

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 44, NR 1, 1998

Nobel 1997 z chemii	2
Molekularne mechanizmy apoptozy	8
Reaktywne formy tlenu a apoptoza	22
Antyterminacja transkrypcji	32
Ekspresja egzogennych genów	40
Regulacja ekspresji genu DMD	48
Antysensowe nukleotydy — rRNA	55
Małe proteoglikany śródmiąższowe	64
Oddziaływania rizobia- <i>Leguminosae</i>	72
Sprawozdania	83

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
z przyjemnością informuje Naszych Czytelników
że w roku 1997 medal imienia

Leona Marchlewskiego

otrzymał nasz Kolega, Jego Magnificencja

profesor Aleksander Koj

Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego

Laureatowi przekazujemy serdeczne gratulacje oraz wyrazy naszej radości.

Przy okazji informujemy, że Medal imienia Leona Marchlewskiego przyznawany jest przez Komitet Biochemii i Biofizyki PAN corocznie od 1988 roku za wybitne osiągnięcia badawcze z zakresu biochemii i biofizyki.

Medalem im. Leona Marchlewskiego zostali wcześniej uhonorowani profesorowie:

Tadeusz Korzybski, David Shugar, Lech Wojtczak, Jerzy Pawełekiewicz, Tadeusz Baranowski, Kazimierz Lech Wierzchowski, Wojciech Stec i Mieczysław Chorąży.

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

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland
E-mail — ptbioch @ nencki.gov.pl.
tel. 659-85-71 w. 352
bezp. 658-20-99
wtorki 14—18

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAZYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
LILIANA KONARSKA
tel. 659-85-71 w. 352
bezp. 658-20-99
wtorki 15—18
ANNA SZAKIEL
tel. 823-20-46
IWONA FIJAŁKOWSKA
tel. 659-70-72 w. 1123
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 813-05-15
HANNA LASKOWSKA
pon. i czw. 14-16
tel. 659-85-71 w. 441

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
ANDRZEJ GINDZIEŃSKI
(Białystok)
LESZEK KACZMAREK
(Warszawa)
EWA SIKORA
(Warszawa)
WIESŁAW JERZY SMAGOWICZ
(Warszawa)
ANNA SZAKIEL
(Warszawa)
KAZIMIERZ LECH
WIERZCHOWSKI
(Warszawa)
JANUSZ ZIMOWSKI
(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.

SPIS TREŚCI CONTENTS

M. Napierała

Nagroda Nobla z chemii za 1997 rok — mitochondrialna syntaza ATP Nobel Prize in chemistry for 1997: Mitochondrial ATP synthase LECH WOJTCZAK	2
Nagroda Nobla dla Jensa Christiana Skou za odkrycie ATPazy Na⁺-K⁺ Nobel Prize for Jens Christian Skou for discovery of Na ⁺ -K ⁺ ATPase IRENA KŁODOS	6
Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R Molecular mechanisms of apoptosis induced by activation of membrane receptors from TNF-R superfamily BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT	8
Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie Role of reactive oxygen species in apoptosis GRZEGORZ BARTOSZ	22
Antyterminacja transkrypcji u bakterii i bakteriofagów Transcription antitermination in bacteria and bacteriophages KRYSZYNA I. WOLSKA	32
Kontrolowana ekspresja egzogennych genów w komórkach ssaków Controlled expression of exogenous genes in mammalian cells JACEK JAWORSKI	40
Regulacja ekspresji genu DMD człowieka. Przykład wielokrotnego wykorzystania informacji genetycznej Regulation of human DMD gene expression. An example of multiple utilization of genetic information DOBRAWA NAPIERAŁA, RYSZARD SŁOMSKI	48
Wykorzystanie strategii antysensowych oligonukleotydów w badaniach ekspozycji i lokalizacji rRNA na powierzchni pojednostek rybosomalnych Utilizing of antisense oligonucleotide strategy in study of exposing and localization of rRNA on surface of ribosomal subunits ANDRZEJ SOBKIEWICZ, TOMASZ TWARDOWSKI	55
Małe proteoglikany śródmiąższowe — genetyczne różnice i podobieństwa Small interstitial proteoglycans — genetic differences and similarities RAFAŁ BOBIŃSKI, KRYSZYNA OLCZYK, EWA KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA	64
Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin Biochemical and molecular basis of plant-microbe symbiotic interactions ANNA JAKUBOWSKA, STANISŁAW KOWALCZYK	72
Sprawozdania Reports	83

Nagroda Nobla z chemii za 1997 rok — mitochondrialna syntaza ATP

Nobel Prize in chemistry for 1997: Mitochondrial ATP synthase

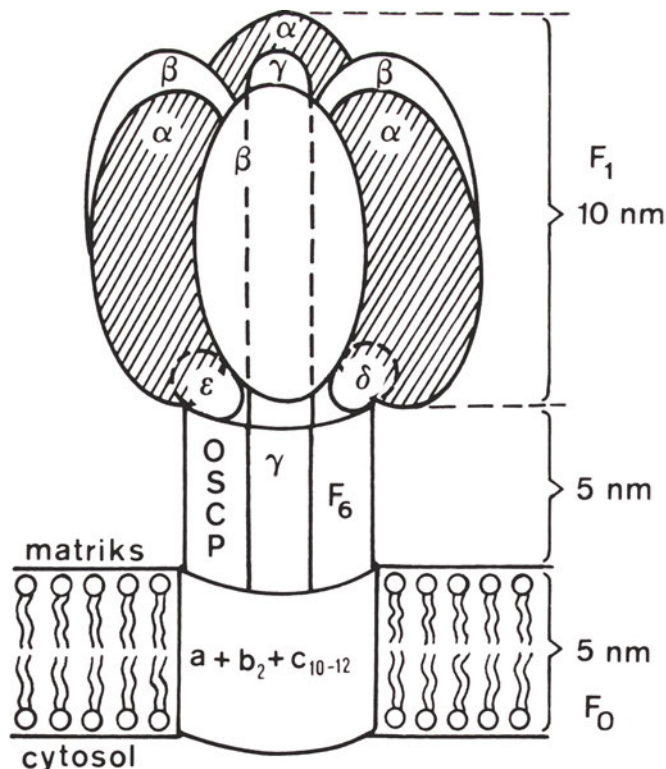
LECH WOJTCZAK*

Tegoroczna Nagroda Nobla z chemii została podzielona pomiędzy J e n s a C. S k o u, wyróżnionego za odkrycie ATP-azy sodowo-potasowej (patrz odrębne opracowanie w niniejszym numerze *Postępów Biochemii*), a Paula D. Boyera i Johna E. Walkera, nagrodzonych za badania nad mechanizmem działania mitochondrialnego enzymu syntetyzującego ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji.

