej zbliżona do sekwencji funkcjonalnego genu człowieka, a nie jego pseudogenu co wskazuje, że sekwencja bogata w CpG jest sekwencją pierwotną.

Mniej popularna jest hipoteza, według której wyspy CpG powstały jako wynik zmian składu nukleotydów w genomie w trakcie ewolucji kręgowców stałocieplnych [7]. Potwierdzać by to miała różnica w zawartości dinukleotydu CpG w homologicznych genach kręgowców stałocieplnych i zmiennocieplnych. Zmiennocieplne kręgowce charakteryzują się brakiem lub występowaniem bardzo nielicznych i nietypowych wysp CpG. Z uwagi na brak mechanizmów mogących

prowadzić do miejscowego wzrostu poziomu CpG wydaje się wątpliwe, by przodkowie kręgowców byli pozbawieni wysp CpG, a miały one powstać jako wynik lokalnego wzrostu zawartości nukleotydów G i C. Są jednak prace, których autorzy sugerują możliwość istnienia takich mechanizmów [107, 108].

Minęło ponad dziesięć lat od odkrycia wysp CpG w genomie kręgowców, wiedza na temat ich funkcji, powstania i ewolucji jest stale niewielka. Stosunkowo dobrze poznano ich właściwości i rozmieszczenie. Jako odcinki DNA o wyjątkowych cechach przyczyniły się one do rozwoju technik służących mapowaniu genów i tworzeniu map enzymów restrykcyjnych na dużych odcinkach genomu. Stały się dzięki temu jednym z „narzędzi” w największym międzynarodowym projekcie w dziedzinie genetyki molekularnej, którego celem jest uzyskanie pełnego opisu genomu człowieka poprzez jego mapowania i sekwencjonowania (ang. *Human Genome Project*).

Podziękowania

Pani dr A. Goc oraz Panu dr hab. J. Filipowskiemu serdecznie dziękuję za krytyczne przeczytanie manuskryptu.

Artykuł otrzymano 29 października 1996 r.
Zaakceptowano do druku 2 czerwca 1997 r.

Piśmiennictwo

- Cooper DN, Taggart MH, Bird AP (1983) *Nucl Acids Res* **11**: 647-658
- Brown WRA, Bird AP (1986) *Nature (Lond)* **322**: 477-481
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) *J Mol Biol* **196**: 261-282
- Tykocinski MI, Max EE (1984) *Nucl Acids Res* **12**: 4385-4396
- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller O, Macleod D (1985) *Cell* **40**: 91-99
- McClelland M, Ivarie R (1982) *Nucl Acids Res* **10**: 7865-7877
- Bernardi G (1995) *Annu Rev Genet* **29**: 445-476
- Craig JM, Bickmore WA (1994) *Nat Genet* **7**: 376-382
- Antequera F, Bird A (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11995-11999
- Tazi J, Bird A (1990) *Cell* **60**: 909-920
- Hebbes TR, Clayton AL, Thorne AW, Crane-Robinson C (1994) *EMBO J* **13**: 1823-1830
- Lee M-S, Garrard WT (1991) *EMBO J* **10**: 607-615
- Zlatanowa J, Van Holde K (1992) *J Cell Science* **103**: 889-895
- Juan L-J, Utley RT, Adams ChC, Vetteese-Dadey M, Workman JL (1994) *EMBO J* **13**: 6031-6040
- McArthur M, Thomas JO (1996) *EMBO J* **15**: 1705-1714
- Levine A, Yeivin A, Ben Asher E, Aloni Y, Razin A (1993) *J Biol Chem* **268**: 21754-21759
- Campoy FJ, Meehan RR, McKay S, Nixon J, Bird A (1995) *J Biol Chem* **270**: 26473-26481
- O'Neill LP, Turner BM (1995) *EMBO J* **14**: 3946-3957
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993) *Cell* **72**: 73-84
- Vetteese-Dadex M, Grant PA, Hebbes TR, Grane-Robinson C, Allis CD, Workman JL (1996) *EMBO J* **15**: 2508-2518
- Turner BM, O'Neill L (1995) *Cell Biol* **6**: 229-236
- Vanyushin BF, Tkacheva SG, Belozersky AN (1970) *Nature (Lond)* **225**: 948-949
- Grippo P, Iaccarino M, Parisi E, Scarano E (1968) *J Mol Biol* **36**: 195-208
- Bestor TH, Coxon A (1993) *Curr Biol* **3**: 384-386
- Clark SJ, Harrison J, Frommer M (1995) *Nat Genet* **10**: 20-27
- Bird AP (1987) *Trends Genet* **3**: 342-346
- Coulondre Ch, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W (1978) *Nature (Lond)* **274**: 775-780
- Miller JH, Lebkowski JS, Greisen KS, Calos MP (1984) *EMBO J* **3**: 3117-3121
- Cooper DN, Krawczak M (1989) *Hum Genet* **83**: 181-188
- Geen PM, Montandon AJ, Bentley DR, Ljung R, Nilsson MI, Giannelli F (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 3227-3231
- Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Richie AJ, Russell SEH (1995) *Cancer Res* **55**: 3406-3411
- Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, Harris CC (1994) *Cancer Res* **4**: 4855-4878
- Cooper DN, Youssoufian H (1988) *Hum Genet* **78**: 151-155
- Antri S, Mauffret O, Monnot M, Lescot E, Convert O, Femandjian S (1993) *J Mol Biol* **230**: 373-378
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) *Cell* **69**: 915-926
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) *Nature (Lond)* **366**: 362-365
- Riggs AD, Pfeifer GP (1992) *Trends Genet* **8**: 169-174
- Christophe D, Pichon B (1994) *Mol Cell Endocrin* **100**: 155-158
- Lewis J, Bird A (1991) *FEBS* **285**: 155-159
- Siegfried Z, Cedar H (1997) *Curr Biol* **7**: R305-R307.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992) *Cell* **69**: 905-914
- Tate PH, Bird AP (1993) *Curr Opin Genet Dev* **3**: 226-231
- Eden S, Cedar H (1994) *Curr Opin Genet Dev* **4**: 255-259
- Boyes J, Bird A (1992) *EMBO J* **11**: 327-333
- Bird A (1992) *Cell* **70**: 5-8
- Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP (1989) *Cell* **8**: 499-507
- Pieper RO, Patel S, Ting SA, Futscher BW, Costello JF (1996) *J Biol Chem* **271**: 13916-13924
- Migeon BR, Holland MM, Driscoll DJ, Robinson JC (1991) *Somat Cell Mol Genet* **17**: 159-168
- Ghazi H, Gonzales FA, Jones PA (1992) *Gene* **114**: 203-210
- Carotti D, Palitti F, Lavia P, Strom R (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 9219-9229
- Strom R, Santoro R, D'Erme M, Mastrantonio S, Reale A, Marenzi S, Zardo G, Caiafa P (1995) *Gene* **157**: 253-256
- Frank D, Keshet I, Shani M, Levine A, Razin A, Cedar H (1991) *Nature (Lond)* **351**: 239-241
- Choi A-Ch, Chae Ch-B (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 5538-5548
- Bird AP (1986) *Nature (Lond)* **321**: 209-213
- Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP (1994) *Genes Dev* **8**: 2282-2292
- Pfeifer GP, Tanguay RL, Steigerwald SD, Riggs AD (1990) *Genes Dev* **4**: 1277-1287
- Pfeifer GP, Riggs AD (1991) *Genes Dev* **5**: 1102-1113
- Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H (1994) *Nature (Lond)* **371**: 435-438
- Gundersen G, Kostø AB, Prydz H (1991) *FEBS* **295**: 214-218
- Silke J, Rother KI, Georgiev O, Schaffner W, Matsuo K (1995) *FEBS* **370**: 170-174
- Sved J, Bird A (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4692-4696
- Antequera F, Boyes J, Bird A (1990) *Cell* **62**: 503-514
- Cross SH, Bird AP (1995) *Curr Opin Genet Dev* **5**: 309-314
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST (1991) *Hum Mol Genet* **1**: 397-400
- Hansen RS, Gartler SM, Scott CR, Chen SH, Laird ChD (1992) *Hum Mol Genet* **1**: 571-578
- Ottaviano YL, Issa JP, Palr FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE (1994) *Cancer Res* **54**: 2552-2555
- Laird P, Jaenisch R (1994) *Hum Mol Genet* **3**: 1487-1495
- Laird P, Jackson-Grubbsy L, Fazeki A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch

- R (1995) *Cell* **81**: 197-205
67. Feinberg AP, Gehrke ChW, Kuo KC, Ehrlich M (1988) *Cancer Res* **48**: 1159-1161
 68. EL-Deiry W, Nelkin BD, Celano P, Yen R-WCh, Falco JP, Hamilton SR, Baylin SB (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3470-3474
 69. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC (1993) *Blood* **82**: 1820-1828
 70. Vorce RL, Goodman JI (1991) *J Toxicol Environ Health* **34**: 367-384
 71. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7416-7419
 72. Rideout III WM, Eversole-Cire P, Spruck III ChH, Hustad CM, Coetzee GA, Gonzales FA, Jones PA (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 6143-6152
 73. Vertino PM, Spillare EA, Harris CC, Baylin SB (1993) *Cancer Res* **53**: 1684-1689
 74. Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T (1993) *Oncogene* **8**: 1063-1067
 75. Vertino PM, Chiu Y R-W, Gao J, Baylin SB (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 4555-4565
 76. Gonzalez-Zulueta M, Bender ChM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA (1995) *Cancer Res* **55**: 4531-4535
 77. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Bruner JM, Saito Y, Zhang B, Zhang W, Levin VA, Yung WKA, Kyritsis AP (1996) *Oncogene* **13**: 1615-1619
 78. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995) *Nat Med* **1**: 686-692
 79. Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9821-9826
 80. Larsen F, Solheim J, Prydz H (1993) *Human Mol Genet* **2**: 775-780
 81. Barlow DP, Lehrach H (1987) *Trends Genet* **3**: 167-171
 82. Larsen F, Gundersen G, Prydz H (1992) *GATA* **9**: 80-85
 83. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H (1992) *Genomics* **13**: 1095-1107
 84. Shiraishi M, Lerman IS, Sekiya T (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4229-4233
 85. Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP (1994) *Nat Genet* **6**: 236-244
 86. Maestrini E, Tamanini F, Kioschis P, Gimbo E, Marinelli P, Tribioli C, D'Urso M, Palmieri G, Poustka A, Toniolo D (1992) *Hum Mol Genet* **1**: 275-280
 87. John RM, Robbins CA, Myers RM (1994) *Hum Mol Genet* **3**: 1611-1616
 88. Thäte C, Pongratz J, König A, Klamt B, Tsaousidou S, Higgins M, Shows T, Jones C, Gessler M (1995) *Mammalian Genome* **6**: 421-425
 89. Lee W-Ch, Salido E, Yen PH (1994) *Genomics* **22**: 372-376
 90. Tribioli C, Tamanini F, Patrosso C, Milanese L, Villa A, Maestrini E, Rivella S, Bione S, Pergolizzi R, Mancini M, Vezzioni P, Toniolo D (1992) *Nucl Acids Res* **20**: 727-733
 91. Rubertis F, Comincini S, Leone P, Rognoni G, Ferretti I (1993) *Animal Genet* **24**: 1-7
 92. Coleman MP, Németh AH, Campbell L, Raut ChP, Weissenbach J, Davies KE (1994) *Genomics* **21**: 337-343
 93. Valdes JM, Tagle DA, Collins FS (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5377-5381
 94. Lavia P, Macleod D, Bird A (1987) *EMBO J* **6**: 2773-2779
 95. Lindsay S, Bird AP (1987) *Nature (Lond)* **327**: 336-338
 96. Bernardi G, Mouchiroud D, Gautier Ch, Bernardi G (1988) *J Mol Evol* **28**: 7-18
 97. Aïssani B, Bernardi G (1991) *Gene* **106**: 173-183
 98. Cross S, Kovarik P, Schmidtke J, Bird A (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 1469-1474
 99. Filipinski J, Thiery J-P, Bernardi G (1973) *J Mol Biol* **80**: 177-197
 100. Bernardi G, Olofsson B, Filipinski J, Zerial M, Salinas J, Cuny G, Meunier-Rotival M, Rodier F (1985) *Science* **228**: 953-958
 101. Mouchiroud D, D'Onofrio G, Aïssani B, Macaya G, Gautier Ch, Bernardi G (1991) *Gene* **100**: 181-187
 102. Aïssani B, Bernardi G (1991) *Gene* **106**: 185-195
 103. Craig JM, Bickmore WA (1993) *BioEssays* **15**: 349-354
 104. Holmquist GP (1987) *Am J Hum Genet* **40**: 151-173
 105. Bird A (1980) *Nucl Acids Res* **8**: 1499-1504
 - 105a. Tweedie S, Charlton J, Clark V, Bird A (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 1469-1475
 106. Bird AP, Taggart MH, Nicholls RD, Higgs DR (1987) *EMBO J* **6**: 999-1004
 107. Brown TC, Jiricny J (1988) *Cell* **54**: 705-711
 108. Filipinski J, Salinas J, Rodier F (1989) *J Mol Biol* **206**: 563-566

NOWE WYDAWNICTWA PTBIOCH.:

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

Metabolizm fosforanowych pochodnych 8-oksy-2'-deoksyguanozyny

Metabolism of 8-oxo-2'-deoxyguanosine phosphates

KAROL BIAŁKOWSKI¹,
RYSZARD OLIŃSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. 8-Oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan (8-oxodGTP) — mutageny substrat w procesie syntezy DNA
- III. Enzymatyczny system obrony organizmów przed mutagennym wpływem oksydacji dGTP w pozycji C8: pirofosfohydrolaza 8-oxodGTP
III-1. Rodzina genów *mutT*
- IV. Metaboliczne losy fosforanów 8-oksydeoksyguanozyny
- V. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: 8-oxodG — 8-oksy-2'-deoksyguanozyna; 8-oxodGMP — 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforan; 8-oxodGDP — 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-difosforan; 8-oxodGTP — 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan; dG — deoksyguanozyna; CTP — cytydino-5'-trifosforan; dCTP — deoksycytydino-5'-trifosforan; UTP — urydino-5'-trifosforan; dUTP — deoksyurydino-5'-trifosforan; ATP — adenozy-5'-trifosforan; ADP — adenozy-5'-difosforan; dATP — deoksyadenozy-5'-trifosforan; dTTP — tymidino-5'-trifosforan; GTP — guanozy-5'-trifosforan; GDP — guanozy-5'-difosforan; RFT — reaktywne formy tlenu

I. Wstęp

Zagadnienia związane z destruktywnym wpływem reaktywnych form tlenu (RFT) na organizmy stały się w ostatnich latach obiektem szeroko zakrojonych i intensywnych badań. Omówienie zagadnień związanych z powstawaniem i reaktywnością różnych RFT *in vivo*, znajdzie czytelnik *Postępów Biochemii* w dwu pracach Liczmańskiego [1, 2]. Jednym z najmniej bezpieczniejszych efektów działania RFT w komórce są uszkodzenia DNA. Znaczenie oksydacyjnych uszkodzeń zasad DNA przez reaktywne formy tlenu

Contents:

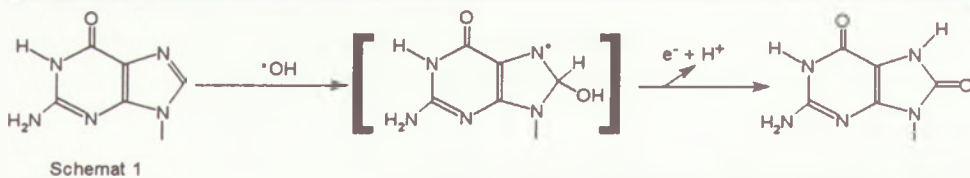
- I. Introduction
- II. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxodGTP) — mutagenic substrate for DNA synthesis
- III. Enzymatic defense system of the organisms againsts the mutagenic influence of dGTP oxidation at C8 position: 8-oxodGTP pyrophosphohydrolase
III-1. Family of *mutT* genes
- IV. Metabolic fate of 8-oxodeoxyguanosine phosphates
- V. Concluding remarks

oraz procesy naprawy tych uszkodzeń były już opisane na łamach *Postępów Biochemii* [3, 4].

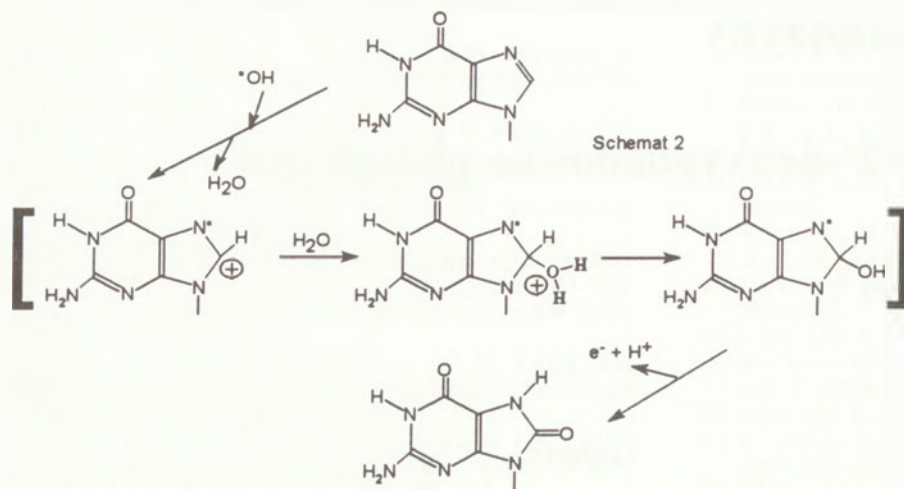
8-Oksyguanina jest jednym z najłatwiej powstających i najgruntowniej przebadanych produktów modyfikacji zasad DNA przez reaktywne formy tlenu. Najlepiej rozpoznany czynnikiem powodującym przekształcenie guaniny w 8-oksyguaninę jest rodnik hydroksylowy. Potencjalne mechanizmy takiej reakcji przedstawiono na rycinie 1. Pierwszy z tych mechanizmów zakłada bezpośrednie formowanie adduktu rodnika hydroksylowego z guaniną w pozycji C8, drugi zaś, jako etap początkowy zakłada oderwanie elektronu od cząsteczki guaniny pod wpływem rodnika hydroksylowego. Należy zaznaczyć, iż do początkowego oderwania elektronu z cząsteczki guaniny (Ryc. 1, Schemat 2) może dochodzić nie tylko pod wpływem rodnika hydroksylowego, ale także na skutek jonizacji spowodowanej oddziaływaniem kwantu promieniowania jonizującego lub na skutek kontaktu z równie silnym jak rodnik hydroksylowy utleniaczem, np. rodnikiem ferrylowym lub nadferrylowym [5, 6]. Pojawiły się także dane przemawiające za tym, iż takie oderwanie elektronu z cząsteczki Gua może zachodzić pod wpływem fotouczulaczy w reakcji fotouczulania typu I [7-9].

Kolejnym czynnikiem zdolnym do wprowadzenia oksydacyjnej modyfikacji guaniny w pozycji C8 jest

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



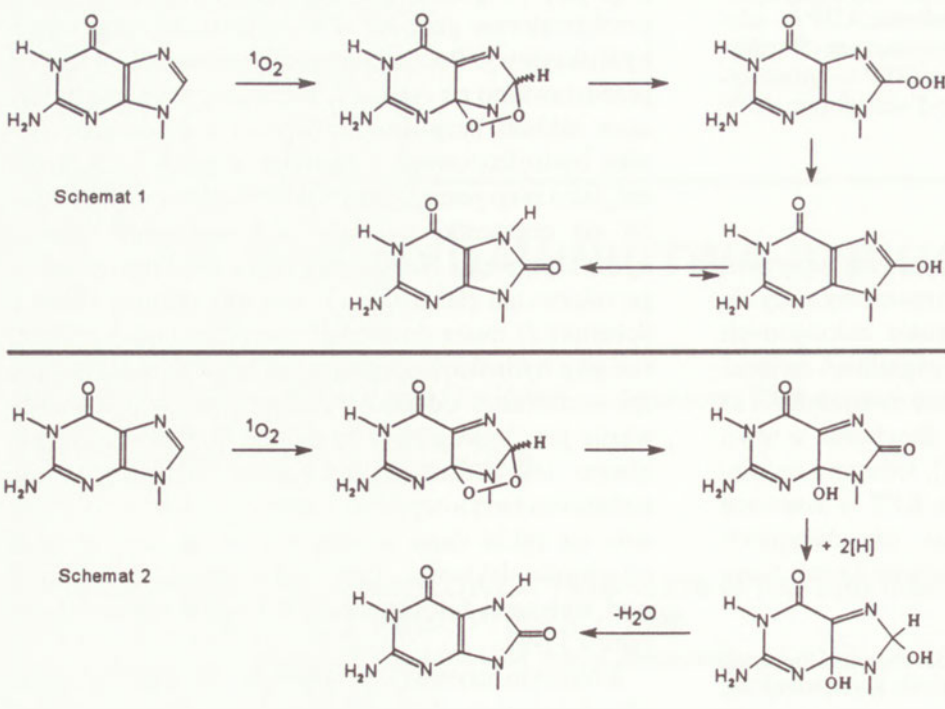
Ryc. 1. Potencjalne mechanizmy powstawania 8-oksygwaniny pod wpływem rodnika hydroksylowego.



tlen singletowy — $^1\text{O}_2$ [10-15]. Najprawdopodobniej reakcja reszty guanyliny z tlenem singletowym zachodzi z wytworzeniem przejściowego 4,8-endonadtlenku, który szybko ulega rozpadowi. Dwa możliwe szlaki prowadzące do powstania 8-oksygwaniny w reakcji z $^1\text{O}_2$ przedstawiono na rycinie 2. Niektórzy autorzy sugerują również możliwość odrywania elektronu od reszty guanyliny przez tlen singletowy z wytworzeniem kationowego rodnika guanyliny i anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{Gua} + ^1\text{O}_2 \rightarrow \text{Gua}^{\bullet+} + \text{O}_2^{\bullet-}$) [16]. W takiej sytuacji oksydacja do 8-oksygwaniny zachodziłaby według schematu 2 przedstawionego na rycinie 1.

II. 8-Oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforam — mutageny substrat w procesie syntezy DNA

Oksydacyjna modyfikacja guanyliny w pozycji C8 może zachodzić nie tylko w obrębie kwasów nukleinowych, ale równie dobrze może dotyczyć reszt guanyliny wchodzących w skład wolnych nukleozydów i nukleotydów komórkowych. Wykazano, że produkt modyfikacji dGTP-8-oxodGTP jest substratem polimeraz DNA, inkorporujących 8-oxodGMP do nowosyntetyzowanych nici DNA [17, 18]. Taka inkorporacja zmodyfikowanego nukleotydu do DNA jest źródłem



Ryc. 2. Proponowane mechanizmy modyfikacji guanyliny przez tlen singletowy, prowadzącej do powstania 8-oksygwaniny.

Pierwszym produktem reakcji tlenu singletowego z guanią jest nietrwały 4,8-endonadtlenek guanyliny. Schemat 1 zakłada późniejsze przekształcenie endonadtlenku w 8-wodoronadtlenek guanyliny, który ulega rozpadowi do 8-oksygwaniny. Schemat 2 zakłada przekształcenie 4,8-endonadtlenku guanyliny do 4-hydroksy-8-oksygwaniny, która w procesie redukcji i odłączenia cząsteczki wody ulega przekształceniu do 8-oksygwaniny.

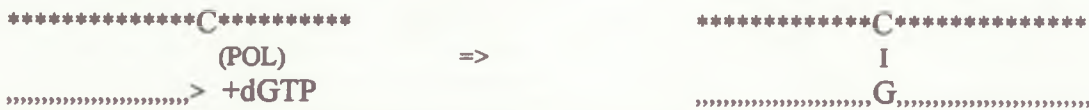
Pierwsza runda replikacyjna



Druga runda replikacyjna



Trzecia runda replikacyjna



Ryc. 5. Prawdopodobny mechanizm powstawania transwersji GC => TA pod wpływem 8-oxodGTP.

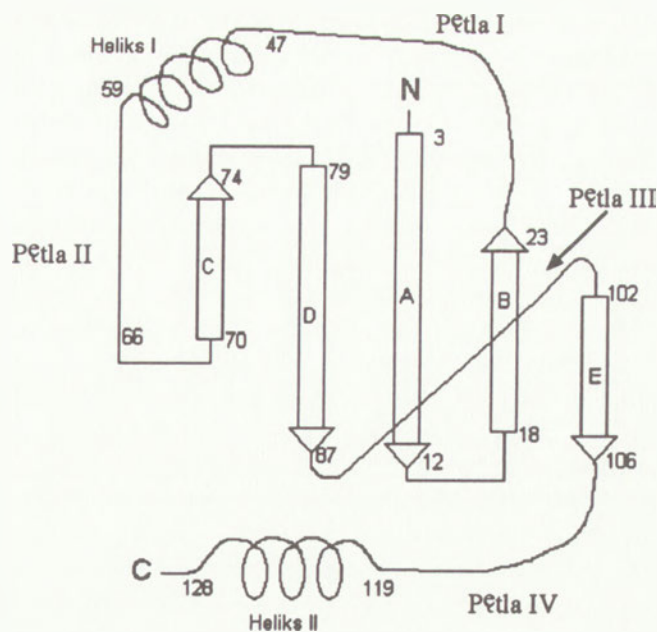
8-oxodGTP może zostać wprowadzony przez polimerazę (POL) do syntetyzowanej nici DNA na przeciw cytozyny znajdującej się w nici matrycowej. Prowadzi to do powstania dwuniciowego DNA zawierającego parę cytozyna : 8-oksoguanina. Jeżeli 8-oksoguanina nie zostanie usunięta przez enzymy naprawy DNA, to po replikacji nici zawierającej 8-oksoguaninę dojść może do powstania dwuniciowego DNA zawierającego błędną parę 8-oksoguanina : adenina. Adenina pojawia się więc w miejscu, gdzie pierwotnie w sekwencji znajdowała się guanina. Kolejny proces replikacji prowadzi do powstania dwuniciowej cząsteczki DNA obciążonej mutacją punktową (GC => TA).

III. Enzymatyczny system obrony organizmów przed mutagennym wpływem oksydacji dGTP w pozycji C8: pirofosfohydrolaza 8-oxodGTP

W 1954 roku Treffers i wsp. otrzymali linię zmutowanych komórek *E. coli*, charakteryzującą się wysoką częstością mutacji spontanicznych w porównaniu do komórek dzikiej linii i postulowali istnienie genu odpowiedzialnego za tę cechę, który nazwali *mutT* [20]. W ten sposób odkryto pierwszy tzw. gen mutatorowy u *E. coli*. Dwanaście lat później Yanofksy i wsp. wykazali, iż wysoka niestabilność genetyczna linii *mutT* związana jest z podwyższeniem częstości występowania tylko jednego rodzaju mutacji punktowych, mianowicie transwersji typu AT => CG [21]. W celu zidentyfikowania biologicznych funkcji produktu genu *mutT* dzikiej linii, gen ten sklonowano, jego produkt białkowy nazwany białkiem MutT (129 reszt aminokwasowych, 14.9 kDa) oczyszczono do stanu homogenności i zidentyfikowano jako fosfohydrolazę ośmiu podstawowych trifosfonukleozydów występujących w komórkach (dCTP, GTP, dTTP, UTP, dCTP, CTP, dATP, ATP), o wyraźnej preferencji wobec dGTP [22]. Porównanie sekwencji zmutowanego i dzikiego genu *mutT* wykazało, iż mutacja tego genu polega na insercji tzw. elementu IS1 [23]. Białko MutT (produkt genu dzikiego) katalizuje reakcję hydrolizy trifosfonukleozydów do monofosfonukleozydów i pirofosforanu [24]. Niedługo potem pirofosfataza ta została wykrystalizowana [25], co dało początek wnikliwym badaniom struktury enzymu. Rok 1991 dostarczył wielu danych na temat właściwości katalitycznych odkrytej pirofosfatazy [24]. Wyznaczono op-

timum pH (pH 9.0) dla katalizowanej reakcji i wykazano jej całkowitą zależność od jonów magnezu (w obecności innych dwuwartościowych jonów metali, jak Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , aktywność nie przekraczała 15% aktywności uzyskiwanej z jonami Mg^{2+}). Gruntowna analiza specyficzności substratowej z użyciem wszystkich ośmiu kanonicznych trifosfonukleozydów oraz ich pochodnych wykazała, że najlepszymi substratami białka MutT są kolejno dGTP ($K_m = 1.5$ mM) >> GTP > dUTP > dCTP (2.2 mM). Badania te wskazały, że szczególnie istotną cechą dobrego substratu białka MutT jest obecność grupy 6-keto i 2-amino w pierścieniu purynowym oraz deoksyryboza występująca w nukleotydzie. Wykazano ponadto, że wszystkie 8-bromopochodne trifosfonukleozydów purynowych (8-Br-dGTP, 8-Br-GTP, 8-Br-dATP, 8-Br-ATP) są zdecydowanie lepszymi substratami białka MutT niż odpowiednie związki wyjściowe. Na tym etapie badań sformułowano również pierwsze hipotezy dotyczące antymutagennego działania białka MutT. Istniały już pewne przesłanki na temat mechanizmu transwersji AT => CG powstających z dużą częstością w mutantach *mutT* *E. coli*. Przepuszczano, że transwersje te są efektem błędnego parowania (ang. *mismatch*) adeniny w nici matrycowej, z dGTP inkorporowanym do nici syntetyzowanej (A : T → A ~ G → C : G). Wcześniejsze doniesienia sugerowały, że guanina sparowana z adeniną w obrębie dwuniciowego fragmentu polinukleotydowego przyjmuje konformację *syn* względem deoksyrybozy. Postulowano więc, że rolą białka MutT jest hydroliza tych cząsteczek dGTP, które przybrały konformację *syn*, by uniemożliwić ich wprowadzanie do DNA na przeciw adeniny. Hipotezę tę wspierał mocno wspomniany wcześniej fakt, iż

bromowanie purynowych trifosfonukleozydów w pozycji C8 czyni je lepszymi substratami białka MutT, a jak było wiadomo, bromowanie takie wymusza konformację *syn* w obrębie modyfikowanego nukleotydu. Rok 1992 nieoczekiwanie dostarczył rewelacyjnych odkryć w tym zakresie. Maki i Sekiguch (1992) donoszą o swoich badaniach nad antymutagennym działaniem białka MutT [18]. Badali oni inkorporację znakowanego dGTP do matrycy poli(dA)/oligo(dT) pod wpływem polimerazy III *E. coli* i potwierdzili wcześniejsze spostrzeżenia, że niewielkie ilości znakowanego dGMP są wprowadzane do nici syntetyzowanej na matrycy poli(dA). Enzym MutT dodany do medium, w którym zachodziła replikacja hamował całkowicie tę inkorporację. Wykonano analizę chromatograficzną nukleotydów wchodzących w skład zsyntetyzowanej nici i okazało się, że radioaktywność niesiona przez nią nie należy wcale do dGMP, a do związku zidentyfikowanego jako 8-oxidGMP. Otworzyło to nowy etap w badaniach nad białkami MutT i przyciągnęło uwagę wielu badaczy zajmujących się stresem oksydacyjnym, a szczególnie oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA. Jak dowiedli Maki i Sekiguch, MutT posiada bardzo wysokie powinowactwo do 8-oxidGTP ($K_m = 0.4 \mu\text{M}$!). Pozwala to sądzić, że jego rola polega na hydrolizowaniu tego nukleotydu w celu uchronienia komórki przed mutagennymi skutkami jego wprowadzenia do DNA. Dla porównania, oznaczone przez nich wartości K_m wobec innych nukleotydów wynosiły: dla dGTP — 1.2 mM, dTTP — 1.8 mM, dCTP — 1.7 mM, GTP 1.2 mM. 8-OxidGTP jako substrat posiada wszystkie preferowane przez MutT cechy: grupę 6-keto i 2-amino pierścienia purynowego, deoksyrybozę i konformację *syn* wokół wiązania N-glikozydowego, wymuszoną przez atom tlenu w pozycji C8. Badania ostatnich 3 lat prowadzone technikami krystalograficznymi, a przede wszystkim metodami wielowymiarowego jądrowego rezonansu magnetycznego doprowadziły do szczegółowego rozpoznania struktury drugo- (Ryc. 6) i trzeciorzędowej MutT [26-28] oraz budowy centrum aktywnego enzymu i jego oddziaływań z substratem [29, 31]. Trifosforany nukleozydów oddziałują z centrum aktywnym enzymu w obecności dwu jonów magnezu. Jeden z tych jonów związany jest z atomami tlenu reszt fosforanowych β i γ nukleotydu. Drugi jon Mg^{2+} oddziałuje z grupami karboksylowymi reszt glutaminianu 56, 57, 98, amidową grupą karbonylową glicyny 38 oraz z cząsteczką wody, która najprawdopodobniej dokonuje nukleofilowego ataku na atom fosforu β , powodując rozerwanie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy resztą fosforanową α i β nukleozydotrifosforanu. Odpowiednią orientację przestrzenną atakującej cząsteczki wody zapewnia najprawdopodobniej jej oddziaływanie z grupą karboksylową glutaminianu 53. Zasada azotowa oraz reszta rybozy lub deoksyrybozy wchodzące w skład substratu lokują się w hydrofobowej szczelinie, przy czym zasada azotowa wiąże się



Ryc. 6. Zarys struktury drugorzędowej białka MutT z *E. coli*. W obrębie białka MutT występują dwa rejony α -helikalne (Heliks I i II) oraz pięć pasm zorganizowanych w strukturę β oznaczonych strzałkami A-E. Pasma A i B oraz C i D połączone są ciasnymi skrętami, co umożliwia ich antyrównoległe ułożenie. Pozostałe wymienione struktury połączone są dłuższymi pętlami (I-IV) o długości od 13 do 24 aminokwasów. Numerami oznaczone orientacyjne położenie kolejnych aminokwasów łańcucha polipeptydowego (wzorowano na rysunku zamieszczonym w pracy A beygunawardana i wsp., 1993 [26]).

z leucyną 4, izoleucyną 6 i 80. Grupa ketonowa w pozycji C6 zasady azotowej oddziałuje z grupą-NH₂ łańcucha bocznego asparaginy 119, co tłumaczy duże powinowactwo enzymu do nukleotydów zawierających guaninę lub jej pochodne. Reszta (deoksy)rybozy wchodząca w skład nukleotydu oddziałuje z leucyną 4, izoleucyną 6 oraz z łańcuchem bocznym lizyny 39.