By lepiej zrozumieć, na czym polega doniosłość odkryć tych dwóch ostatnich badaczy, cofnijmy się o 19 lat, kiedy to w roku 1978 Nagrodą Nobla z chemii uhonorowany został Peter Mitchell za „chemiosmotyczną” teorię sprzężenia energetycznego. Zgodnie z nią źródłem energii dla syntezy ATP jest potencjał elektryczny na wewnętrznej błonie mitochondriów, błonie tylakoidów i błonie komórkowej bakterii. Potencjał ten tworzy się na skutek przemieszczania jonów wodorowych w wyniku procesów oksydoredukcyjnych w mitochondriach, transportu elektronów w fotosyntetycznym łańcuchu oksydoredukcyjnym w chloroplastach, różnych procesów chemicznych w bakteriach, a wreszcie bezpośrednio w wyniku absorpcji kwantów światła w niektórych bakteriach fotosyntetyzujących. Jak z tego widać, teoria Mitchella w sposób jednolity ujmuje zasadę „sprzężenia energetycznego” w całym świecie żywym [1-3].

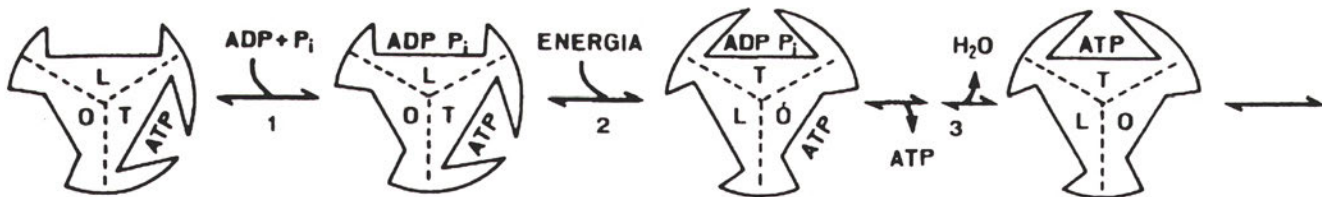
Niezależnym torem szły prace nad zidentyfikowaniem i wyodrębnieniem enzymu odpowiedzialnego za syntezę cząsteczki ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego (P_i). Pionierem tych badań, zapoczątkowanych już pod koniec lat pięćdziesiątych, był Efraim Racker. On to pierwszy wyodrębnił z mitochondriów „czynniki sprzężenia”, które okazały się pojedynczymi łańcuchami peptydowymi lub dużymi kompleksami białkowymi niezbędnymi do tego, by na błonie mitochondriów mógł przebiegać proces syntezy ATP kosztem procesów oksydoredukcyjnych. Przy braku źródła

energii pod postacią reakcji utleniania natomiast czynnik ten warunkował proces odwrotny, to jest hydrolizę ATP do ADP i P_i . Obecnie wiemy, że syntaza ATP składa się z trzech, dających się dobrze wyróżnić w mikroskopie elektronowym, części: bazalnej, ściśle związanej z wewnętrzną błoną mitochondrialną, oznaczanej symbolem F_0 , katalitycznej, znajdującej się pod postacią kulistej „głowy” na wewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony i oznaczanej jako F_1 , oraz łączącej obie części cienkiej „szyjki” (Ryc. 1). Każda z tych części jest kompleksem złożonym z kilku lub kilkunastu łańcuchów peptydowych. „Głowa”, której średnica wynosi około 10 nm, składa się z naprzemian usytuowanych trzech podjednostek α i trzech β . Mimo że podjednostki obu rodzajów wiążą nukleotydy adeninowe, to właściwa reakcja syntezy ATP (ewentualnie



Ryc. 1. Kompleks mitochondrialnej syntazy ATP.

* Prof. dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; poczta elektroniczna: LWAC@nencki.gov.pl.



Ryc. 2. „Klasyczny” schemat zmian konformacyjnych w centrum katalitycznym syntazy ATP. Według [9]; reprodukcja za zgodą *Annual Review of Biochemistry*.

jego rozpadu w procesie odwrotnym) zachodzi na podjednostce β . W „szyjce”, długości około 5 nm, znajdujemy po jednej podjednostce γ , δ , ϵ , F_0 i OSCP. Wreszcie część podstawowa złożona jest z wysoce hydrofobowych peptydów oznaczanych literami, a, b i c i jest integralnie związana z wewnętrzną błoną mitochondrialną [4-7]. Bardzo podobnie zbudowany jest kompleks syntazy ATP w chloroplastach i u bakterii.

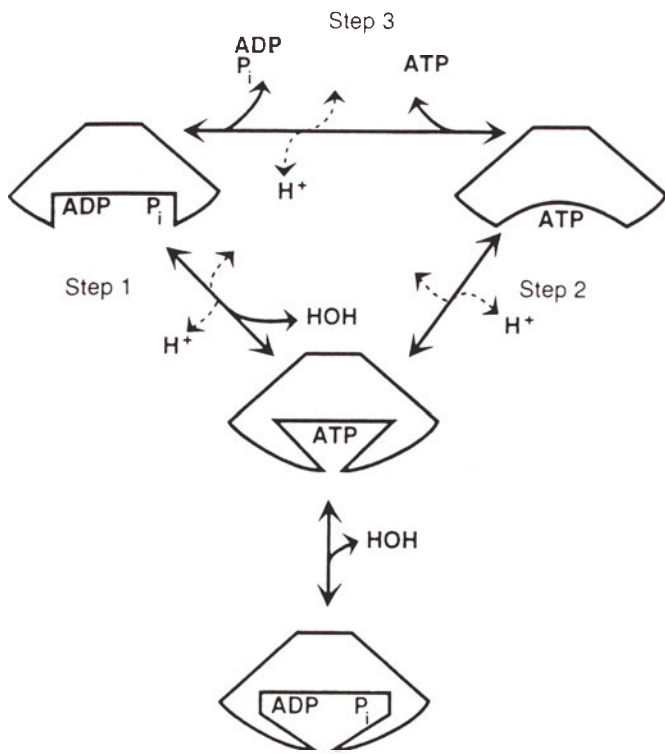
Wytworzona przez funkcjonujący łańcuch oddechowu różnica potencjału elektrycznego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (ładunek dodatni na jej zewnętrznej powierzchni i ujemny na powierzchni wewnętrznej) oraz różnica stężenia jonów wodorowych (alkaliczne pH wewnątrz) jest siłą napędzającą ruch jonów wodorowych do wnętrza mitochondrionu przez „kanał protonowy” mieszczący się w bazalnej części kompleksu, czyli w podjednostce F_0 . Ten strumień protonów dostarcza energii dla syntazy ATP. Reakcja ta jest łatwo odwracalna: hydroliza ATP przez kompleks wywołuje prąd protonów w kierunku przeciwnym i zdolna jest do budowy potencjału elektrycznego oraz gradientu pH po obu stronach błony. W związku z tym kompleks, o którym mowa, może być określany zarówno mianem syntazy ATP jak i ATP-azy F_0F_1 .