W ślad za badaniami nad pirofosfatazą 8-oxidGTP (MutT) z *E. coli* rozpoczęły się badania nad homologicznymi enzymami z innych organizmów. W 1992 roku M o i w s p. wyizolowali z komórek ludzkich enzym o masie cząsteczkowej 18 kDa specyficznie hydrolizujący 8-oxidGTP do 8-oxidGMP ($K_m = 8,5 \mu\text{M}$), a słabiej dGTP ($K_m = 870 \mu\text{M}$) i dATP [32]. Podobnie jak MutT, pirofosfataza ta jest zależna od jonów magnezu. Rok później ustalono częściowo jej sekwencję aminokwasową, co pozwoliło na sklonowanie i ekspresję genu kodującego to białko w komórkach *E. coli* [33]. Gen ludzkiej pirofosfatazy 8-oxidGTP, zajmujący locus 7p22 [34], koduje białko składające się ze 156 aminokwasów (masa cząsteczkowa 17.9 kDa), a jego sekwencja nukleotydoma wykazuje duże podobieństwo do bakteryjnego genu *mutT* w centralnej części otwartej ramki odczytu. W języku aminokwasów oznacza to 15 identycznych aminokwasów w odcinku A37-A61 MutT i A36-A60 pirofosfatazy ludzkiej. Enzym ludzki uznano za homolog białka MutT i nazwano go hMTH1 (*Human MutT Homolog*).

W ostatnim czasie sklonowano homologi genu *mutT* z innych źródeł; tzw. białko MutX ze *Streptococ-*

cus pneumoniae wykazuje analogiczne aktywności enzymatyczne jak MutT, jest jednak homotrimerem o masie 54 kDa (masa cząsteczkowa monomeru — 18 kDa). Gen kodujący to białko wykazuje duże podobieństwo do genu *mutT* w odcinku kodującym aminokwasy A37-A60 [35, 36]. Podobną homologię struktury genu i funkcji biologicznych kodowanego białka wykazano w przypadkach genu i białka MutT z *Proteus vulgaris* (112 aminokwasów, 12,8 kDa) [37] i MutT z *Haemophilus influenzae* (136 aminokwasów, 15,6 kDa) [38]. Sklonowano również homologi genu *mutT* myszy i szczura i scharakteryzowano ich produkty białkowe jako pirofosfatazy 8-oxodGTP. Mysia pirofosfataza 8-oxodGTP, to białko o masie cząsteczkowej 17,9 kDa (156 aminokwasów) wykazująca 83% homologii sekwencji aminokwasowej z ludzką pirofosfatazą, a podobieństwo sekwencji nukleotydu myśięgo i ludzkiego genu sięga 81% [39]. Szczurza pirofosfataza 8-oxodGTP (masa cząsteczkowa 18 kDa) posiada 131 identycznych aminokwasów z enzymem ludzkim z ogólnej liczby 156 aminokwasów [40].

Pojawiły się także pierwsze dane na temat poziomu ekspresji genu kodującego pirofosfatazę 8-oxodGTP w różnych narządach wewnętrznych ssaków. Uzyskanie przeciwciał poliklonalnych do konserwatywnego ewolucyjnie fragmentu pirofosfatazy 8-oxodGTP umożliwiło ilościową analizę poziomu ekspresji tego enzymu w tkankach mysich [39]. Relatywnie najwyższy poziom białka pirofosfatazy wykazano w wątrobie i grasicy, niższy poziom występuje w innych narządach: jelicie grubym > jądrach > nerkach > śledzionie > żołądku > płucach > sercu > i mózgu. Zdecydowanie najwyższy poziom białka pirofosfatazy 8-oxodGTP stwierdzono jednak w mysich embrjonalnych komórkach pnia, przewyższał on sześciokrotnie poziom obserwowany w wątrobie. Potwierdziło to wcześniejszą tezę, że poziom ekspresji genu kodującego tę pirofosfatazę jest najwyższy w komórkach o charakterze embionalnym (m.in. nowotworowych, z których po raz pierwszy wyizolowano ssaczy homolog MutT). Skonstruowanie znakowanej sondy opartej na antysensownym RNA pozwoliło na kolorymetryczną ocenę ilości mRNA ludzkiej pirofosfatazy w histologicznych skrawkach ludzkiej skóry i sutka [41]. Stwierdzono duże zróżnicowanie poziomu mRNA_{hMTH1} w zależności od rodzaju komórek, spośród których największą jego ilość wykazywały komórki charakteryzujące się dużym tempem podziałów mitotycznych. Z kolei w tkankach szczurzych badano ilość transkryptu genu pirofosfatazy 8-oxodGTP (mRNA) i wykazano jego największą produkcję w tkance serca, śledziony, nerki i jąder [40].

Przeprowadzono również pierwsze badania dotyczące subkomórkowej lokalizacji ludzkiej pirofosfatazy 8-oxodGTP [42]. Ustalono, że enzym zlokalizowany jest w cytoplazmie i mitochondriach. Z całkowitej aktywności komórkowej pirofosfatazy 8-oxodGTP 4% zlokalizowano w mitochondriach. Aktywności spe-

cyficzne enzymu w przeliczeniu na mg białka są jednak identyczne w obu tych kompartmentach komórkowych. Jednocześnie nie stwierdzono jakichkolwiek różnic dotyczących cech fizyko-chemicznych enzymu mitochondrialnego i cytosolowego; kwestia transportu enzymu do mitochondrium pozostaje nadal niewyjaśniona.

Groźne skutki mutacji w obrębie genów z rodziny *mutT* zaczęły przyciągać uwagę badaczy procesów nowotworzenia. Warunkiem transformacji nowotworowej komórki jest powstanie mutacji w wielu genach. Mutacja genu — homologu *mutT*, prowadząca do braku w komórce aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP, mogłaby w sposób bardzo istotny przyspieszać tempo powstawania mutacji w innych genach, z uwagi na drastyczny wzrost częstości transwersji typu AT ⇒ CG.

W u i w s p. [43] badali sekwencję nukleotydu genu hMTH1 (homologu MutT) w genomie ludzkich komórek nowotworowych raka jelita grubego i porównywali je z sekwencjami nukleotydu genu zdrowych komórek tej samej tkanki. Przebadano 32 przypadki, lecz nie stwierdzono różnic pomiędzy sekwencjami nukleotydu genu w komórkach nowotworowych i odpowiadających im komórkach zdrowych. Przy okazji wykazano istnienie polimorfizmu genu hMTH1 w populacji ludzkiej. W dziewięciu przypadkach stwierdzono tranzycję G ⇒ A w obrębie kodonu 83, która prowadzi do zmiany waliny na metioninę w pirofosfatazie 8-oxodGTP (tranzycję taką odnotowali autorzy także w genach hMTH1 ludzi zdrowych). Rzadziej obserwowano tranzycję C ⇒ T w obrębie kodonu 119, która jednak nie prowadzi do zmiany aminokwasu w białkowym produkcie genu. O k a m o t o i w s p. [44] porównywali poziom mRNA_{hMTH1} w ludzkiej tkance raka nerki i otaczającej ją tkance nie zmienionej nowotworowo. Stwierdzono zdecydowanie wyższy poziom transkrypcji genu hMTH1 w komórkach nowotworowych. W kontekście znaczenia — homologów genu *MutT* w procesach mutagenyzy i karcinogenezy rozpoczęto poszukiwania potencjalnych inhibitorów pirofosfatazy 8-oxodGTP wśród znanych czynników rakotwórczych. Wykazano na przykład, iż jony niklu (II) — dobrze udokumentowany karcinogen — są niekompetywnym inhibitorem ($K_i = 0,9 \text{ mM}$) bakteryjnej pirofosfatazy 8-oxodGTP z *E. coli*, co wykazano w doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro*, z użyciem oczyszczonego preparatu enzymu [45].

III-1. Rodzina genów MutT

Oprócz przedstawionych powyżej genów kodujących pirofosfohydrolazy o dużej specyficzności wobec 8-oxodGTP, do tzw. rodziny genów i białek *mutT/MutT* zakwalifikowano również odkryte ostatnio geny kodujące enzymy o nieco innej specyficzności substratowej. Zaliczono do tej rodziny pirofosfatazę

dinukleotydom z *E. coli* [46], zależną od dwuwartościowych jonów metali i wykazującą wysoką specyficzność substratową wobec NADH (257 aminokwasów, 29.8 kDa, natywnie — homodimer). Katalizuje ona hydrolizę NADH do AMP i zredukowanego mononukleotydu nikotynamidoadeninowego. Do rodziny MutT zakwalifikowano również pirofosfohydrolazę diadenozyno-5',5''-P¹,P⁴-tetrafosforanu (16.8 kDa, 147 aminokwasów), hydrolizującą ten związek do AMP i ATP [47]. Zidentyfikowano także produkt genu orf1.9 *E. coli*, w którym doszukano się charakterystycznej dla rodziny MutT sekwencji aminokwasów [48]. Białko to charakteryzuje aktywność specyficzna hydrolazy GDP-mannozy (guanozyno-5'-difosfo- α -D-mannozy) i GDP-glukozy (guanozyno-5'-difosfo- α -D-glukozy). Produktami reakcji przezeń katalizowanej jest GDP oraz wolny cukier. Aktywność jej jest całkowicie zależna od obecności dwuwartościowych jonów metali.

Wszystkie opisane dotychczas geny szeroko pojmowanej rodziny mutT kodują białka zawierające charakterystyczny motyw w sekwencji aminokwasów [46, 49]:

GXU(X)₃ET(X)₆RE⁺UXEE*, gdzie E oznacza kwas glutaminowy, G — glicynę, R — argininę, T — treoninę, U oznacza leucynę lub izoleucynę, lub walinę, a X — dowolny aminokwas.

Uważa się, że konserwatywne aminokwasy tego unikalnego motywu odpowiadają za wiązanie nukleotydowego substratu w centrum aktywnym i hydrolizę pochodnych nukleotydowych. Funkcją skrajnych reszt kwasu glutaminowego konserwatywnej sekwencji (pozycja 56 i 57 w białku MutT z *E. coli*), oznaczonych gwiazdką, jest wiązanie jonu magnezu w centrum aktywnym [31, 50]. Aktywność enzymatyczna zmutowanego enzymu, zawierającego w pozycji 57 glutaminę zamiast kwasu glutaminowego jest 100 tys. razy niższa, niż aktywność nie zmutowanej wersji białka. Reszta kwasu glutaminowego oznaczona plusem oddziałuje z cząsteczką wody rozrywającą wiązanie fosfodiesterowe substratu.

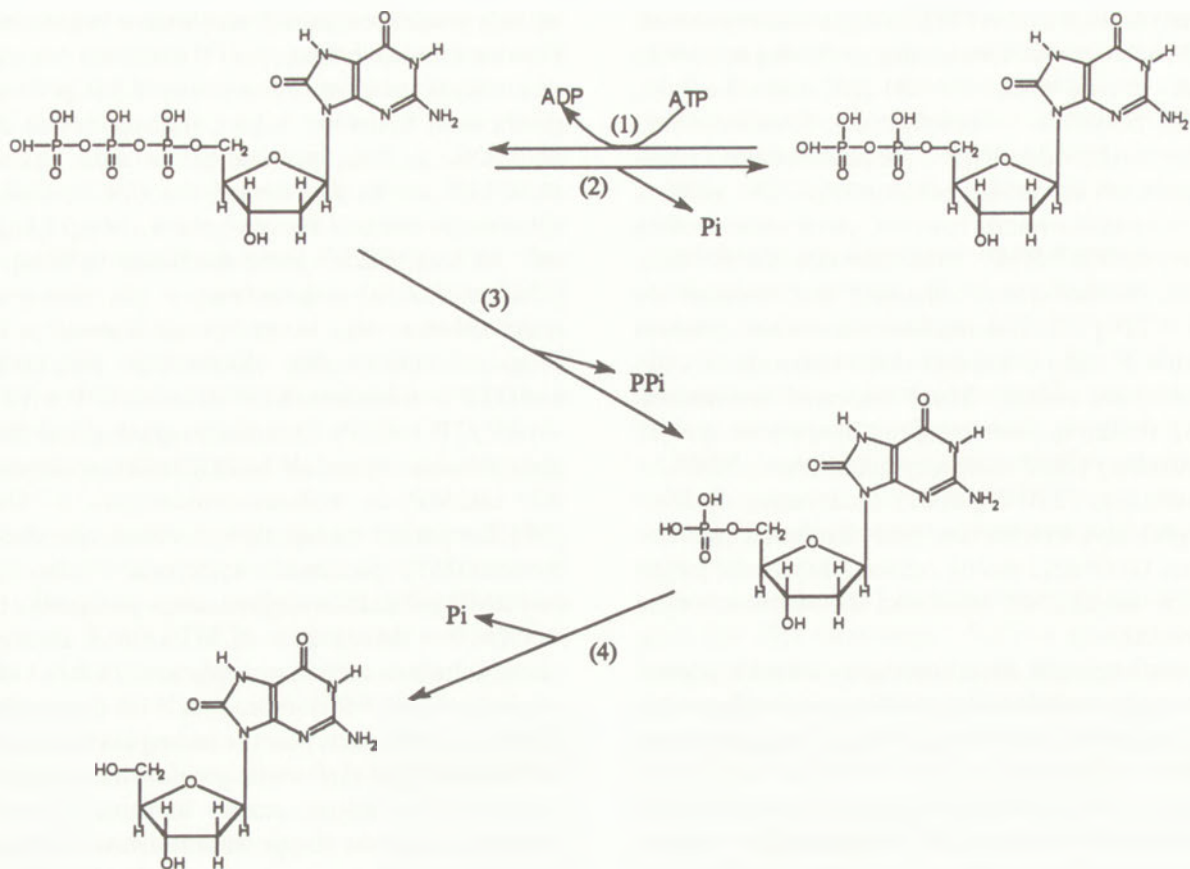
IV. Metaboliczne losy fosforanów 8-oksyo-deoksyguanozyny

Scharakteryzowana powyżej pirofosfataza 8-oxodGTP nie jest jedynym enzymem zdolnym do hydrolizowania wiązań fosfodiesterowych tego zmodyfikowanego nukleotydu. We wszystkich dotychczas badanych organizmach, aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP towarzyszy aktywność fosfatazy 8-oxodGTP, która hydrolizuje ten substrat do 8-oxodGDP i ortofosforanu [18, 32, 39, 40 oraz nie opublikowane obserwacje własne]. Ponieważ jednak enzym ten hydrolizuje z większą wydajnością dGTP niż 8-oxodGTP [32], dotychczas nie przyciągnął on uwagi badaczy i pozostaje w cieniu bardzo popularnej pirofosfatazy. Wydaje się, że znaczenie metaboliczne

tej aktywności jest jednak niesłusznie bagatelizowane. Poddanie bowiem 8-oxodGTP działaniu homogenatu szczerzej tkanki wątrobowej w pH 8.0 prowadzi do gwałtownej hydrolizy tego związku właśnie do 8-oxodGDP, a ilość powstałego w tym czasie 8-oxodGMP jest bardzo nieznaczna (nie opublikowane obserwacje własne). H a y a k a w a i w s p. [51] wykazali, że 8-oxodGTP jest substratem ludzkiej kinazy difosfonukleozydowej, enzymu o szerokiej specyficzności substratowej, który oprócz klasycznych difosforanów nukleozydów fosforyluje wydajnie 8-oxodGTP z udziałem ATP (8-oxodGTP + ATP → 8-oxodGTP + ADP). Ci sami autorzy podczyścili i wstępnie scharakteryzowali ludzką fosfatazę degradującą 8-oxodGMP do wolnego nukleozydu — 8-oxodG [51]. Enzym ten wadaje się być wysoce specyficzny dla 8-oxodGMP, ponieważ wydajność hydrolizy 8-oxodGMP jest daleko większa, niż w przypadku dGMP > dTMP > dAMP >> dCMP i GMP. Donoszą oni także, iż ludzka kinaza guanylanowa, która katalizuje zależną od ATP fosforylację dGMP do dGDP oraz GMP do GDP, nie wykazuje żadnej aktywności wobec 8-oxodGMP. W tym sensie pirofosfataza 8-oxodGTP jawi się jako jedyny enzym kierujący 8-oxodGTP nieodwracalnie na drogę katabolizmu. Zawilości losów metabolicznych 8-oksyo pochodnych nukleotydów deoksyguanozynowych naszkicowano na rycinie 7.

8-Oksyo-2'-deoksyguanozyna (8-oxodG), która jest wydalana z moczem przez organizmy ssaków [52], jest powszechnie uznawana za marker oksydacyjnych uszkodzeń DNA i traktowana jako specyficzny produkt naprawy DNA, choć jak dotychczas nie opisano enzymu, który byłby zdolny do specyficznego wycinania tego uszkodzenia w postaci wolnego nukleozydu lub fragmentu oligonukleotydowego. Z uwagi na istnienie w układach biologicznych wysoce specyficznych enzymów defosforylujących pochodne fosforanowe 8-oxodG, należy brać pod uwagę możliwość, iż pewna część puli 8-oxodG wydalanego z moczem pochodzi z degradacji nukleotydów powstających na skutek oksydacyjnej modyfikacji fosforanów deoksyguanozyny. Do chwili obecnej jednak nie przedstawiono bezpośrednich dowodów na obecność którejkolwiek z pochodnych fosforanowych 8-oxodG w puli wolnych nukleotydów komórkowych, choć ich powstawanie jest wielce prawdopodobne.

Mocz ssaków zawiera także wolną 8-oksyo guaninę [53], która jest produktem naprawy DNA powstającym na skutek działania kilku scharakteryzowanych enzymów usuwających tę zasadę z DNA. B e s s h o i w s p. zidentyfikowali w tkankach ludzkich enzymy o takiej aktywności [54]. Jeden z nich wykazuje jedynie aktywność N-glikozylazy i uwalnia 8-oxoGua pozostawiając miejsce apurynowe, drugi oprócz aktywności N-glikozylazowej przejawia także aktywność endonukleolityczną. Również ludzka N-metylopuryna — DNA glikozylaza wykazuje zdolność usuwania 8-oksyo guaniny z DNA [55]. Enzymy reperujące ok-

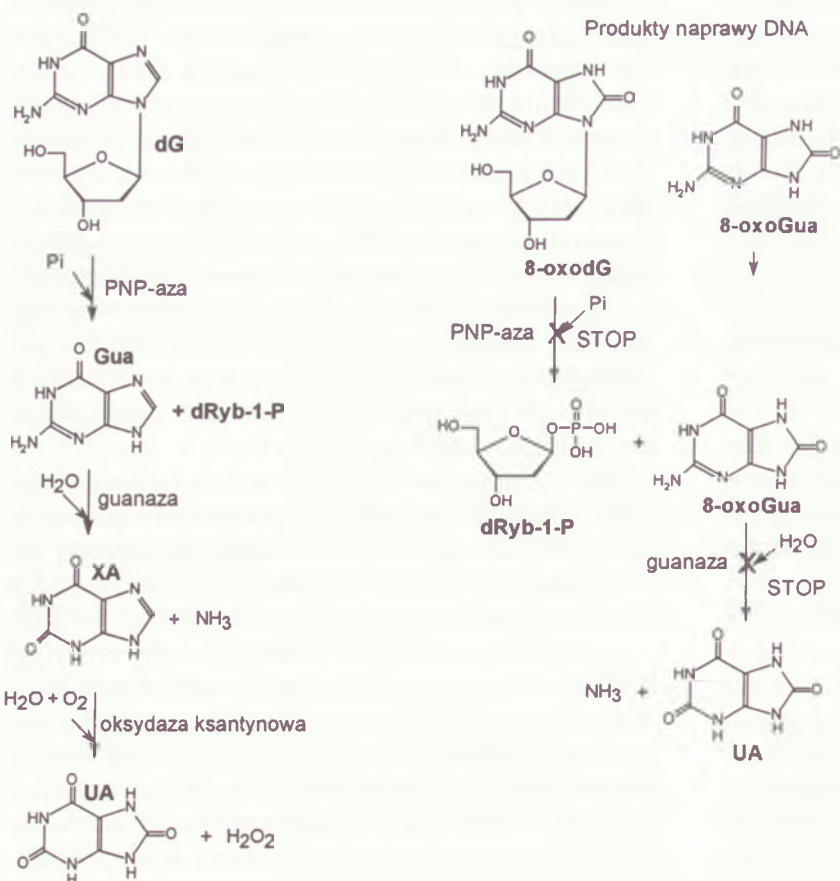


Ryc. 7. Szlak przemian metabolicznych 8-oksyo-2'-deoksyguanozy-5'-trifosforanu.

Pi — ortofosforan, PPi — pirofosforan, ATP — adenozy-5'-trifosforan, ADP — adenozy-5'-difosforan, (1) — kinaza difosfonukleozydowa, (2) — fosfataza 8-oksyo-2'-deoksyguanozy-5'-trifosforanu, (3) — pirofosfataza 8-oksyo-2'-deoksyguanozy-5'-trifosforanu (białko hMTH1, homolog MutT), (4) — fosfataza 8-oksyo-2'-deoksyguanozy-5'-monofosforanu

sydacyjnej uszkodzenia DNA omówiono niedawno na

łamach *Postępy Biochemii* [4]. Najprawdopodob-



Ryc. 8. Szlak katabolizmu deoksyguanozy (z lewej), z charakterystycznym dla naczelnych, ptaków, gadów i owadów końcowym produktem katabolizmu — kwasem moczowym. Potencjalne etapy katabolizmu 8-oksyo-2'-deoksyguanozy i 8-oksyo-guaniny, którym te cząsteczki nie podlegają (z prawej). Pi — ortofosforan, PNP-aza-fosforylaza nukleozydów purynowych, dRyb-1-P — deoksyrybozo-1-fosforan, Gua — guanina, 8-oxoGua — 8-oksyo-guanina, XA — ksantyna, UA — kwas moczowy.

niej, zarówno 8-oksyguanina jak i 8-oxodG nie podlegają dalszej degradacji w organizmach ssaków. Świadczą o tym następujące obserwacje:

1. Znakowana trytem 8-oxodG wstrzyknięta do krwiobiegu szczura wydalana jest z moczem nie podlegając degradacji [52].

2. 8-OxodG jest cząsteczką bardzo trwałą (w warunkach podwyższonej temperatury i niskiego pH wielokrotnie trwalszą od deoksygwanozyny) i nie podlega nieenzymatycznej dekompozycji w warunkach zbliżonych do fizjologicznych [56].

3. W doświadczeniach *in vitro* przeprowadzonych z użyciem oczyszczonych preparatów enzymów wykazano, że:

a) 8-oxodG nie jest substratem ludzkiej fosforylasy nukleozydów purynowych, katalizującej fosforolizę wiązania N-glikozydowego m.in. deoksygwanozyny (Ryc. 8) [57, 58].

b) 8-oksyguanina nie jest substratem guanazy z wątroby króliczej, katalizującej fizjologicznie dezaminację hydrolytyczną guaniny do ksantyny. Innymi słowy, guanaza nie przekształca 8-oksyguaniny do kwasu moczowego (Ryc. 8) [57, 58].

V. Uwagi końcowe

DNA izolowany z komórek ludzkich zawiera niewielką ilość oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych, wśród nich 8-oksyguaninę [59-62]. Można stąd wyciągnąć wniosek, że enzymy wycinające te zmodyfikowane zasady nie są w stanie usunąć wszystkich uszkodzeń tego typu. Niektóre z pochodnych zmodyfikowanych oksydacyjnie mogą tworzyć błędnie sparowane połączenia, co stanowi źródło mutacji i w konsekwencji może spowodować transformację nowotworową komórki [63]. Produkty oksydacyjnej modyfikacji zasad obecne w DNA zazwyczaj traktowane są jako wynik ataku reaktywnych form tlenu na cząsteczkę DNA. W bieżącej literaturze podkreśla się znaczenie możliwości mutagenyzy powodowanej przez 8-oxodGTP. Należy jednak podkreślić, iż nie dostarczono jeszcze dowodów na obecność 8-oxodGTP *in vivo*, a tym bardziej nie oszacowano, jaka część ogólnej ilości 8-oksyguaniny obserwowanej w DNA komórkowym pochodzi może z 8-oxodGTP. Czy degradacja 8-oxodGTP to jedyna aktywność homologów MutT mająca wpływ na tempo mutagenyzy spontanicznej? Zapewne rozwikłanie tych problemów stanie się w najbliższej przyszłości ważnym zadaniem dla badaczy tej materii.

Artykuł otrzymano 13 lutego 1997 r.

Zaakceptowano do druku 12 czerwca 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Liczmański AE (1988) *Post Biochem* **34**: 273-291
2. Liczmański AE (1988) *Post Biochem* **34**: 293-310
3. Tudek B (1993) *Post Biochem* **39(2)**: 91-99

4. Zastawny TH (1996) *Post Biochem* **42(1)**: 31-41
5. Von Sonntag C (1987) *The chemical basis of radiation biology*, Taylor & Francis, New York, 1987
6. Floyd RA (1990) *Carcinogenesis* **11**: 1447-1450
7. Kasai H, Yamaizumi Z, Yamamoto F, Bessho T, Nishimura S, Berger M, Cadet J (1992) *Nucleic Acids Symp Ser* 181-182
8. Nicotera TM, Munson BR, Fiel RJ (1994) *Photochem Photobiol* **60**: 295-300
9. Ito K, Inoue S, Yamamoto K, Kawanishi S (1993) *J Biol Chem* **268**: 13221-13227
10. Floyd RA, West MS, Eneff KL, Schneider JE (1990) *Free Radic Biol Med* **8**: 327-330
11. Schneider JE, Price S, Maitl L, Gutteridge JM, Floyd RA (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 631-635
12. Schneider JE, Phillips JR, Pye Q, Maitl ML, Price S, Floyd RA (1993) *Arch Biochem Biophys* **301**: 91-97
13. Sies H (1993) *Mutat Res* **299**: 183-191
14. Ravanat JL, Cadet (1995) *Chem Res Toxicol* **8**: 379-388
15. Shau C, Foote CS (1995) *J Am Chem Soc* **117**: 6439-6442
16. Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M (1992) *Biochemistry* **33**: 106-110
17. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992) *J Biol Chem* **267**: 166-172
18. Maki H, Sekiguchi M (1992) *Nature (Lond)* **355**: 273-275
19. Pavlov YI, Minnick DT, Izuta S, Kunkel TA (1994) *Biochemistry* **33**: 4695-4701
20. Treffers HP, Spinelli V, Belser NO (1954) *Proc Natl Acad Sci USA* **40**: 1064-1071
21. Yanofsky C, Cox EC, Horn V (1966) *Proc Natl Acad Sci USA* **55**: 274-281
22. Bhatnagar SK, Bessman MJ (1988) *J Biol Chem* **263**: 8953-8957
23. Bhatnagar SK, Bullions LC, Lew G, Bessman MJ (1990) *J Bacteriol* **172**: 2802-2803
24. Bhatnagar SK, Bullions LC, Bessman MJ (1991) *J Biol Chem* **266**: 9050-9054
25. Bessman MJ, Bullions LC, Bhatnagar SK, Braden BC, Love WE (1991) *J Biol Chem* **266**: 9055-9056
26. Abeygunawardana C, Weber DJ, Frick DN, Bessman MJ, Mildvan AS (1993) *Biochemistry* **32**: 13071-13080
27. Weber DJ, Abeygunawardana C, Bessman MJ, Mildvan AS (1993) *Biochemistry* **32**: 13081-13088
28. Abeygunawardana C, Weber DJ, Gittis AG, Frick DN, Lin J, Miller AF, Bessman MJ, Mildvan AS (1995) *Biochemistry* **34**: 14997-15005
29. Frick DN, Weber DJ, Gillespie JR, Bessman MJ, Mildvan AS (1994) *J Biol Chem* **269**: 1794-1803
30. Frick DN, Weber DJ, Abeygunawardana C, Gittis AG, Bessman MJ, Mildvan AS (1995) *Biochemistry* **34**: 5577-5586
31. Lin J, Abeygunawardana C, Frick DN, Bessman MJ, Mildvan AS (1997) *Biochemistry* **36**: 1199-1211
32. Mo JY, Maki H, Sekiguchi M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11021-11025
33. Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T, Kakuma T, Kawabata S, Maki H, Sekiguchi M (1993) *J Biol Chem* **268**: 23524-23530
34. Furuichi M, Yoshida MC, Oda H, Tajiri T, Nakabeppu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M (1994) *Genomics* **24**: 485-490
35. Bullions LC, Mejean V, Claverys JP, Bessman MJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 12339-12344
36. Mejean V, Salles C, Bullions LC, Bessman MJ, Claverys JP (1994) *Mol Microbiol* **11**: 323-330
37. Kamath AV, Yanofsky C (1993) *Gene* **134**: 99-102
38. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirhness EF, Kerkavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick MJ, et al. (1995) *Science* **269**: 496-512
39. Kakuma T, Nishida J, Tsuzuki T, Sekiguchi M (1995) *J Biol Chem* **270**: 25942-25948
40. Cai JP, Kakuma T, Wsuzuki T, Sekiguchi M (1995) *Carcinogenesis* **16**: 2343-2350
41. Wani G, D'Ambrosio SM (1995) *Carcinogenesis* **16**: 277-283

42. Kang D, Nishida J, Iyama A, Nakabeppu Y, Furuichi M, Fujiwara T, Sekiguchi M, Takehige K (1995) *J Biol Chem* **270**: 14659-14665
43. Wu C, Nagasaki H, Maruyama K, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Yuasa Y (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **214**: 1239-1245
44. Okamoto K, Toyokuni S, Kim WJ, Ogawa O, Kakehi Y, Arao S, Hiai H, Yoshida O (1996) *Int J Cancer* **65**: 437-441
45. Porter DW, Nelson VC, Fivash MJ, Kasprzak KS (1996) *Chem Res Toxicol* **9**: 1375-1381
46. Frick DN, Bassman MJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 1529-1534
47. Thorne NM, Hankin S, Wilkinson MC, Nunez C, Barraclough R, McLennan AG (1995) *Biochem J* **311**: 717-721
48. Frick DN, Townsend BD, Bassman MJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 24086-24091
49. Koonin EV (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 4847
50. Lin J, Abeygunawardana C, Frick DN, Bessman MJ, Mildvan AS (1996) *Biochemistry* **35**: 6715-6726
51. Hayakawa H, Taketomi A, Sakumi K, Kuwano M, Sekiguchi M (1995) *Biochemistry* **34**: 89-95
52. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9697-9701
53. Shigenaga MK, Aboujaoude EN, Chen Q, Ames BN (1994) *Methods Enzymol* **234**: 16-33
54. Bessho T, Tano K, Kasai H, Ohtsuka E, Nishimura S (1993) *J Biol Chem* **268**: 19416-19421
55. Bessho T, Roy R, Yamamoto K, Kasai H, Nishimura S, Tano K, Mitra S (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8901-8904
56. Białkowski K, Cysewski P, Oliński R (1996) *Z Naturforsch* **51c**: 119-122
57. Białkowski K, Oliński R (1995) *Doniesienia Zjazdowej, XXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego* **111**
58. Białkowski K (1996) *Praca doktorska, Akademia Medyczna w Bydgoszczy*
59. Oliński R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M (1992) *FEBS Lett* **309**: 193-198
60. Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M, Oliński R (1994) *FEBS Lett* **341**: 59-64
61. Oliński R, Zastawny TH, Foksiński M, Barecki A, Dizdaroglu M (1995) *Free Radic Biol Med* **18**: 807-813
62. Białkowski K, Kowara R, Windorbska W, Oliński R (1996) *Cancer Lett* **99**: 93-97
63. Oliński R (1993) *Post Hig Med Dośw* **47**: 463-474

Elektroforeza kapilarna: nowe narzędzie analizy biomolekuł

Capillary electrophoresis: a new tool for biomolecules separation

PIOTR MUCHA¹,
PIOTR REKOWSKI²,
AGNIESZKA SZYK³,
GOTFRYD KUPRYSZEWSKI⁴,
JAN BARCISZEWSKI⁵

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Fizyczne podstawy elektroforezy kapilarnej
- III. Rodzaje CE
- IV. Zastosowanie CE w analizie biomolekuł
- V. Analiza aminokwasów
- VI. Rozdział mieszanin racemicznych
- VII. Rozdział peptydów
- VIII. Rozdział białek
- IX. Rozdział kwasów nukleinowych
- X. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Physical principles of capillary electrophoresis
- III. Modes of CE
- IV. Application of CE in analysis of biomolecules
- V. Amino acid analysis
- VI. Separation of racemic mixtures
- VII. Separation of peptides
- VIII. Separation of proteins
- IX. Separation of nucleic acids
- X. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: CE — elektroforeza kapilarna; SCE — elektroforeza kapilarna w warunkach superkrytycz-

nych; ACE — elektroforeza kapilarna powinowactwa; SGE — płytowa elektroforeza żelowa; HPLC — wysokosprawną chromatografią cieczową; UV — promieniowanie ultrafioletowe; EOF — przepływ elektroosmotyczny; Dns — reszta dansylowa; PTH — reszta fenylothiohydantoinowa; Dabsyl — reszta dabsylowa; Fmoc — reszta fluorenylometoksykarbonylowa; MECC — micellarno-elektrokinetyczna

¹ Dr, ² dr hab., ³ mgr, ^{4,5} prof. dr hab. ^{1,2,3,4} Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, 80-952 Gdańsk, ⁴ Instytut Oceanologii PAN, 81-712 Sopot, ⁵ Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, 61-704 Poznań

chromatografia kapilarna; SDS — dodecylsulfian sodu; FZCE — wolnostrefowa elektroforeza kapilarna; Glc-6-P — glukoza-6-fosforan; G6PDH — glukoza-6-fosforano dehydrogenaza; NAD — forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; NADH — forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; CMTI-I — inhibitor trypsyny wyizolowany z gatunku dyni *Cucurbita maxima*; CGE — kapilarna elektroforeza żelowa; dsDNA — dwuniciowy DNA; LIF — laserowo wzbudzana fluorescencja; CLOD — najniższe stężenie podlegające detekcji; MLOD — najmniejsza masa podlegająca detekcji; CIEF — kapilarne ogniskowanie izoelektryczne; CITP — kapilarna izotachoforeza; AA — reszta aminokwasowa; AU — jednostka absorbancji; GAL(1-15)-OH — N-terminalny 15-aminokwasowy fragment wieprzowej galaniny, zawierający wolną grupę karboksylową na C-końcu; GAL(1-15)-NH₂ — N-terminalny 15-aminokwasowy fragment wieprzowej galaniny, zawierający amid na C-końcu; [Gly₅]GAL(1-15)-NH₂ — analog N-terminalnego 15-aminokwasowego fragmentu wieprzowej galaniny, zawierający substytucję Asn⁵→Gly oraz amid na C-końcu; GAL — wieprzowa galanina; CMTI-I*-zmodyfikowany inhibitor trypsyny zawierający przecięte wiązanie Arg⁵-Ile⁶.