Na tym etapie naszej wiedzy powstało pytanie o *mechanizm* tego katalitycznego procesu. Jak wiadomo, równowaga reakcji $ADP + P_i \rightleftharpoons ATP + H_2O$ jest bardzo przesunięta w lewą stronę. Fakt, że zachodzi ona w środowisku wodnym, jeszcze bardziej przesuwają ją w lewo (w kierunku hydrolizy a nie syntezy z odłączeniem wody). Przebieg reakcji w prawo wymaga zatem wkładu znacznych ilości energii lub ... środowiska bezwodnego. Wymaganiom tym wychodzi na przeciw koncepcja jednego z tegorocznych laureatów, Paula D. Boyera, przyjmująca, że bezpośrednim źródłem energii dla syntezy ATP jest odpowiednia zmiana *konformacji* cząsteczki enzymu (syntazy), zbliżająca do siebie cząsteczki ADP i P_i i niejako „wymuszająca” ich połączenie się ze sobą [8, 9]. Jeśli ponadto wyobrazimy sobie, że dzieje się to w miejscu katalitycznym w jakiś sposób izolowanym od wodnego środowiska, zrozumiemy, że wymogi termodynamiczne reakcji syntezy mogą być spełnione. Zgodnie z koncepcją Boyera to raczej odłączenie już wytworzonej cząsteczki ATP od enzymu niż jej synteza wymaga wkładu energii.

Ogólne zasady teorii konformacyjnej ilustruje rycina 2. Przyjmuje ona istnienie w kompleksie syntazy

trzech miejsc katalitycznych, odpowiadających prawdopodobnie trzem podjednostkom β w „głowie” enzymu. W pozycji wyjściowej (pierwsza od lewej) enzym związany jest ściśle z jedną cząsteczką ATP. Miejsce katalityczne będące w konformacji L („luźnej”) wykazuje powinowactwo do ADP i P_i , które zostają luźno związane (reakcja 1). Teraz, w reakcji wymagającej wkładu energii (reakcja 2), następuje z jednej strony niejako „zamknięcie” i zbliżenie do siebie ADP i P_i (konformacja T, czyli „ściśła”, ang. *tight*), z drugiej — „otworzenie” miejsca dotychczas ściśle wiążącego cząsteczkę ATP, czyli przejście tego miejsca w konformację „otwartą” (O). Konsekwencją tych przekształceń jest całkowite odłączenie cząsteczki ATP od miejsca O oraz chemiczne połączenie się ADP i P_i w miejscu T z wytworzeniem ATP (reakcja 3). I w ten sposób wracamy do sytuacji wyjściowej. W najnowszej, zmodyfikowanej wersji udział energii pod postacią strumienia protonów przewidziany jest na każdym z tych trzech etapów przekształceń. Ilustruje to na przykładzie tylko jednego miejsca katalitycznego rycina 3. Należy zwrócić uwagę, że oba schematy przyjmują pełną odwracalność wszystkich reakcji, czego odzwierciedleniem jest stwierdzona przez Boyera wymiana izotopowa: ^{32}P między ATP i fosforanem nieorganicznym oraz ^{18}O między ATP i wodą.

Konformacyjna teoria Boyera w swych zasadniczych zrębach powstała już w latach sześćdziesiątych. Tłumaczy ona wiele stwierdzonych doświadczalnie faktów. Nie wyjaśnia jednak bezpośredniego związku między potencjałem elektrochemicznym na wewnętrznej błonie mitochondrialnej i „napędzanym” tym potencjałem strumieniem protonów a zmianami konformacyjnymi w kompleksie syntazy ATP. Wprawdzie opublikowany przez Boyera w 1993 r. [10] schemat (Ryc. 3) uwzględnia już przemieszczenia protonów, lecz jest to pokazane w sposób bardzo ogólnikowy, bez wchodzenia w możliwy mechanizm tego sprzężenia. Dopiero prace zespołu Johna Walkera z zastosowaniem najnowszych technik badania struktury makromolekuł, jak rentgenowska analiza kryształów, mikroskopia elektronowa najwyższej rozdzielczości oraz magnetyczny rezonans jądrowy, a także użycie specyficznych inhibitorów i analogów ATP, pozwoliły na dokładne prześledzenie całego procesu katalizy na poziomie molekularnym [11, 12]. Po pierwsze, precyzyjnie określono miejsca wiążące nukleotydy adeninowe (ADP lub ATP) zarówno w podjednostce katalitycznej β jak i w nie-katalitycznej α .

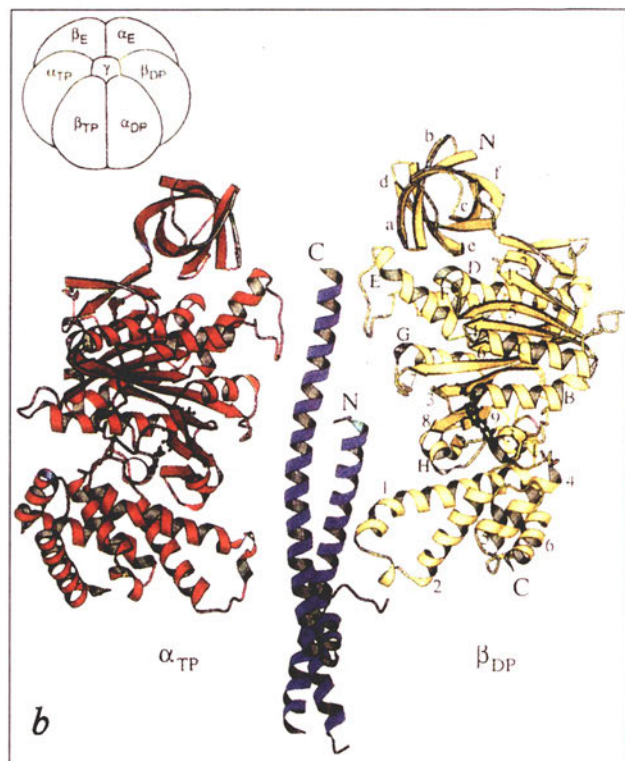
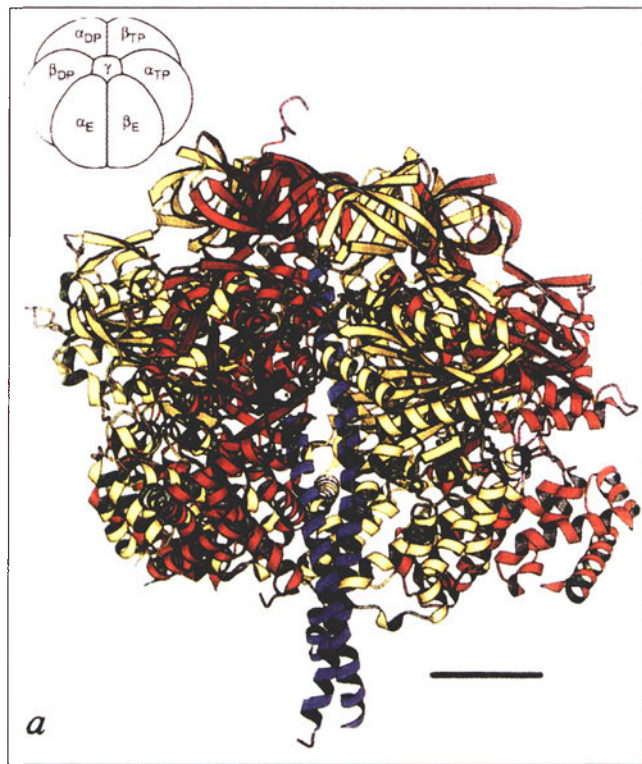