I. Wstęp

Elektroforeza kapilarna (CE) obejmuje rodzinę technik analitycznych, których wspólną cechą jest separacja molekuł pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego, w cienkiej kapilarze o średnicy rzędu kilkadziesiąt mikrometrów. Napięcie generuje ruch jonów (anionów i kationów) oraz molekuł o wypadkowym ładunku równym zero (w wyniku przepływu

elektroosmotycznego). Stwarza to możliwość jednoczesnej analizy zarówno jonów, jak i cząsteczek elektrycznie neutralnych. Analiza próbek o objętościach rzędu nanolitra (10⁻⁹ l), ze sprawnością sięgającą milionów pólerek teoretycznych (sprawność kolumn HPLC waha się w granicach 10⁴-10⁵ pólerek teoretycznych) i detekcją na poziomie attomoli (10⁻¹⁸ mola) uczyniły z elektroforezy kapilarnej w krótkim czasie jedno z najpotężniejszych narzędzi analitycznych [1]. CE łączy w sobie zalety dwóch technik będących filarami współczesnej biochemii: wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i konwencjonalnej elektroforezy żelowej (SGE), zwykle przewyższając możliwości każdej z nich z osobna. Krótkie porównanie tych technik przedstawia tabela 1. Z charakterystyki zamieszczonej w tabeli 1 widać wyraźnie, że elektroforeza spełnia wysokie wymagania jakie stawia współczesna biochemia technikom analitycznym. Pod wieloma względami CE znacznie przewyższa dotychczas stosowane techniki, takie jak HPLC i SGE. Jedynym poważnym mankamentem CE są trudności związane z pracą w trybie preparatywnym, nie pozwalające na otrzymanie większych ilości bardzo czystych substancji.

Schemat budowy aparatu do CE przedstawia rycina 1. Głównym elementem jest cienka (20-100 μm) kapilara szklana długości ok. 60 cm, zewnętrznie pokryta tworzywem poliimidowym w celu poprawienia właściwości mechanicznych. Końce kapilary zanurzone są

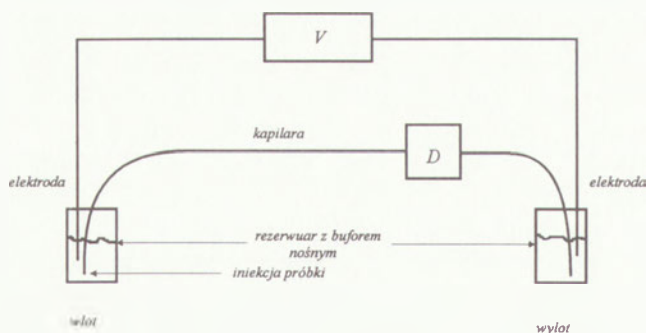
Tabela 1.

Charakterystyka porównawcza SGE, HPLC i CE.

Cecha	Metoda		
	SGE	HPLC	CE
szybkość analizy	mała	duża	bardzo duża
czułość CLOD* MLOD**	wysokie duża	niskie duża	wysokie bardzo mała
objętość analizowanej próbki	duża	duża	bardzo mała
sprawność	umiarkowana	wysoka (10 ⁴ —10 ⁵ pólerek teoretycznych/m)	bardzo wysoka (rzędu 10 ⁶ pólerek teoretycznych/m)
automatyzacja	niewielka	pełna	pełna
zużycie odczynników	niewielkie	duże	minimalne
praca w trybie preparatywnym	dobra	bardzo dobra	trudna
selektywność	umiarkowana	wysoka	bardzo wysoka
Rozdział: małych molekuł białek DNA	słaby bardzo dobry bardzo dobry	bardzo dobry dobry dobry	bardzo dobry bardzo dobry bardzo dobry

CLOD* — najniższe stężenie podlegające detekcji

MLOD** — najmniejsza masa podlegająca detekcji



V — zasilacz wysokiego napięcia
 D — detektor

Ryc. 1. Schemat budowy aparatury do elektroforezy kapilarnej.

w buforze separacyjnym. Obwód zamyka zasilacz wysokiego napięcia, z którym połączone są dwie elektrody znajdujące się blisko końców kapilary. Kapilara przechodzi przez detektor (najczęściej UV) pozwalający bezpośrednio śledzić proces rozdzielania. Pod koniec lat 80-tych pojawiły się komercyjne zestawy CE (Beckman, SpectraPhysics, Bio-Rad, Isco, Dionex, Waters, Hewlett Packard, Europhor) pozwalające na rutynowe, w pełni zautomatyzowane i ilościowe analizy.

II. Fizyczne podstawy elektroforezy kapilarnej

Podstawowym parametrem charakteryzującym cząsteczkę w procesie elektroforezy jest czas migracji t_m potrzebny do przebycia drogi od wlotu kapilary do detektora pod wpływem napięcia. Kolejnymi parametrami opisującymi zachowanie w kapilarze są ruchliwość i prędkość elektroforetyczna. Ich wzajemną zależność przedstawia równanie:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{L_d/t_m}{V/L_T}$$

μ_{ep} — ruchliwość elektroforetyczna
 v_{ep} — prędkość elektroforetyczna
 E — natężenie pola elektrycznego
 L_d — długość kapilary do detektora
 t_m — czas migracji
 V — napięcie
 L_T — całkowita długość kapilary

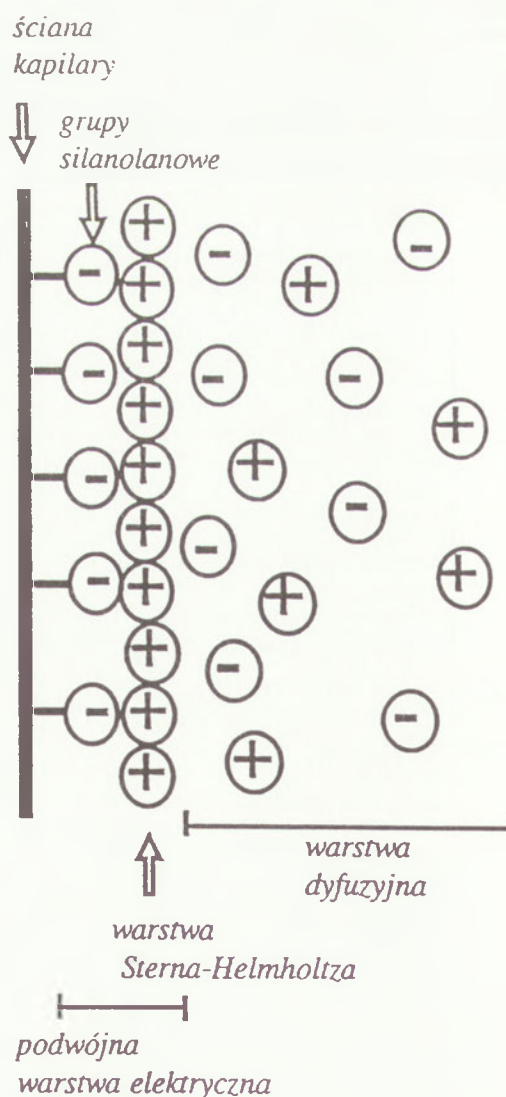
Równanie to opisuje pozorną ruchliwość elektroforetyczną. Określenie wartości rzeczywistej wymaga uwzględnienia zjawiska przepływu elektroosmotycznego w kapilarze wypełnionej elektrolitem po przyłożeniu napięcia. Najpopularniejszym materiałem służącym do produkcji kapilary jest szkło. Obecne na jego powierzchni grupy silanolanowe przy wartościach pH powyżej 1.5 są naładowane ujemnie. Elektrostatyczne przyciąganie kationów elektrolitu jest przyczyną powstania podwójnej warstwy elektrycznej na granicy faz kapilara — elektrolit (Ryc. 2). Kationy elektrolitu oddziałujące bezpośrednio z powierzchnią kapilary tworzą stabilną warstwę Sterna-Helmholtza, nie podlegającą wpływom zewnętrznego pola elektrycznego

[2]. Bezpośrednio do niej przylega dyfuzyjna warstwa jonów, zwana także warstwą Gouy'a-Chapmana. Zewnętrzne pole elektryczne powodując migrację kationów w kierunku katody, wywołuje przepływ cząsteczek rozpuszczalnika zawartych w ich sferach hydratacyjnych. Zwany jest on przepływem elektroosmotycznym (EOF) i odgrywa niezwykle istotną rolę w procesie rozdzielania. Wielkość EOF opisuje równanie Smoluchowskiego:

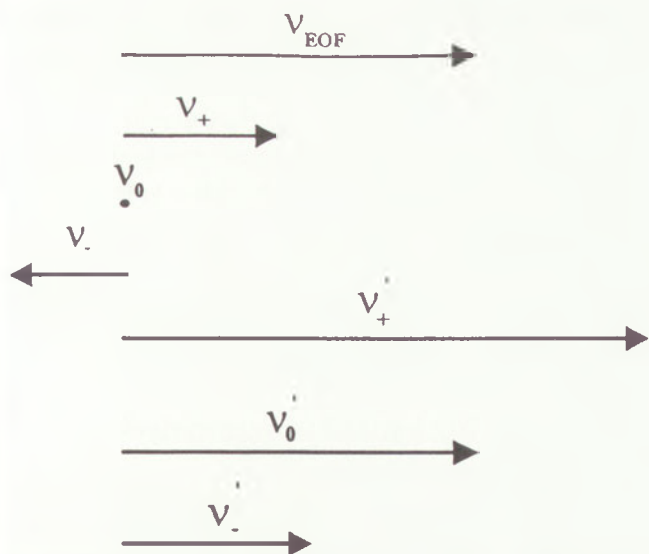
$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} E$$

v_{EOF} — szybkość przepływu elektroosmotycznego
 ϵ — stała dielektryczna buforu
 ζ — potencjał zeta podwójnej warstwy elektrycznej
 η — lepkość buforu

W większości przypadków obecność EOF wywiera negatywny wpływ na rozdzielanie. Jednakże optymalizacja parametrów układu (rodzaj buforu separacyjnego, stężenie, temperatura oraz wielkość napięcia) pozwala na sterowanie wielkością EOF, co umożliwia jednoczesną separację kationów, anionów i cząsteczek neutralnych w trakcie pojedynczej analizy, ponieważ szyb-



Ryc. 2. Podwójna warstwa elektryczna na granicy faz kapilara-bufor.



Ryc. 3. Wpływ przepływu elektroosmotycznego (EOF) na kierunek i szybkość ruchu molekuł analizowanych techniką elektroforezy kapilarnej.

- v_{EOF} — szybkość przepływu elektroosmotycznego
- v_+ — pozorna szybkość migracji kationu
- v_- — pozorna szybkość migracji anionu
- v_0 — pozorna szybkość migracji cząsteczki obojętnej ($v_0 = 0$)
- v_+^* — rzeczywista szybkość migracji kationu
- v_-^* — rzeczywista szybkość migracji anionu
- v_0^* — rzeczywista szybkość migracji cząsteczki obojętnej ($v_0^* = v_{EOF}$)

kość migracji elektroforetycznej i szybkość EOF są wielkościami addytywnymi (Ryc. 3).

III. Rodzaje CE

Poszukiwanie i optymalizacja metod rozdziału do-

prowadziły do powstania rodziny technik wykorzystujących ruch molekuł w cienkich kapilarach. Krótką charakterystykę tych metod przedstawia tabela 2. Wybór odpowiedniej metody separacji wraz z optymalizacją parametrów rozdziału są podstawą efektywnej analizy. Szeroki zakres metod analizy oferowanych przez elektroforezę kapilarną wynika z połączenia technik elektroforetycznych z chromatograficznymi. Z tego powodu elektroforeza kapilarna stwarza dużo szerszy wachlarz metod analizy niż inne techniki analityczne.

IV. Zastosowanie CE w analizie biomolekuł

Niezwykła złożoność systemów biologicznych oraz bardzo niskie stężenie biomolekuł wymagają stosowania bardzo selektywnych i czułych metod ich analizy. Wysoka sprawność i mała objętość analizowanej próbki, krótki czas (rzędu sekund lub minut), pełna automatyzacja oraz niski koszt analizy uczyniły z CE wspaniałe narzędzie współczesnej biologii molekularnej. Obszar zastosowań CE jest niezwykle rozległy, od rutynowych analiz przemysłowych poczynając, a na sekwencjonowaniu DNA kończąc.

V. Analiza aminokwasów

Aminokwasy są stosunkowo prostymi związkami organicznymi. Większość z nich pozbawiona jest chromoforów, które pozwoliłyby na ich bezpośrednią detekcję. Z tego powodu aminokwasy oznaczane są najczęściej jako pochodne dansylowe (Dns) [3], dab-

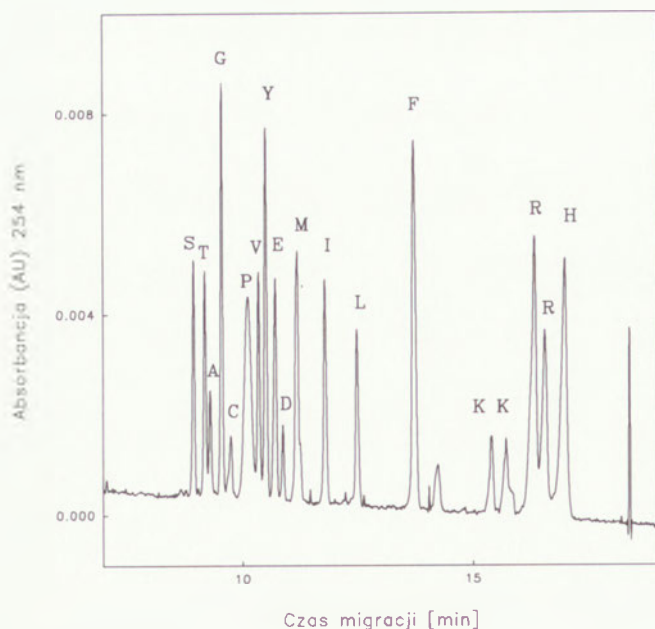
Tabela 2.

Charakterystyka rodzajów CE.

Tryb*	Zasada separacji	Możliwość separacji			
		Małych molekuł	Peptydów	Białek	DNA
wolnostrefowa elektroforeza kapilarna (FZCE)	stosunek ładunku do masy	TAK	TAK	TAK	NIE
kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (CIEF)	wartość punktu izoelektrycznego	NIE	TAK	TAK	NIE
kapilarna isotachoforeza (CITP)	ruchliwość elektroforetyczna	TAK	TAK	TAK	NIE
micellarno-elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC)	stosunek ładunku do masy i hydrofobowość	TAK	TAK	TAK	TAK
żelowa elektroforeza kapilarna (CGE)	masa	NIE	TAK	TAK	TAK

* Przedstawione tryby są powszechnie stosowanymi rodzajami elektroforezy kapilarnej. W tabeli nie ujęto metod o marginalnym znaczeniu praktycznym, takich jak elektroforeza kapilarna w warunkach superkrytycznych (SCE). Nie umieszczono także metod stosunkowo nowych, takich jak elektroforeza kapilarna powinowactwa (ACE), mogących w przyszłości znaleźć szerokie zastosowanie laboratoryjne [2, 30].

syłowe (Dabsyl) [4], fenyltiohydantoinowe (PTH) [5] lub fluorenylometoksykarbonyłowe (Fmoc) [6], w celu zwiększenia czułości detekcji. Potencjalna obecność 21 biogennych aminokwasów w próbce wymaga znalezienia wystarczająco selektywnej metody ich rozdzielenia. Zadanie to najlepiej spełnia micellarno-elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC) [7]. Cechą charakterystyczną MECC jest obecność środków powierzchniowo czynnych (surfaktantów) w buforze nośnym. Powyżej stężenia zwanego krytycznym stężeniem micellarnym, surfaktanty wykazują tendencję do agregacji tworząc micelle. Różnicują one molekuly (zarówno jony, jak i cząsteczki neutralne) poprzez wielkość oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych. Do najczęściej stosowanych surfaktantów należy dodecylsulfian sodu (SDS) [8]. Anionowe micelle tworzone przez SDS migrują w kierunku anody. Jednakże w neutralnym i zasadowym pH (środowisko w jakim zwykle dokonuje się analizy) istnieje silny efekt EOF w kierunku katody. Wynikiem superpozycji tych dwóch przeciwstawnych efektów jest migracja micelli w kierunku katody, z prędkością mniejszą niż szybkość przepływu masowego buforu nośnego. Molekuly z wysokim powinowactwem do micelli powoli migrują w kierunku katody, te które praktycznie nie oddziałują z micellą migrują w tym samym kierunku z prędkością EOF. Zróznicowana siła oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych pomiędzy micellą i aminokwasami umożliwia ich rozdział techniką MECC (Ryc. 4).



Ryc. 4. Analiza dansylowych pochodnych aminokwasowych (Dns-AA) metodą MECC.