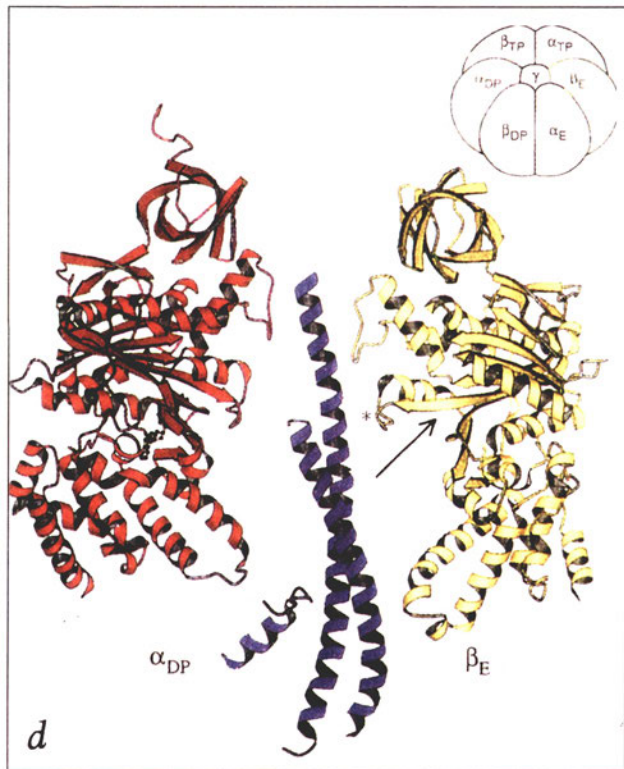
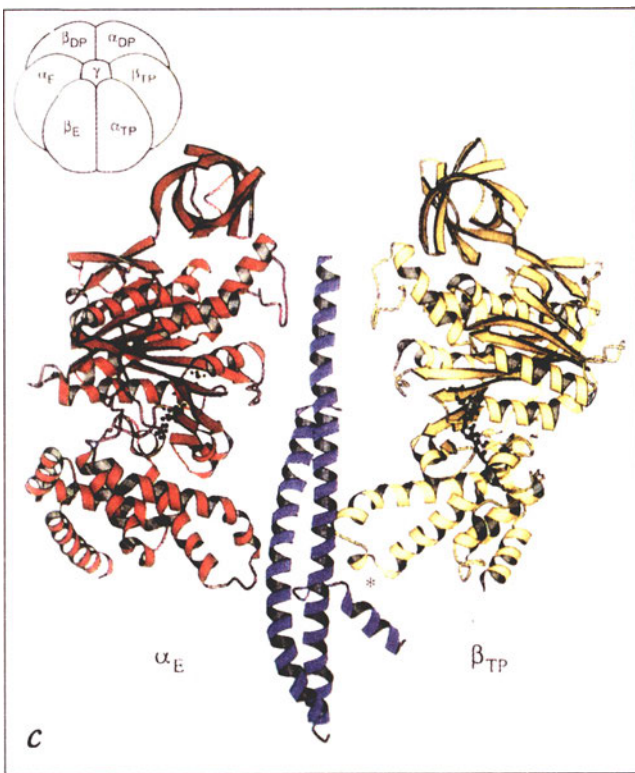
Ryc. 3. Najnowsza wersja teorii konformacyjnej Boyera. Dla uproszczenia pokazano tylko jedno miejsce katalityczne. Przebieg syntezy ATP rozpoczyna się od sytuacji pokazanej w lewym górnym rogu i przebiega w kierunku przeciwnym ruchom wskazówek zegara. Według [10]; reprodukcja za zgodą Elsevier Science Amsterdam.

Zidentyfikowano zaangażowane w tym związku reszty aminokwasowe. A następnie pokazano, na czym polegają zmiany struktury tych miejsc wiążących w czasie przejść konformacyjnych między stanami O, L i T. Okazało się, że miejsca te sąsiadują bezpośrednio z podjednostką γ , stanowiącą trzon „szyjki” łączącej „głowę” (F_1) z częścią podstawową tkwiącą w błonie mitochondrialnej (F_0). Molekularny model tych zmian dał wynik wręcz sensacyjny. Wykazano, że każdej zmianie konformacji musi towarzyszyć obrót kompleksu F_1 względem podjednostki γ o pewien kąt, tak że w wyniku pełnego cyklu, w którym zachodzi synteza trzech cząsteczek ATP, następuje pełny obrót „głowy” o 360° (Ryc. 4). W przypadku hydrolizy ATP wszystkie zmiany, a więc i ruch obrotowy kompleksu, przebiegają w odwrotnym kierunku. Znając specyficzną aktywność syntazy ATP, można nawet obliczyć, że przy maksymalnej jej aktywności ten ruch wirowy „głowy” względem „szyjki” odbywa się z szybkością 130-270 obrotów na sekundę (!). Z ostatnich wypowiedzi Walkera [13] należy wnosić, że to raczej podjednostka γ wiruje względem nieruchomej (wobec błony mitochondrialnej) „głowy”, a nie „głowa” względem nieruchomej podjednostki γ .

Ostatnio, w niezwykle efektywny sposób ruch wirowy podjednostki γ względem kompleksu $\alpha_3\beta_3$ pokazali autorzy japońscy [14]. Mianowicie izolowany kompleks F_1 unieruchamiano na szkiełku mikroskopowym pokrytym związkiem niklu w ten sposób, że podjednostka γ , dodatkowo obciążona fluorescencyj-

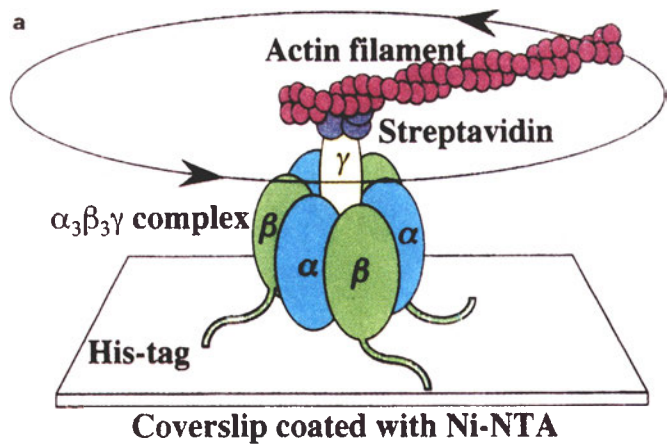
Ryc. 4. Molekularny model syntazy ATP. a — Pseudo-trójwymiarowe odzwierciedlenie całego kompleksu F_1 wraz z podjednostką γ . b, c i d — Kolejne przejścia konformacyjne towarzyszące syntezie ATP pokazane dla zespołu podjednostek α , β i γ . Poszczególne podjednostki oznaczone są różnymi kolorami: podjednostki α czerwonym, podjednostki β żółtym i podjednostka γ fioletowym. Część nukleotydu adeninowego oznaczona jest kolorem czarnym (słabo widoczna np. na panelu b w podjednostce β w okolicy domeny oznaczonej cyfrą 9). Poziomy odcinek na panelu a oznacza 2 nm. Według [11]; reprodukcja za zgodą redakcji Nature, copyright (1997) Macmillan Magazines Ltd.





nie znakowaną cząsteczką aktyny, sterczała do góry (Ryc. 5). Po dodaniu do środowiska ATP można było obserwować w mikroskopie fluorescencyjnym obrotowy ruch świecącej podjednostki γ .

Przy syntezie ATP energii do tych zmian konformacyjnych, a co za tym idzie, wirowego ruchu podjednostki γ , dostarcza w oczywisty sposób potencjał elektryczny na błonie mitochondrialnej i wywołany nim strumień jonów wodorowych, „wpadający” z przestrzeni cytoplazmatycznej do wnętrza mitochondrionu. Dzieje się to najprawdopodobniej na drodze



Ryc. 5. Schemat modyfikacji kompleksu $\alpha_3\beta_3\gamma$ dla mikroskopowej obserwacji wirowania podjednostki γ w czasie hydrolizy ATP. Według [14]; reprodukcja za zgodą redakcji *Nature*, copyright (1997) Macmillan Magazines Ltd.

protonacji i deprotonacji pewnych reszt aminokwasowych, ale szczegółowy mechanizm tych procesów pozostaje nadal niewyjaśniony.

Należy dla porządku zaznaczyć, że bardzo podobne wyniki dla bakteryjnej syntazy ATP uzyskał w ostatnich latach amerykański badacz włoskiego pochodzenia, Roderick A. Capaldi (Institute of Molecular Biology, University of Oregon) [15].

Dane osobowe Laureatów:

Paul D. Boyer, rok urodzenia 1918, emerytowany profesor w Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles.

John E. Walker, rok urodzenia 1941, pracuje w Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Wielka Brytania.

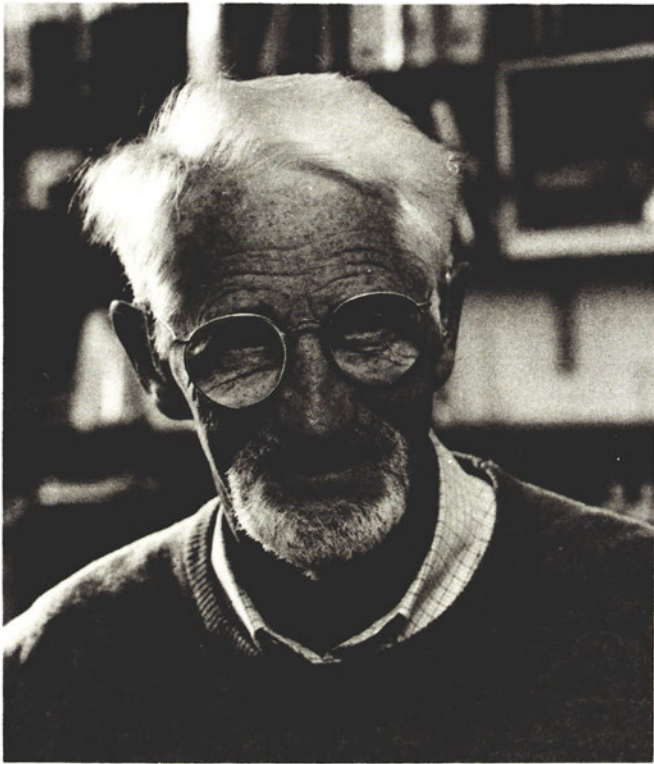
Piśmiennictwo

Opracowania przeglądowe w języku polskim oznaczono gwiazdkami (*).

1. Mitchell P (1961) *Nature* **191**: 144-148
2. Mitchell P (1966) *Biol Rev* **41**: 445-502
- 3* Bogucka K (1985) *Post Biochem* **31**: 5-28
4. Penefsky HS, Cross RL (1991) *Adv Enzymol* **64**: 173-214
5. Pedersen PL (1996) *J Bioenerg Biomembr* **28**: 389-395
- 6* Bogucka K (1986) *Post Biochem* **32**: 301-328
7. Boyer PD (1997) *Ann Rev Biochem* **66**: 717-749
8. Boyer PD (1977) *Ann Rev Biochem* **46**: 957-966
9. Cross RL (1981) *Ann Rev Biochem* **50**: 681-714
10. Boyer PD (1993) *Biochim Biophys Acta* **1140**: 215-250
11. Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE (1994) *Nature (Lond)* **370**: 621-628
- 12* Bogucka K (1997) *Kosmos* **47**: 137-146
13. Walker JE (1997) Workshop on New Perspectives in Mitochondrial Research, Padwa, wrzesień 1997; str. 17-18
14. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K jr (1997) *Nature (Lond)* **386**: 299-302
15. Capaldi RA, Aggeler R, Wilkens S, Grüber G (1996) *J Bioenerg Biomembr* **28**: 397-401

Nagroda Nobla dla Jensa Christiana Skou za odkrycie ATPazy $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

Nobel Prize for Christian Skou for discovery of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase



40 lat po odkryciu ATPazy sodowo-potasowej (ATPazy $\text{Na}^+ - \text{K}^+$) jej odkrywca, Jens Christian Skou z Uniwersytetu w Aarhus w Danii, otrzymał Nagrodę Nobla. Jak doszło do tego odkrycia, jakie jest znaczenie ATPazy $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, i jakie są jego konsekwencje dla zrozumienia podstawowych funkcji komórki?