Warunki separacji: aparat do elektroforezy kapilarnej PACE 2100 (Beckman) z kapilarą szklaną 75 $\mu\text{m} \times 57$ cm (50 cm do detektora), bufor separacyjny: 20 mM tetraboran sodu, 25 mM SDS, pH 9.5, stałe napięcie 15 kV, temp. 30°C, filtr 254 nm, iniekcja ciśnieniowa — 1.8 s, normalna polaryzacja (katoda od strony detektora). Wszystkie roztwory wstępne sączone przez filtr teflonowy o średnicy porów 0.22 μm . Aminokwasy oznaczono standardowymi skrótami jednoliterowymi.

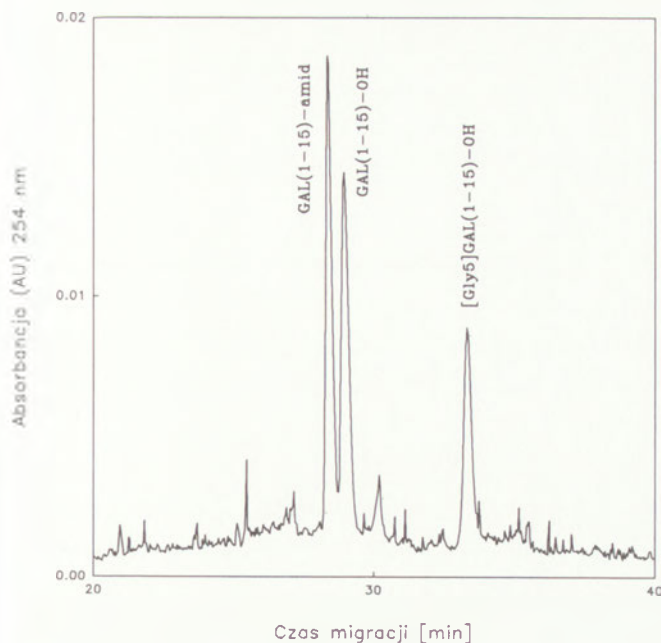
Wprowadzenie silnego chromorofu do cząsteczki znacznie podnosi czułość analizy, jednakże wymaga ścisłego przestrzegania warunków derywatacji (w celu uzyskania ilościowego przebiegu reakcji) i wydłuża czas analizy. Możliwa jest również analiza natywnych aminokwasów eliminująca czynności wstępne, związane z przygotowaniem pochodnych. Oznaczanie natywnych aminokwasów znacznie skraca czas analizy, jednakże obniża czułość detekcji i wymaga zastosowania odpowiedniego typu detektora (elektrochemiczny, gradientowo-stężeniowy) [9, 10].

VI. Rozdział mieszanin racemicznych

CE wykorzystywana jest także do rozdziału mieszanin racemicznych. Jedną z metod rozdziału jest stosowanie chiralnego selektora jako dodatku do buforu nośnego lub immobilizowanego na powierzchni kapilary. Cyklodekstryny należą do powszechnie stosowanych chiralnych selektorów dodanych do buforu separacyjnego [11]. Tworzą one z enancjomerami inkluzyjne kompleksy o różnych szybkościach migracji. Drugą metodą jest stosowanie chiralnych odczynników wiążących się kowalencyjnie z badanymi enancjomerami. Reagują one z aktywnymi grupami chemicznymi, a powstające diastereoizomery można rozdzielać w achiralnym elektrolicie, wykorzystując różnice ich ruchliwości elektroforetycznej i własności hydrofobowych. Do tego typu związków należy odczynnik Marfey'a (amid 2,4-dinitro-1-fluoro-L-fenylalaniny lub amid 2,4-dinitro-1-fluoro-D-fenylalaniny) [12]. W wyniku reakcji odczynnika Marfey'a z enancjomerami powstają diastereoizomery łatwo rozróżnialne przy użyciu techniki MECC.

VII. Rozdział peptydów

Peptydy były pierwszą grupą związków biologicznie czynnych dla której zoptymalizowano parametry rozdziału [13]. CE pozwala na rozdział peptydów zawierających tak niewielkie modyfikacje strukturalne, jak na przykład deamidacja. Problemów nie stwarza analiza analogów peptydów (Ryc. 5). Daje to możliwość obserwowania modyfikacji posttranskrypcyjnych lub zmian mutacyjnych w łańcuchu polipeptydowym. CE umożliwia analizę kwaśnych oraz zasadowych peptydów stwarzających spore trudności w wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Najprostszą i optymalną techniką analizy peptydów jest wolnostrefowa elektroforeza kapilarna (FZCE) [2]. Rozdział oparty jest na wykorzystaniu różnicy szybkości elektroforetycznej molekul w jednorodnym buforze separacyjnym. Bardzo dobre efekty rozdziału otrzymuje się stosując zarówno bufor kwasny (pH 2.5), jak i zasadowy (pH 10). W niskim pH peptydy migrują w postaci kationów w kierunku katody. W buforach o wysokim pH peptydy występują w postaci anionów, jednakże silny efekt EOF sprawia, że migracja odbywa się w tym



Ryc. 5. Analiza analogów peptydowego hormonu — galaniny (GAL).

GAL(1-15)-OH — pitnastoaminokwasowy N-terminalny fragment galaniny, zawierający grupę karboksylową na C-końcu.

GAL(1-15)-amid — pitnastoaminokwasowy N-terminalny fragment galaniny, zawierający grupę amidową na C-końcu.

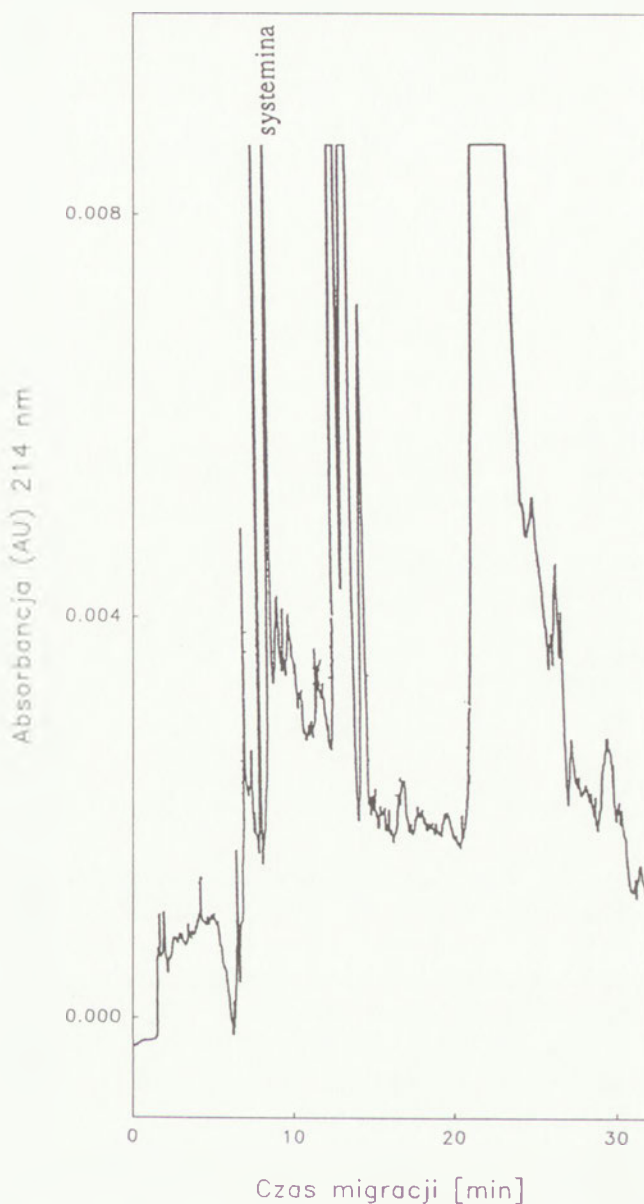
[Gly⁵]GAL(1-15)-OH — pitnastoaminokwasowy N-terminalny fragment galaniny, zmodyfikowany poprzez podstawienie reszty asparaginy w pozycji piątej resztą glicyny. Warunki separacji: aparat do elektroforezy kapilarnej PACE 2100 (Beckman) z kapilarą szklaną 75 μm × 57 cm (50 cm do detektora), bufor separacyjny: 50 mM bufor fosforanowy pH 2.5, stałe napięcie 18 kV, temp. 30°C, filtr 254 nm, iniekcja ciśnieniowa — 1.8 s, normalna polaryzacja (katoda od strony detektora). Wszystkie roztwory wstępnie sączone przez filtr teflonowy o średnicy porów 0.22 μm.

samym kierunku. CE pozwala na analizę peptydów bezpośrednio w materiale biologicznym. Przykładem jest oznaczanie systeminy — 18-peptydu będącego roślinnym hormonem peptydowym indukującym syntezę inhibitorów proteinazowych I i II w pomidorach i ziemniakach [14] (Ryc. 6).

FZCE znakomicie nadaje się do analizy map peptydowych. W wyniku enzymatycznej hydrolizy łańcucha polipeptydowego otrzymuje się charakterystyczny, niepowtarzalny zestaw peptydów. Jest to swoisty „odcisk palca” pozwalający na szybką identyfikację badanego związku (Ryc. 7).

VIII. Rozdział białek

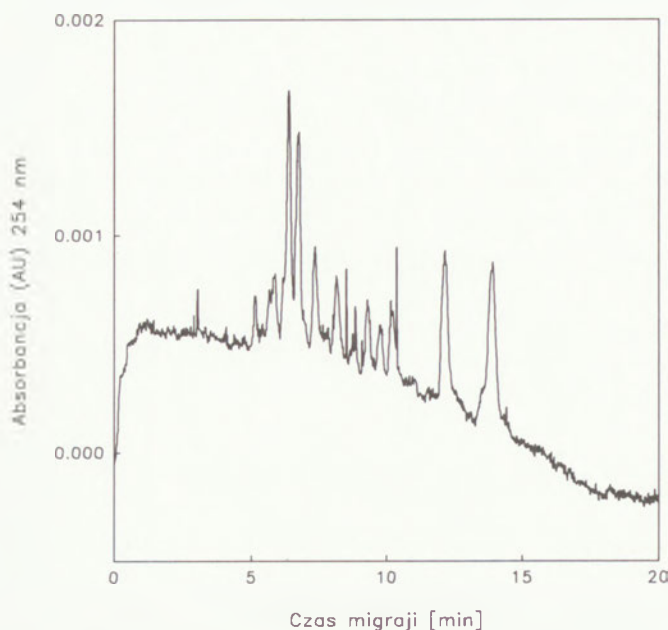
Białka wykazują silną tendencję do oddziaływania z powierzchnią kapilary. Oddziaływania te dramatycznie redukują rozdzielczość i sprawność rozdzielania [15]. Jednym ze sposobów rozwiązania tego problemu jest analiza w buforach o bardzo niskich (pH 2.5) lub wysokich (pH 10) wartościach pH. W silnie kwaśnym buforze adsorpcja jest niewielka, ponieważ liczba nieprotonowanych grup silanolanowych ściany kapilary jest mała. Jednocześnie efekt EOF jest słaby. W silnie zasadowym pH zarówno ściany kapilary, jak



Rys. 6. Analiza zliofilizowanego ekstraktu z liści pomidora.

Warunki separacji: aparat do elektroforezy kapilarnej PACE 2100 (Beckman) z kapilarą szklaną 75 μm × 57 cm (50 cm do detektora), 100 mM bufor fosforanowy, pH 2.5, stałe napięcie 18 kV, temp. 25°C, filtr 254 nm, iniekcja ciśnieniowa — 1 s.

i białka są zjonizowane ujemnie, lecz wielkość EOF jest znaczna [2]. Redukuje to do minimum oddziaływania białka ze ścianą kapilary, jednakże równocześnie niszczone jest trzeciorzędowa struktura białka. W ekstremalnych wartościach pH większość białek ulega denaturacji i wytrąca się z roztworów. Z tego powodu większość analiz przeprowadza się w fizjologicznym pH. Drugim sposobem redukcji oddziaływań ze ścianą kapilary jest stosowanie kapilar ze zmodyfikowanymi powierzchniami. W wyniku kowalencyjnego przyłączenia do grup silanolanowych takich związków jak glikol polietylenowy [16] czy polikarylamid [17] adsorpcja i EOF zostają znacznie ograniczone. Innym sposobem eliminowania niekorzystnych oddziaływań z grupami silanolowymi kapilary jest ich maskowanie poprzez elektrostatyczne wiązanie związków eliminujących te oddziaływania. W wyniku zmiany polaryzacji

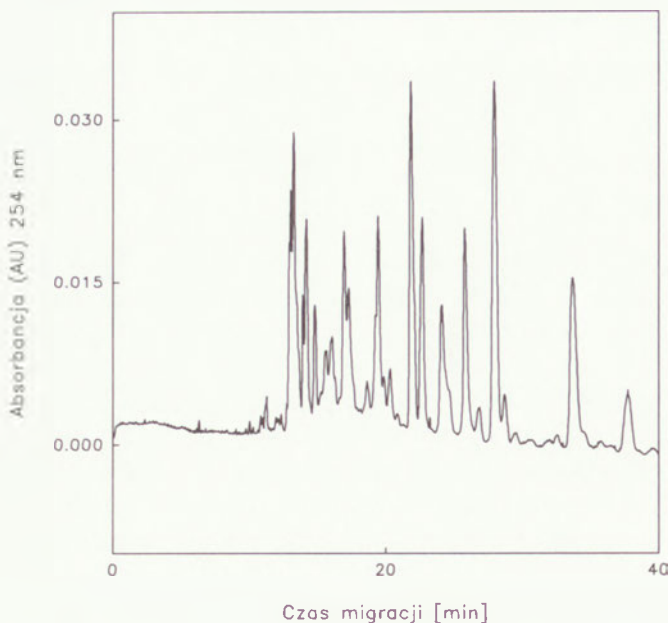


Ryc. 7. Peptydowa mapa restrykcyjna (fingerprint) zredukowanej insuliny wołowej trawionej trypsyną.

Warunki separacji: aparat do elektroforezy kapilarnej PACE 2100 (Beckman) z kapilarą szklaną $75\mu\text{m} \times 57\text{ cm}$ (50 cm do detektora), bufor separacyjny 50 mM bufor fosforanowy, pH 2.5, stałe napięcie 20 kV, temp. 30°C , filtr 214 nm, iniekcja ciśnieniowa — 1 s, normalna polaryzacja (katoda od strony detektora)

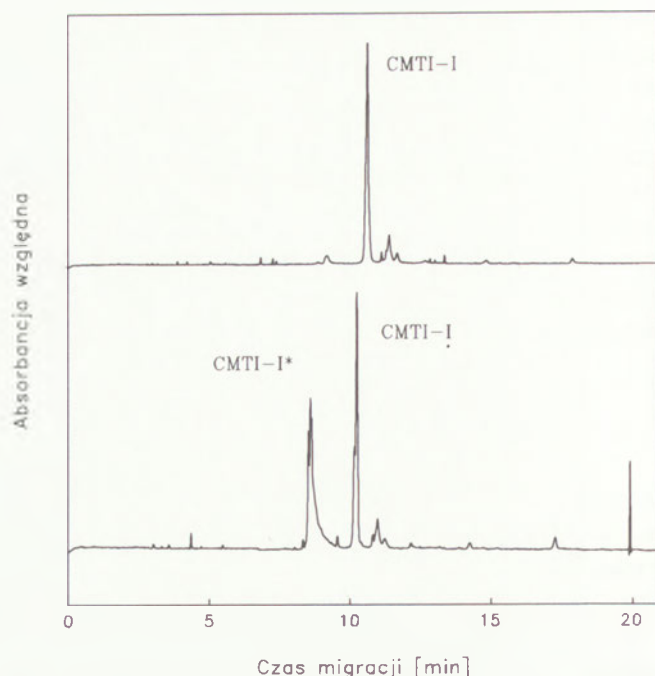
ściany kapilary z ujemnej na dodatnią, możliwa jest analiza zasadowych protein (np. histonów). Popularnymi związkami modyfikującymi ścianę kapilary w ten sposób są poliaminy (spermina) lub kationowe detergenty, takie jak bromek trimetylocetyloamoniowy [18].

Wysoka sprawność CE pozwala w niektórych przypadkach na konformacyjną analizę protein. Jedną z najdramatyczniejszych zmian konformacyjnych jest



Ryc. 8. Denaturacja trypsyny w środowisku kwaśnym, pH 2.5.

Warunki separacji: aparat do elektroforezy kapilarnej PACE 2100 (Beckman) z kapilarą szklaną $75\mu\text{m} \times 57\text{ cm}$ (50 cm do detektora), bufor separacyjny 25 mM bufor fosforanowy, pH 2.5, stałe napięcie 18 kV, temp. 25°C , filtr 214 nm, iniekcja ciśnieniowa — 3 s, normalna polaryzacja (katoda od strony detektora).



Ryc. 9. Analiza zmian strukturalnych trypsynowego inhibitora CMTI-I

CMTI-I — natywny inhibitor

CMTI-I* — inhibitor ze zhydrolizowanym wiązaniem $\text{Arg}^5\text{-Ile}^6$

Warunki separacji: aparat do elektroforezy kapilarnej PACE 2100 (Beckman) z kapilarą szklaną $75\mu\text{m} \times 57\text{ cm}$ (50 cm do detektora), bufor separacyjny 25 mM bufor fosforanowy, pH 7.0, stałe napięcie 12 kV, temp. 25°C , filtr 214 nm, iniekcja ciśnieniowa — 3 s, normalna polaryzacja (katoda od strony detektora).

denaturacja. Na rycinie 8 przedstawiono elektroforegram produktów denaturacji trypsyny. W przypadku α -laktoalbuminy można zaobserwować zmianę konformacji wywołaną wzrostem temperatury [19]. CE pozwala na śledzenie przebiegu reakcji enzymatycznych. Analiza oksydacji glukozy-6-fosforanu (Glc-6-P) katalizowanej przez glukozy-6-fosforano dehydrogenazę (G6PDH) w obecności NAD jako kofaktora, pozwoliła na oznaczenie G6PDH na poziomie 10 aM (10^{-17} mola) poprzez detekcję redukcji NAD do NADH [20]. Możliwa jest również analiza zmian strukturalnych inhibitorów enzymów. W wyniku reakcji trypsyny z jej peptydowym inhibitorem CMTI-I następuje zmiana struktury pierwszorzędowej inhibitora w wyniku hydrolizy reaktywnego wiązania $\text{Arg}^5\text{-Ile}^6$, przy czym tworzy się analog oznaczany CMTI-I* [21] (Ryc. 9).

IX. Rozdział kwasów nukleinowych

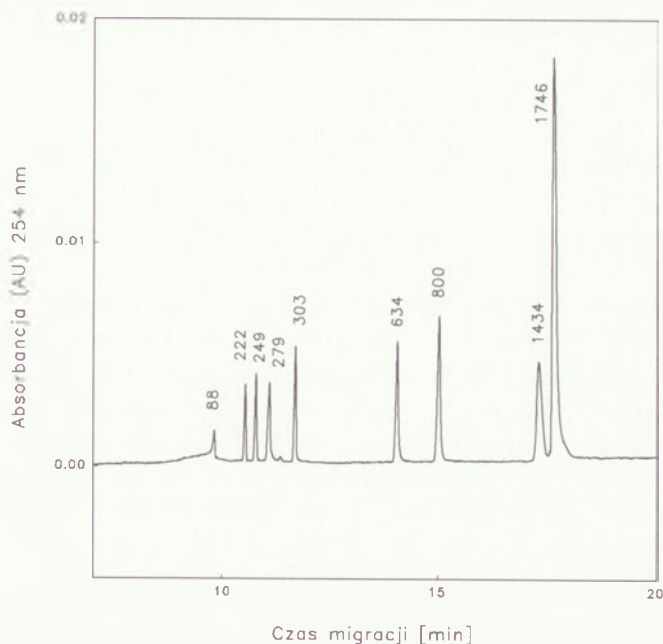
Trudna do przecenienia biologiczna rola kwasów nukleinowych jest powodem, że jest to jedna z najintensywniej badanych klas biomolekuł. Dotychczas standardowo stosowaną metodą analizy kwasów nukleinowych była elektroforeza żelowa (SGE), z wykorzystaniem agarozy lub poliakrylamidu jako medium separacyjnego. Jednakże używane w analizie płyty agarozowe lub poliakrylamidowe wykazują wyjątkowo niekorzystny stosunek powierzchni do objętości.

Utrudnia to znacznie odprowadzanie znacznych ilości ciepła Joule'a tworzącego się w trakcie analizy, a pojawiające się ruchy konwekcyjne zaburzają proces rozdziału. Ogranicza to stosowanie wysokich napięć i wydłuża czas analizy. Dodatkowo prace pomocnicze są pracochłonne, a cały proces rozdziału trudny do zautomatyzowania.

Jedną z zasadniczych cech kwasów nukleinowych, narzucających warunki rozdziału jest stała gęstość ładunku niezależna od wielkości (masy) cząsteczki. Najpopularniejszą metodą analizy kwasów nukleinowych jest żelowa elektroforeza kapilarna (CGE) [2]. Podstawową cechą tej metody jest rozdzielanie molekuł pod wpływem pola elektrycznego w cienkiej, wypełnionej żelom kapilarze. Stosowane żele można podzielić na dwie klasy. Pierwszą stanowią żele chemiczne, będące sieciowanymi, nierozpuszczalnymi w wodzie polimerami. Sieciowanie prowadzi do powstania przestrzennej porowatej struktury, umożliwiającej rozdzielanie w oparciu o wielkość cząsteczki. Żele chemiczne nie są idealnym medium separacyjnym. Komercyjna dostępność kapilar żelowych pozwala zapomnieć użytkownikowi o trudnościach związanych z napełnieniem wąskiej kapilary żelom i jego homogenną polimeryzacją, jednakże zmiana buforu na inny niż ten, który użyty został w trakcie polimeryzacji sprawia już spore trudności. Kapilary żelowe mają ograniczoną żywotność. Po kilkuset analizach w kapilarze wypełnionej żelom poliakrylamidowym nie ma gwarancji uzyskania powtarzalnych wyników. Agarozę jest jeszcze mniej stabilną i już po kilku analizach kapilarę trzeba wymienić na nową. Analiza niskocząsteczkowego DNA nie nastręcza żadnych trudności. W obszarze tym udaje się uzyskać rozdzielczość kilku par zasad, a dla mniejszych molekuł pary zasad [22, 23]. W celu zwiększenia rozdzielczości, DNA analizuje się w postaci kompleksów z czynnikami interkalującymi (np. bromkiem etydyny). Interkalatory eliminują drugorzędowe elementy struktury DNA, umożliwiając ich analizę w oparciu o wielkość cząsteczki (zgięcia lub zwiększona fleksybilność w stosunku do liniowej cząsteczki powodują opóźnienia czasu migracji).

Analiza dsDNA powyżej 20 tysięcy par zasad zaczyna sprawiać poważne trudności. Zanika zależność między wielkością DNA i czasem migracji, a stochastyczne fluktuacje molekuł w kapilarze są przyczyną niepowtarzalności wyników [24]. Jednakże znane są przykłady analizy fragmentów DNA zawierających 23 tysiące par zasad [25], a nawet natywnych chromosomów zawierających $3-5 \times 10^6$ par zasad [26], aczkolwiek zastrzeżenia budzi brak powtarzalności wyników.

Gwałtownie rozwijającym się obszarem CGE, dającym duże nadzieje na wzrost rozdzielczości i przesunięcie granicy wielkości analizowanego DNA jest zastosowanie bardzo rozcieńczonych „żeli fizycznych” [12]. „Żele fizyczne” są długimi polimerami rozpuszczonymi w buforze separacyjnym. Do najczęściej sto-



Ryc. 10. Mapa restrykcyjna plazmidu pBR322 trawionego enzymami restrykcyjnymi *Ava II* oraz układem *EcoRI* + *Ava II*.

Warunki separacji: aparat do elektroforezy kapilarnej PACE 2100 (Beckman) z modyfikowaną kapilarą BioCap LPA (BioRad) $50 \mu\text{m} \times 30 \text{cm}$ (23 cm do detektora), bufor separacyjny: PCR product analysis buffer (BioRad), pH 8.3, stałe napięcie — 3 kV, temp. 29°C , filtr 254 nm, iniekcja napięciowa — 8 kV przez 4 s, polaryzacja odwrócona (anoda od strony detektora).

sowanych należą liniowy poliakrylamid [27] oraz pochodne celulozy: metyloceluloza, hydroksyetyloceluloza i hydroksypropylometyloceluloza [28]. Stosowane są w postaci kilkuprocentowych dodatków do buforu separacyjnego. Żele fizyczne stosuje się zwykle w połączeniu z kapilarami o modyfikowanych powierzchniach w celu wytłumienia niekorzystnego zjawiska EOF. Użycie żeli fizycznych jest bardzo wygodne. Zanikają problemy związane z polimeryzacją żelu w wąskich kapilarach. Również wymiana buforu w kapilarze jest procesem natychmiastowym. Żele fizyczne stosowane wraz z kapilarami o modyfikowanych powierzchniach znajdują zastosowanie w analizie map restrykcyjnych DNA (Ryc. 10). Połączenie tej metody z niezwykle czułą metodą detekcji, jaką jest laserowo wzbudzana fluorescencja (LIF) pozwala oznaczać masy rzędu 10^{-20} mola [29].

Elektroforeza znalazła zastosowanie w analizie wszystkich grup związków organicznych. Niektóre z nich, takie jak węglowodany czy lipidy z powodu braku chromoforów lub ładunku w cząsteczce stwarzają pewne problemy w analizie CE. Z tego powodu najczęściej analizowane są w postaci pochodnych zawierających zjonizowane grupy funkcyjne lub chromofory [2]. Niezwykle szybki rozwój oraz wzrastająca popularność elektroforezy kapilarnej sprawił, że wiele informacji o CE znaleźć można w sieci informacyjnej Internet pod adresami:

<http://minyos.its.rmit.edu.au/~seans/ce.html>

<http://www-1mmb.ncifcrf.gov/ESAB/indexEP.html>

<http://www.vchgroup.de/vch/journals/2027.html>

X. Wnioski

CE jest jedną z najmłodszych i najszybciej rozwijających się technik analitycznych. Szerokie spektrum zastosowań wykazało niezwykłą użyteczność tej techniki w analizie biomolekuł w złożonych systemach biologicznych. Obecnie najwięcej uwagi poświęca się problemowi zastosowania kapilar o modyfikowanych powierzchniach oraz buforów zawierających „żele fizyczne”. Satisfakcjonujące rozwiązanie tych problemów pozwoli na znaczne poprawienie sprawności i rozdzielczości, a rozwój nowoczesnych i czułych metod detekcji, takich jak LIF, pozwoli na analizę biomolekuł na poziomie stężeń fizjologicznych.

Wszystkie elektroforegramy zamieszczone w artykule wykonane zostały przez autorów w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Uniwersytetu Gdańskiego.

Artykuł otrzymano 7 lutego 1997 r.
Zaakceptowano do druku 8 maja 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Karger BL, Chu YH, Foret F (1995) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**: 579-610
2. Li SFY (1992) *Capillary electrophoresis* Elsevier Amsterdam str 6, 9, 14, 181, 480
3. Issaq HJ, Chan KC (1995) *Electrophoresis* **16**: 467-480
4. Yu M, Dovichi NJ (1989) *Anal Chem* **61**: 37-40
5. Otsuka K, Terabe S, Ando H (1985) *J Chromatogr* **332**: 219-226
6. Chan KC, Janini GM, Muschlik GM, Issaq HJ (1993) *J Chromatogr* **653**: 93-97
7. Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A, Ando A (1984) *Anal Chem* **56**: 111-115
8. Issaq HJ, Chan KC (1995) *Electrophoresis* **16**: 467-480
9. Pawliszyn J (1988) *Anal Chem* **60**: 2796-2801
10. Olefirowicz TM, Ewing AG (1990) *J Chromatogr* **499**: 713-719
11. Nishi H, Terabe S (1995) *J Chromatogr* **694**: 245-276
12. Johnson BA (1985) *Biochem* **24**: 2587-2591
13. Jorgenson JW, Lucas KD (1981) *Anal Chem* **53**: 1298-1302
14. Mucha P, Rekowski P, Kupryszewski G, Barciszewski J (1996) *J Chromatogr A* **734**: 410-415
15. Landers JP (1993) *TIBS* **18**: 409-414
16. Swedberg SA (1990) *Anal Biochem* **185**: 51-55
17. Paulus A, Ohms JI (1990) *J Chromatogr* **507**: 113-123
18. Lauer HH, McManigill D (1986) *Anal Chem* **58**: 166-170
19. Tsuda T (1991) *J High Res Chromatogr* **10**: 622-624
20. Bao J, Regnier FE (1992) *J Chromatogr* **608**: 217-224
21. Polanowski A, Wilusz T, Nienartowicz B, Cie-sar E, Słomińska A, Nowak K (1980) *Acta Biochim Po91* **27**: 371-382
22. Macek J, Tjaden UR, Van Der Greef J (1991) *J Chromatogr* **545**: 177-182
23. Paulus A, Ohms JI (1990) *J Chromatogr* **507**: 113-123
24. Carlsson C, Larsson A, Johnsson M, Norden B (1995) *J Am Chem Soc* **117**: 3871-3872
25. Strege M, Lagu A (1991) *Anal Chem* **63**: 1233-1236
26. Guszczynski T, Chrambach A (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **179**: 482-486
27. Heiger DN, Cohen AS, Karger BL (1990) *J Chromatogr* **516**: 33-48
28. Mazzeo JR, Krull IS (1991) *Biotechniques* **10**: 638-645
29. Olefirowicz TM, Ewing AG (1990) *J Neurosci Meth* **34**: 11-15
30. Cho Y-H, Lees WJ, Stassinopoulos A, Walsh CT (1994) *Biochemistry* **33**: 10616-10621

Uczmy biochemii poprawnie: ponadtlenek, dysmutaza ponadtlenkowa

Mój podziw i uznanie dla pięknego polskiego wydania „Biochemii” Luberta Stryera (PWN, Warszawa 1997) zmąciła lektura s. 589-591 tego podręcznika zawierających błędne tłumaczenia nazw angielskich. Jakkolwiek błędne odpowiedniki angielskich terminów *superoxide* i *superoxide dismutase* koegzystują od lat w polskim piśmiennictwie z terminami właściwymi i nie ominęły nawet łamów *Postępów Biochemii*, warto na fakt ten zwrócić uwagę szczególnie gdy chodzi o podręcznik biochemii, który ma kształtować podstawy wiedzy studentów.

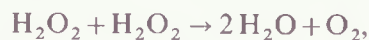
Od lat chemicy polscy posługują się terminem **ponadtlenek** jako odpowiednikiem angielskiego terminu *superoxide*, w odróżnieniu od terminu **nadtlenek** odpowiadającego angielskiemu terminowi *peroxide*. Warto zwrócić uwagę na zasadniczą różnicę pomiędzy ponadtlenkami a nadtlenkami. W ponadtlenkach (np. ponadtlenku potasu KO_2) formalny stopień redukcji tlenu wynosi $-1/2$; **anionorodnik ponadtlenkowy** (*superoxide anion radical*) O_2^- powstaje w wyniku przyłączenia jednego elektronu do cząsteczki tlenu O_2 . Formalny stopień redukcji tlenu w nadtlenkach (np. nadtlenku wodoru H_2O_2) wynosi -1 . Nadtlenki powstają w wyniku jednoelektronowej redukcji ponadtlenków lub dwuelektronowej redukcji cząsteczki tlenu. Ponad-tlenki zawierają niesparowany elektron, są więc wolnymi rodnikami; nadtlenki (w więc i nadtlenek wodoru) nie mają charakteru wolnych rodników. Warto może dodać, że systematyczna nazwa chemiczna ponadtlenku potasu winna brzmieć ditlenek potasu, zaś systematyczna nazwa nadtlenku wodoru ditlenek diwodoru, jednak wygodniejsze i bardziej zrozumiałe są chyba tradycyjne (i dopuszczalne) terminy ponadtlenek i nadtlenek.

Anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- jest zdysocjowaną formą rodnika HO_2^{\cdot} , którego nazwa angielska *hydroperoxyl radical* wydaje się być niezbyt fortunna i może wprowadzać w błąd sugerując, że mamy do czynienia z nadtlenkiem. Trudno o inne polskie tłumaczenie tego terminu niż rodnik wodoronadtlenkowy czy hydronadtlenkowy (co również może wprowadzać w błąd). Czy nie prościej byłoby nazwać ten związek ponadtlenkiem wodoru?

Enzym katalizujący reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (nie „rodnika nadtlenkowego”!)



to oczywiście **dysmutaza ponadtlenkowa** (a nie „nadtlenkowa”). Nadtlenek jest produktem, a nie substratem reakcji katalizowanej przez ten enzym. Mianem „dysmutazy nadtlenkowej” można byłoby określić raczej katalazę, która katalizuje reakcję dysmutacji nadtlenku wodoru



lecz na szczęście mocno zakorzeniona nazwa zwyczajowa zapobiega kolejnemu zamieszaniu terminologicznemu.

Nawiasem mówiąc, niezupełnie ścisła jest informacja zawarta na s. 591 podręcznika (o co już nie można mieć pretensji do tłumaczy). Peroksydazy redukują nie tylko „nadtlenki alkilu” ROOH (jeśli pojęciem alkilu rozumiemy rodnik węglowy), lecz również (jeśli nie przede wszystkim) nadtlenek wodoru. Jakkolwiek „klasyczne” peroksydazy są oczywiście białkami hemowymi, to bardzo ważna (zwłaszcza w komórkach ssaków) peroksydaza glutationowa nie jest hemoproteiną.

Grzegorz Bartosz

Łódź, dn. 1 lipca 1997 r.

Prof. dr hab. Zofia Zielińska
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
Instytut im. Nenckiego
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

Wielce Szanowna Pani Profesor

Przesyłam w załączeniu sprawozdanie z Konferencji „Aktualne kierunki badań w biochemii i biotechnologii” z uprzejmą prośbą o zamieszczenie w „Postęпах Biochemii”.

Łączę wyrazy szacunku i poważania,
a także najserdeczniejsze pozdrowienia.