Odkrycie ATPazy $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ zostało przygotowane wieloletnimi studiami nad lokalizacją i transportem jonów sodu i potasu. Już w latach 20.—30. wiedzano, że stężenie sodu w komórkach jest znacznie niższe, a stężenie potasu znacznie wyższe niż w płynie pozakomórkowym i przypuszczano, że błona komórkowa jest nieprzepuszczalna dla tych kationów. Z odkryciem radioaktywnych izotopów ^{24}Na i ^{42}K okazało się jednak, że oba kationy dyfundują przez błonę komórki. Na początku lat 40. Robert B. Dean przedstawił hipotezę o istnieniu w błonach komórkowych „pompy sodowej”, która aktywnie, to znaczy kosztem energii, usuwa sód z komórek. Na przełomie lat 40. i 50. Hodgkin i Huxley (Nagroda Nobla w 1963 r.) przedstawili teorię tłumaczącą wytwarzanie potencjałów czynnościowych w komórkach nerwowych selektywnymi zmianami przepuszczalności błon dla sodu i potasu. Udowodnili oni, że faza depolaryzacji jest związana z biernym napływem sodu do komórki, natomiast repolaryzacja jest rezultatem również bier-

nego wypływu jonów potasu z komórek. Powrót do stanu stacjonarnego wymagał aktywnego (wbrew gradientom elektrochemicznemu) transportu sodu z komórek na zewnątrz i potasu do wnętrza komórek. W latach 50. wykazano, że transport ten jest hamowany przez inhibitory glikolizy, nie przypuszczano jednak, że źródłem energii jest ATP. W 1953 r. Schatzman odkrył, że lek nasercowy ouabaina (digitalis) selektywnie hamuje transport Na^+ i K^+ . Zastosowanie ouabainy pozwoliło na pomiary stochiometrii aktywnego transportu. Okazało się, że transportowi 3 moli Na^+ z komórki na zewnątrz towarzyszy transport 2 moli K^+ do komórki.

Jens Christian Skou (ur. w 1918 r. w Lemvig, małym miasteczku na zachodnim wybrzeżu Jutlandii) ukończył studia medyczne w 1944 r. i rozpoczął specjalizację w chirurgii. Z powodów zdrowotnych przeszedł do pracy naukowej na Uniwersytecie w Aarhus, gdzie rozpoczął badania nad lokalnymi anestetykami. Poszukiwanie nowych środków znieczulających było palącym problemem w czasie, gdy najczęściej stosowaną narkozą były eter lub chloroform. Wiedzano, że lokalne anestetyki hamują propagację potencjałów czynnościowych w nerwach. Modelem doświadczalnym, na którym Skou prowadził badania były lipidowe monowarstwy, do których lokalne anestetyki — substancje lipofilne — wnikają. Skou wykazał, że substancje te podwyższają ciśnienie w monowarstwach, tzn. zwiększają stopień organizacji lipidów, i wysunął hipotezę, że ten zwiększony stopień organizacji warstw lipidowych hamuje działanie enzymów błonowych. Aby zbadać słuszność tej hipotezy, postanowił wbudować w monowarstwy lipidowe enzym, którego aktywność byłaby indykatorem organizacji monowarstwy. Wybór padł na acetylocholinesterazę. Skou wybrał się latem 1953 r. do Nowego Yorku aby nauczyć się preparatyki enzymu u źródła, czyli od samego Nathana. Znalazłszy się wraz z Nathanso h n e m w „letnim laboratorium” w Woods Hole, gdzie nie było odpowiednich możliwości eksperymentalnych, Skou zajął się studiowaniem literatury. Jego uwagę przyciągnęły prace nad błonowym enzymem z nerwów mątwy hydrolizującym ATP w obecności Mg^{2+} . Zastanawiał się, po co organizmowi enzym zużywający tak cenny związek jak ATP. Później, już w Nowym Yorku, nauczył się preparować acetylocholinesterazę, ale po powrocie do Aarhus postanowił zająć się „dziwnym” enzymem. Nerwy z niedostępnej w Danii mątwy zastąpił nerwami

z krabów. Po wypreparowaniu nerwów z 25 tysięcy krabów (cały Instytut Fizjologii „pachniał” krabami) i wydzieleniu frakcji mikrosomowej okazało się, że aktywność ATPazy Mg^{2+} tej frakcji zmienia się w szerokim zakresie od doświadczenia do doświadczenia. Zniechęcony tym Skou wrócił do badania mono-warstw. Jednak „dziwny” enzym nie dawał mu spokoju, toteż w następnym roku znów rozpoczął doświadczenia na nim, z podobnym skutkiem. Analizując możliwe przyczyny zmienności wyników, zwrócił uwagę na pozornie nieistotne różnice warunków doświadczalnych. W owym czasie handlowe preparaty ATP były dostępne w postaci soli barowej. Tę nierozpuszczalną w wodzie sól przeprowadzano w rozpuszczalny ATP, który neutralizowano bądź NaOH, bądź KOH. Warto tu zaznaczyć, że w owym czasie w większości prac nie podawano nawet składu soli w środowisku. Analiza danych wykazała, że używając ATP neutralizowany KOH nie wykrywano aktywności enzymu, z ATP neutralizowanym NaOH aktywność była niska, natomiast najwyższą aktywność obserwowano gdy dla wykorzystania kończących się zapasów ATP mieszano roztwory neutralizowane NaOH i KOH. Zauważenie tych korelacji doprowadziło do odkrycia ATPazy zależnej od obecności Mg^{2+} i aktywowanej przez równocześnie obecne jony Na^+ i K^+ .

W opublikowanej w 1957 r. pracy „The Influence of some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves” Skou napisał: „the crab nerve ATPase ... seems to fulfil a number of conditions that must be imposed on an enzyme ... involved in the active extrusion of sodium ions”. W 1958 r. ostatecznie potwierdził, że ATPaza $Na^+ - K^+$ z nerwów kraba jest pompą sodową wykazując, że enzym ten jest hamowany przez ouabainę.

ATPaza $Na^+ - K^+$ ma ogromne znaczenie dla (1) przywracania stanu spoczynkowego komórek nerwowych i mięśniowych po wytworzeniu potencjału czynnościowego; (2) regulacji objętości komórek, gdyż przy wymianie 3 jonów Na^+ na 2 jony K^+ przenosi ona 1 dodatni ładunek, co zmienia spoczynkowy potencjał błonowy i z kolei powoduje, że Cl^- opuszcza komórkę jednocześnie z Na^+ niwelując różnicę ciśnienia osmotycznego prowadzącą do pęcznienia komórek (związanego z równowagą Donnana); (3) transportu aktywnego wtórnego, gdzie energia zmagazynowana w postaci gradientu stężeń jonów sodu i potasu jest wykorzystywana do transportu cukrów, aminokwasów i szeregu jonów wbrew gradientowi ich stężeń.

Odkrycie ATPazy $Na^+ - K^+$ dało początek odkryciom innych ATPaz katalizujących transport jonów, jak ATPaza Ca^{2+} z siateczki sarkoplazmatycznej (uczestnicząca w regulacji skurczu mięśnia), ATPaza Ca^{2+} z błon komórkowych (usuwiająca Ca^{2+} z komórek), ATPaza $H^+ - K^+$ z żołądka (enzym ten produkuje kwas żołądkowy pompując H^+ z komórek do światła żołądka, gdzie stężenie H^+ jest $10^{6.4}$ oraz wyższe niż w komórkach). Enzymy te należą do rodziny ATPaz

typu P, tworzących intermediaty fosforowe odporne na hydrolizę w kwasie, inaczej zwanych ATPazami $E_1 - E_2$, gdzie E_1 i E_2 oznaczają dwie konformacje enzymu różniące się powinowactwem do transportowanych jonów i ATP.