Zofia Walter

**Acta
Biochimica
Polonica**

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

Sprawozdanie z Konferencji „Aktualne kierunki badań w biochemii i biotechnologii”

W dniach 12—14 grudnia 1996 roku w Łodzi odbyła się druga Ogólnopolska Konferencja Naukowa na temat „Aktualne kierunki badań w biochemii i biotechnologii”. Konferencję zorganizowały Katedry Uniwersytetu Łódzkiego: Genetyki Molekularnej, Cytobiochemii, Biologii Ogólnej, Fizjologii i Biochemii Roślin oraz Zakład Genetyki Drobnoustrojów. Współorganizatorami były: Łódzki Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Komitet Badań Naukowych PAN, który częściowo sfinansował Konferencję.

Konferencja została poświęcona pamięci profesora Antoniego Dmochowskiego w setną rocznicę Jego urodzin. Profesor Dmochowski był jednym z założycieli Uniwersytetu Łódzkiego w 1945 roku, twórcą pierwszej uniwersyteckiej Katedry Biochemii w Polsce i organizatorem Zakładu Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Łódzkiego (przekształconego w 1949 w Akademię Medyczną). Był wychowawcą kilku pokoleń biochemików, pracujących obecnie w Polsce i za granicą. Profesor charakteryzował się wielką pasją naukową. Zainicjował kierunki badań, z wielkim wyczuciem tego, co będzie ważne w rozwoju biochemii. W swej pracy szczególną uwagę poświęcał wychowaniu i właściwemu kształceniu studentów i młodej kadry.

1995 roku Polskie Towarzystwo Biochemiczne uchwaliło nagrodę im. Profesora Dmochowskiego za osiągnięcia dydaktyczne, przyznaną po raz pierwszy w 1996 roku. Środowisko łódzkie jest dumne, że przy bardzo dużej konkurencji, pierwszą nagrodę za podręcznik „Cytobiochemii” otrzymała wychowanka Profesora, prof. dr hab. Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz, a wyróżnienie — prof. dr hab. Grzegorz Bartosz za książkę „Dwa oblicza tlenu”.

Obrady rozpoczęła sesja inauguracyjna, a dalszy program obejmował pięć sesji tematycznych i Konferencję Okrągłego Stołu.

Tematy poszczególnych sesji były podyktowane kierunkami badań prowadzonymi aktualnie przez kierowników katedr organizujących Konferencję, wywodzących się bezpośrednio lub pośrednio ze szkoły Profesora Dmochowskiego. W większości przypadków badania te były zainicjowane jeszcze w czasie czynnej pracy naukowej Profesora.

Uroczyste otwarcie Konferencji odbyło się w auli im. Antoniego Dmochowskiego w Gmachu Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UŁ. Obrady rozpoczęła przewodnicząca Konferencji prof. dr hab. Zofia Walter, a następnie zabrali głos: prof. dr hab. Stanisław Liszewski, rektor UŁ, prof. dr hab. Jerzy Kroh, członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk, Prezydent Miasta Łodzi, prof. dr hab. Wanda Leyko, która po Profesorze Dmochowskim objęła kierownictwo Katedry Biochemii, prof. dr hab. Maria Olszewska, przewodnicząca Łódzkiego Oddziału Polskiej Akademii Nauk oraz prof. dr hab. Liliana Konarska, przewodnicząca Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Otwarcie Konferencji zakończył wykład prof. Leokadii Kłyszajko-Stefanowicz, na temat „Życie i działalność Profesora Antoniego Dmochowskiego”.

Wykłady inauguracyjne zostały wygłoszone przez prof. dr hab. Marię Olszewską na temat „Gatunkowo i tkankowo-specyficzna metylacja cytozyny u roślin wyższych”, oraz przez prof. dr hab. Marka Gniazdowskiego na temat „Czego dowiadujemy się o mechanizmach działania leków przeciwnowotworowych z badań układów subcelularnych”.

Sesje naukowe Konferencji to:

„Wpływ mutagenów chemicznych na strukturę genomu i wybrane procesy metaboliczne” (organizator: prof. dr hab. Zofia Walter); „Biotechnologia ze szczególnym uwzględnieniem inżynierii genetycznej” (organizator: prof. dr hab. Adam Jaworski); „Białka komórek prawidłowych i nowotworowych” (organizatorki: prof. dr hab. Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz i prof. dr hab. Wanda Małgorzata Krajewska); „Hemostaza u kręgowców” (organizatorzy: prof. dr hab. Tadeusz Krajewski i prof. dr hab. Barbara Wachowicz); „Biotechnologia roślin” (organizator: prof. dr hab. Henryk Urbanek).

W ramach sesji wygłoszone zostały 34 referaty naukowe oraz zaprezentowano 58 komunikatów w formie posterów, połączonych z ustną prezentacją i ożywionymi dyskusjami.

Tematem Obrad Okrągłego Stołu była „Technika elektroforezy pojedynczych komórek (comet assay) w ocenie uszkodzeń DNA” (organizatorzy: dr hab. Janusz Błasiak i dr hab. Krzysztof Szyfter).

W ramach Konferencji odbyło się również Zebranie Sekcji Mutagenety PTG i Polskiej Sekcji EEMS, któremu przewodniczył dr hab. Krzysztof Szyfter.

W Konferencji uczestniczyło około 150 osób z całej Polski oraz trzech gości zagranicznych: prof. Anna Ferraro z Uniwersytetu La Sapienza w Rzymie, prof. Stan Heptinstall z Uniwersytetu w Nottingham (Wielka Brytania) i dr Michael Bushell z Uniwersytetu w Surrey (Wielka Brytania). Ponadto w Konferencji brali udział studenci IV i V roku studiów specjalności: biochemia, biofizyka i genetyka oraz nie zgłoszeni jako formalni uczestnicy, a zainteresowani wybranymi tematami zjazdowymi, pracownicy łódzkich placówek naukowych, co powiększyło ilość uczestników do 200 osób.

Konferencja stała się okazją do wielu kontaktów naukowych, wymiany doświadczeń, nawiązania współpracy, a także spotkań towarzyskich. W dniu otwarcia Konferencji w godzinach wieczornych w Centrum konferencyjnym miało miejsce spotkanie towarzyskie przy świecach, a także dzień później spektakl w Teatrze Wielkim oraz wycieczka po Łodzi w sobotnie przedpołudnie.

W naszym przekonaniu Konferencja odegrała dużą rolę w integracji placówek naukowych w Polsce, pozwoliła na wymianę doświadczeń, nawiązanie współpracy i niezwykle cenne, bezpośrednie dyskusje badaczy, w zakresie reprezentowanych na sesjach kierunków naukowych.

Zofia Walter

II Zjazd Stypendystów Howard Hughes Medical Institute z Europy Środkowej i Wschodniej

Między 24 a 27 czerwca 1997 w warszawskim hotelu Sheraton odbyło się drugie z rzędu spotkanie Międzynarodowych Stypendystów Instytutu Medycznego Howarda Hughesa (HHMI), wybranych w 1995 r. spośród ponad 2000 kandydatów. HHMI, największa instytucja filantropijna w Stanach Zjednoczonych, zorganizował to spotkanie, by zwrócić uwagę na ważne badania biomedyczne prowadzone w tym rejonie Europy. W 1995 r. HHMI przyznał 5-letnie granty na ogólną sumę 15 milionów dolarów przeznaczone na finansowanie badań naukowców w ich własnych instytucjach. Dwie trzecie z tych grantów wspierają wspólne badania ze współpracującymi badaczami z USA, Europy Zachodniej, Japonii i Australii. Spośród Międzynarodowych Stypendystów HHMI 35 pochodzi z Rosji, 14 z Węgier, 12 z Republiki Czeskiej, 10 z Polski, 6 ze Słowacji, 3 z Litwy, 3 z Ukrainy, 2 z Estonii, 1 z Białorusi i 1 z Łotwy. Wysokość grantu wynosi od 25 do 35 tysięcy dolarów USA rocznie.

Czerodniowa konferencja rozpoczęła się wieczorem 24 czerwca wystąpieniami ministra spraw zagranicznych RP i czołowych osobistości polskiego życia naukowego oraz zasadniczym przemówieniem Dr Purnella Choppina, prezydenta HHMI. Następnego wieczoru odbyła się interesująca dyskusja poświęcona bieżącej polityce naukowej w Polsce. Pozostała część konferencji poświęcona była na wystąpienia naukowców dotyczące wyników ich badań. Przedstawiono w sumie 73 doniesienia ustne i 13 plakatowych z następujących dziedzin: Zwijanie i oddziaływanie białek, Neuropeptydy, Kanały i pompy jonowe, Motory i mięśnie, Regulacja transkrypcji, Kompleksy białko-DNA, Nowe systemy i narzędzia genetyki, Molekularne aspekty funkcjonowania komórek i wirusów, Morfologia i mechanizmy funkcjonowania mózgu, Loci genetyczne: organizacja, charakterystyka i ewolucja, Syntezy i modyfikacje związków chemicznych o znaczeniu biologicznym, Mechanizmy molekularne chorób, Plastyczność neuronalna, Receptory i błony, Onkogeneza i supresja nowotworów, Enzymy: aktywność i struktura, Organizacja i ekspresja genów, Przekazywanie sygnałów i oddziaływania międzykomórkowe.

Wystąpienia i doniesienia plakatowe były bardzo interesujące i stały na dobrym międzynarodowym poziomie (książka zawierająca streszczenia wystąpień i plakatów znajduje się w posiadaniu Redakcji Postępów Biochemii i może być udostępniona na życzenie).

Instytut Medyczny Howarda Hughesa finansuje oprócz programu dla Europy Środkowej i Wschodniej trzy inne programy regionalne na ogólną sumę 53 milionów dolarów, które wspierają badania Międzynarodowych Stypendystów w 19 krajach na całym świecie. Głównym obszarem działania HHMI pozostają jednak Stany Zjednoczone, gdzie Instytut finansuje badania kilkuset wybitnych naukowców z dziedziny biomedycyny, pracujących w różnych uniwersytetach i instytucjach naukowych.

Przygotował
A. Jerzmanowski



Zakład Badawczo-Wdrożeniowy i Inżynierii Genetycznej TERPOL Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne SA w Sieradzu

Szanowni Państwo,

przedstawiamy ofertę naszych usług w zakresie inżynierii genetycznej oraz wysokiej jakości produktów dla biologii molekularnej.

Zakład od 1989 roku prowadzi prace badawcze w dziedzinie biotechnologii opartej na metodach inżynierii genetycznej. Posiadamy wieloletnie doświadczenie w stosowaniu metod biologii molekularnej: amplifikacji DNA metodą PCR, klonowania i sekwencjonowania DNA, ekspresji heterologicznych białek w *Escherichia coli*, izolowania i oczyszczania białek rekombinacyjnych otrzymanych w *E. coli*. W Zakładzie po raz pierwszy w Polsce otrzymano oczyszczone i potwierdzone przez analizę sekwencji aminokwasowej białko rekombinacyjne. Wiele z opracowanych oryginalnych rozwiązań technologicznych chronionych jest patentami.

Współpracujemy z szeregiem placówek naukowych w kraju.

Dyrektorem naukowym Zakładu jest prof. dr hab. Andrzej Plucienniczak, kierownikiem dr Andrzej Szczepanek.

Oferujemy usługi w zakresie:

- technik inżynierii genetycznej: izolowanie DNA z otrzymanego materiału, klonowanie, konstrukcja wektorów plazmidowych
- amplifikacji DNA metodą PCR
- ekspresji heterologicznych białek w *Escherichia coli*
- izolowania rekombinowanych białek z komórek *E. coli*
- oczyszczania białek metodami chromatograficznymi.

Ponadto posiadamy w sprzedaży:

- termostabilną polimerazę DNA z *Thermus aquaticus*
- endoproteinazę: czynnik Xa
- rekombinacyjne fragmenty białek strukturalnych wirusów HIV-1, HIV-2
- zestaw diagnostyczny do wykrywania wirusa HBV metodą PCR
- wzorce mas DNA (w zakresie od 30 do 2000 par zasad)
- własne wektory ekspresyjne.

Zespół naukowy ZBWIG posiada wieloletnie doświadczenie (od 1986 r.) w pracach badawczych w wymienionym zakresie. Zainteresowanym przesyłamy aktualny katalog. Ceny konkurencyjne, przy dużych zamówieniach możliwość uzyskania rabatu.

Szczegółowych informacji udziela Państwu:

dr Andrzej Szczepanek, mgr inż. Elżbieta Man, mgr Małgorzata Urbaniak,
Zakład Inżynierii Genetycznej TERPOL, Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne SA
ul. POW 57, 98-200 Sieradz, tel. (043) 220586 do 88 w. 208, 224548, fax 227105

Enzymes

- | | | |
|----------------|--|----------------|
| Review | dUTP pyrophosphatase as a potential target for chemotherapeutic drug development
Evan M. McIntosh and Robert H. Haynes | 159-172 |
| Minireview | Retention of glycosyltransferases in the Golgi apparatus
Ewa Jaśkiewicz | 173-180 |
| Regular papers | Characterization of the oligosaccharide component of arylsulfatase B from rat liver
Małgorzata Przybyło and Anna Lityńska | 181-190 |
| | The phosphorylation sites of ribosomal P proteins from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells by endogenous CK-2, PK60S and RAP protein kinases
Aleksandra Boguszewska, Ryszard Szyszka and Nikodem Grankowski | 191-200 |
| | N-Acetylneuraminic acid, phosphate and thiol groups of pyruvate kinase isoenzymes from Morris hepatoma 7777 and normal rat liver
Jan Ignacak and Maria Gumińska | 201-208 |
| | Synthesis of γ-chaconine and γ-solanine are catalyzed in potato by two separate glycosyltransferases: UDP-glucose:solanidine glycosyltransferase and UDP-galactose:solanidine galactosyltransferase
Jan Zimowski | 209-214 |
| | Transformation of 1-O-(indole-3-acetyl)-β-D-glucose into di-O-(indole-3-acetyl)-D-glucose catalysed by enzyme preparations from corn seedlings
Adriana Szmidt-Jaworska, Jacek Kęsy and Jan Kopcewicz | 215-220 |
| | Expression, purification and kinetic properties of human recombinant phospholipase C δ3
Tadeusz Pawełczyk and Andrzej Matecki | 221-230 |

Nucleic acids and gene expression

- | | | |
|-------------|--|----------------|
| Minireviews | Modification of pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides
Ryszard Kole | 231-238 |
|-------------|--|----------------|

	The dynamic nature of plant mitochondrial genome organization	
	Hanna Jańska and Magdalena Wołoszyńska	239-250
Regular papers	Expression of the yeast <i>NAM9</i> gene coding for mitochondrial ribosomal protein	
	Magdalena Boguta, Agnieszka Chacińska, Marcin Murawski and Barbara Szcześniak	251-258
	Nucleotide sequence of nuclear tRNA^{Gly} genes and tRNA^{Gly} pseudogenes from yellow lupin (<i>Lupinus luteus</i>): Expression of the tRNA^{Gly} genes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	
	Przemysław Nuc, Katarzyna Nuc, Zofia Szweykowska-Kulińska and Jerzy Pawełekiewicz	259-274
	Molecular cloning and expression in <i>Escherichia coli</i> of a gene coding for bovine S100A1 protein and its Glu32→Gln and Glu73→Gln mutants	
	Krystyna Bolewska, Hanna Kozłowska, Grażyna Goch, Beata Mikołajek and Andrzej Bierzyński	275-284

Glycoproteins and glycolipids

Regular papers	Determination of single monosugars bound to a peptide	
	Hubert Krotkiewski and Bożena Krotkiewska	285-292
	Immunochemical characterization of lipopolysaccharide from glucose-nonfermenting Gram-negative clinical bacterial isolate	
	Małgorzata Mieszala, Joanna Kübler and Andrzej Gamian	293-300
	The <i>N</i>-acetylgalactosamine and lactosamine specific lectin from <i>Iris hybrida</i> leaves	
	Mirosława Ferens-Sieczkowska, Magdalena Orczyk-Pawłowicz and Bronisława Morawiecka	301-308

Oxidative stress

Regular papers	Studies on the nature of genotoxic and cytotoxic effects induced by hydralazine	
	Jadwiga Marczevska and Jadwiga H. Kozirowska	309-314
	Effect of high temperature treatment of <i>Vicia faba</i> roots on the oxidative stress enzymes in leaves	
	Maria Filek, Renata Bączek, Ewa Niewiadomska, Marta Pilipowicz and Janusz Kościelniak	315-322

Metabolism and transport

- Regular papers
- Ketone bodies activate gluconeogenesis in isolated rabbit renal cortical tubules incubated in the presence of amino acids and glycerol**
Tadeusz Lietz, Katarzyna Winiarska and Jadwiga Bryła **323-332**
- Specificity of the tonoplast transport of the oleanolic acid monoglycosides in the vacuoles from *Calendula officinalis* leaves**
Anna Szakiel and Wirginia Janiszowska **333-338**
- Short communication
- Activity of liver proteases in experimental methanol intoxication**
Elżbieta Skrzydlewska, Zdzisław Skrzydlewski and Krzysztof Worowski **339-342**

Cancer research and clinical biochemistry

- Minireview
- Tumor cell N-glycans in metastasis**
Piotr Laidler and Anna Lityńska **343-358**
- Short communication
- Adenosine deaminase activity in blood of patients with stable angina pectoris**
Maria Kopff, Irena Zakrzewska, Jerzy Klem, Jadwiga Kalinowska-Fuchs and Marek Strzelczyk **359-362**

Miscellaneous

- Why not to benefit from Internet resources: A list of useful WWW addresses**
Władysław Pajdak **363-364**
- Book review** **365-365**

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

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

Prenumerata krajowa dla instytucji:
60. zł

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

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