W ciągu 40 lat od odkrycia ATPazy $Na^+ - K^+$ zebrano wiele danych o różnych sposobach transportu jonów przez ten enzym (np. transport K^+ z komórki i Na^+ do komórki związany z syntezą ATP), o jego strukturze i kinetyce zarówno transportu jak i reakcji enzymatycznej, nie uzyskano jednak odpowiedzi na podstawowe pytanie dotyczące mechanizmu jego działania — jak skalarny proces, jakim jest hydroliza ATP, zostaje przekształcony na kierunkowy (wektorowy) proces transportu jonów.

Irena Klodos

Piśmiennictwo

Skou, J C (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys Acta* **23**, 394-401.

Robinson J D (1997) Moving Questions: a History of Membrane Transport and Bioenergetics. People and ideas series. Oxford University Press, New York, Oxford.

Irena Klodos

Dept. of Biophysics, University of Aarhus, Ole Worms Allé 185, DK-8000 Aarhus C., Denmark. Phone: +45 89 42 29 37 fax: +45 86 12 95 99 e-mail ik@mil.aau.dk



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

Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R

Molecular mechanisms of apoptosis induced by activation of membrane receptors from TNF-R superfamily

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Receptory błonowe z nadrodziny TNF-R i ich ligandy
 - II-1. Receptory
 - II-2. Ligandy
- III. Hipotetyczny przebieg szlaków prowadzących do apoptozy
 - III-1. Białka adaptorowe pośredniczące w przekazywaniu sygnału
 - III-2. Kaspazy jako efekторы apoptozy
- IV. Prawdopodobne regulacje przebiegu przekazywania sygnału proapoptotycznego
 - IV-1. Regulacja poziomu i właściwości składników układu FAS/FAS-L
 - IV-2. Udział endogennych białek w regulacji przekazywania sygnału
 - IV-3. Białka wirusowe jako regulatory apoptozy
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. TNF-receptors superfamily and their ligands
 - II-1. Receptors
 - II-2. Ligands
- III. Hypothetical pathways leading to apoptosis
 - III-1. Adaptor proteins in apoptotic signal transduction
 - III-2. Caspases as effectors of apoptosis
- IV. Possible regulations of apoptotic signal transduction
 - IV-1. Regulation of the level and properties of components of FAS/FAS-L system
 - IV-2. Participation of endogenous proteins in regulation of signal transduction
 - IV-3. Viral proteins as regulators of apoptosis
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: TNF — czynnik martwicy nowotworu (*tumour necrosis factor*); TNF-R1/R2 — receptory TNF (*receptors TNF-R/R1*); FAS — antygen powierzchniowy, jeden z receptorów z nadrodziny TNF; FAS-L — ligand receptora FAS; DD — domena śmierci (*death domain*); DED — efektorowa domena śmierci (*death effector domain*); NFκB — czynnik transkrypcyjny; AIF — czynnik indukujący apoptozę (*apoptosis inducing factor*); JNK — kinazy fosforylujące N-koniec białka JUN (*Jun-N-terminal kinases*); kinazy ERK — kinazy, których aktywność regulują czynniki pozakomórkowe (*extracellularly regulated kinases*); PARP — polimeraza poli-ADP-rybozy; Rb, p53 — produkty białkowe genów supresorowych; ICE — kaspaza 1 (*interleukine 1 converting enzyme*); CPP22 — kaspaza 3.

I. Wstęp

Fizjologiczna śmierć komórek, zwana programowaną śmiercią lub apoptozą, ma miejsce podczas całego rozwoju organizmu. W jej wyniku organizm pozbywa się nadmiaru niepotrzebnych komórek podczas róż-

nicowania tkanek i narządów, a także eliminuje zainfekowane, uszkodzone czy też zmutowane komórki. Ostatecznie więc o liczbie komórek w organizmie decyduje równowaga, pomiędzy ich proliferacją i śmiercią, regulowana przede wszystkim przez gospodarkę hormonalną ustroju, dostępność czynników wzrostowych i substancji odżywczych.

Bardzo wiele czynników zewnętrznych zdolnych jest do wywołania śmierci komórek. Są to przede wszystkim: czynniki uszkodzające DNA i zaburzające cykl komórkowy, brak czynników wzrostowych, szok termiczny, szok oksydacyjny, aktywacja określonych receptorów błonowych. Indukują one początkową „prywatną” zdanien K r o e m e r a [1], fazę śmierci komórek, o przebiegu której decyduje także typ komórek oraz ich stan fizjologiczny. Dalsze fazy apoptozy, efektorowa i degradacji (nieodwracalna), polegają na aktywacji w komórkach różnych procesów biochemi-

* Prof. dr hab.; Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN; 02-093 Warszawa, Pasteura 3

Artykuł opracowany na podstawie wykładu sympozjalnego wygłoszonego na XXXIII Zjeździe PTBioch w Katowicach, w 1997 roku.

cznych, zwłaszcza proteolitycznych i nukleolitycznych. Efektem ich są typowe dla apoptozy zmiany morfologiczne komórek i ich rozpad na ciała apoptotyczne, które są fagocytowane przez otaczające komórki.

Różne aspekty apoptozy były już omawiane w polskich czasopismach [2-8]. Obecny artykuł przedstawia wykryte ostatnio molekularne mechanizmy apoptozy wywoływanej poprzez aktywację receptorów błonowych z nadrodziny receptorów TNF. Złożoność powyższych mechanizmów i udział licznych białek w przekazywaniu sygnału generowanego przy błonie komórkowej do białek efektorowych, wskazuje na możliwości precyzyjnej kontroli nieodwracalnej decyzji komórek o samounicestwieniu.

II. Charakterystyka receptorów z nadrodziny TNF-R i ich ligandów

II-1. Receptory

Nadrodzinę receptorów TNF tworzy kilkanaście białek, w tym co najmniej sześć z nich może uczestniczyć w procesie apoptozy. Receptory te są białkami transbłonowymi o znacznej homologii w części zewnątrzbłonowej i znacznie mniej wyraźnie zaznaczonej w części cytoplazmatycznej. Na część zewnątrzbłonową składa się 3 do 6 domen bogatych w cysteinę, które uczestniczą w rozpoznawaniu odpowiednich ligandów [9-13]. W podbłonowych, cytoplazmatycznych fragmentach receptorów z rodziny TNF można „dopatrzyć się” przede wszystkim homologii funkcjonalnej. Wynika ona z obecności specyficznej sekwencji aminokwasowej (80-90 AA), zwanej domeną śmierci (*death domain, DD*). Mutacje aminokwasowe w tej sekwencji powodują, że receptory nie są zdolne do indukowania apoptozy. Domenę śmierci wykryto najwcześniej w receptorach FAS i TNF-R1, ale okazało się, że występuje ona również w ostatnio wykrytych receptorach DR3, TRAIL-R1/DR4 i TRAIL-R2 [14-16] oraz CAR1 [17]. Domena DD uczestniczy w tworzeniu kompleksów receptorów oraz w wiązaniu receptorów z innymi białkami z domeną DD [13]. Występowanie domeny śmierci nie ogranicza się do wspomnianych białek receptorowych. Wykryto ją bowiem w bardzo wielu białkach zdolnych do tworzenia homo i heterodimerów [18, 19]. Ze względu na występowanie DD w tak różnych białkach jak białka receptorowe (np. FAS, TNF-R), enzymy (kinaza DAP), białka adaptorowe (FADD, TRADD, RIP), czy też białka strukturalne (ankyryna) można sądzić, że domena ta może przekazywać nie tylko sygnały do śmierci komórek, lecz pełnić także inne bardziej ogólne funkcje, będące prawdopodobnie efektem jej oddziaływań z innymi białkami. W domenie śmierci nie występują bowiem sekwencje aminokwasowe „podejrzewane” o pełnienie specyficznych funkcji [20].

Receptor FAS (CD95; APO-1) występuje na powierzchni komórek układu immunologicznego, zwłaszcza

limfocytów T, limfocytów B, a także na powierzchni nowotworowych komórek limfoidalnych. Jego obecność wykrywa się także w komórkach grasicy, wątroby, nerek, serca oraz innych tkanek [8, 9]. Po związaniu specyficznego liganda lub przeciwciała receptor FAS ulega szybko oligomeryzacji, tworząc wielkocząsteczkowe agregaty, które są następnie internalizowane do cytoplazmy [12, 21].

Receptory TNF-R1 i TNF-R2 występują równie powszechnie co receptor FAS i zdolne są do przekazywania sygnałów zarówno do śmierci jak i proliferacji komórek [12, 13] (patrz rozdział III-1). Sądzi się, że w przekazywaniu sygnału do śmierci bierze udział przede wszystkim receptor TNF-R1, jednakże możliwe jest także współdziałanie obydwu receptorów w indukcji apoptozy. Szereg czynników (cAMP, liczne mitogeny, interleukina 2, lipopolisacharyd) indukuje w komórce syntezę receptorów TNF, przy czym indukcja ta dotyczy przede wszystkim receptora TNF-R2 [12].

Receptor CD27 występuje tylko na powierzchni określonych subpopulacji limfocytów T i B i bierze udział zarówno w indukowaniu ich do apoptozy jak i proliferacji. Cytoplazmatyczny fragment receptora CD27 jest znacznie krótszy niż odpowiednie fragmenty receptora FAS i receptorów TNF-R i, co więcej, nie występuje w nim domena śmierci [23]. Nie wiadomo, jak dotąd, w jaki sposób receptor CD27 oddziałuje z białkami efektorowymi.

Występowanie receptorów DR3 i TRAIL charakteryzuje większość komórek nowotworowych [14, 23]. Komórki prawidłowe zaś mają natomiast na swej powierzchni nieaktywny analog powyższych receptorów — receptor TRID (*TRAIL — receptor without an intracellular domain, tzw. decoy receptor*). Różni się on od receptorów DR3 i TRAIL-R2 brakiem fragmentu cytoplazmatycznego i w związku z tym niemożnością interakcji z efektorowymi białkami cytoplazmatycznymi [23-25].

Receptor CAR1, jak dotąd, znaleziono tylko w komórkach ptaków zainfekowanych wirusem *leukosis-sarcoma* [17]. Fragment cytoplazmatyczny receptora CAR1 zawiera sekwencje homologiczne do domeny śmierci receptorów FAS i TNF-R, zaś fragment zewnątrzbłonowy jest krótki i charakteryzuje go obecność tylko dwóch domen bogatych w cysteinę.

II-2. Ligandy

Ligandami receptorów FAS i TNF-R są cytokiny — FAS-L (CD95-L) i TNF, białka błonowe, zakotwiczone N-końcem w błonie komórkowej [11]. W warunkach fizjologicznych mogą działać „miejscowo” i wiązać się z receptorem FAS tych samych lub sąsiednich komórek, tworząc między nimi bezpośrednie połączenia. Ligandy mogą być także uwalniane z błon działaniem metaloproteinaz [26] i występować wówczas jako białka rozpuszczalne, prawdopodobnie w postaci trimerów, które łączą się z receptorami

innych komórek [11, 27]. Sądzi się, że trimerem może być też ligand receptora CD27 — białko CD70, występujące tylko w błonach zaktywowanych limfocytów T i B [22]. Badania mutantów FAS-L oraz analiza opracowanych komputerowo modeli molekularnych interakcji FAS — FAS-L wykazały niezbędność w tym procesie aminokwasów Pro-206 i Tyr-218 w cząsteczce liganda [28].

Ligandem receptorów TRAIL-R jest cytokina TRAIL (APO-2L; *TNF-related apoptosis inducing ligand*), strukturalnie pokrewna FAS-L i TNF, efektywnie niszcząca tylko komórki nowotworowe [23]. Jak dotąd nie doniesiono o występowaniu cytokiny TRAIL w formie rozpuszczalnej. Ligandem receptora CAR1 jest białko otoczki wirusa ALSV (*avian leukosis-sarcoma virus*) [17], zaś receptora CD27 — ligand CD70 [22]. Ligandy te są na ogół N-glikozylowane, co ma, jak się ostatnio sugeruje, znaczenie w procesie ich solubilizacji [28].

III. Hipotetyczny przebieg szlaków prowadzących do apoptozy

W jaki sposób interakcja ligandów z odpowiednimi

receptorami błonowymi może uruchamiać proces apoptozy? Obecnie sądzi się, że sekwencja zdarzeń może przedstawiać się następująco:

- związanie liganda (w postaci trimery) z receptorem zakotwiczonym w błonie, jego agregacja i internalizacja utworzonego kompleksu
- oddziaływanie cytoplazmatycznego fragmentu receptora (najczęściej poprzez domenę śmierci (DD) z białkami adaptorowymi (patrz rozdział III-1))
- przekazanie sygnałów decydujących o śmierci komórek lub ich przeżyciu z białek adaptorowych do białek efektorowych, takich jak cysteinowe proteazy — kaspazy i/lub białka związane z aktywacją czynników transkrypcyjnych (NFκB; c-jun), a także syntezą ceramidu (sfingomielinaza)
- aktywacja białek efektorowych, których działanie może wywoływać apoptozę albo promować przeżycie komórek

III-1. Białka adaptorowe

Apoptoza wywoływana przez pobudzenie receptorów FAS i TNF-R wykrywalna jest już po kilku godzinach, a przez pobudzenie receptora TRAIL-R1,

Tabela 1.

Cytosolowe białka adaptorowe uczestniczące w przekazywaniu sygnału proapoptotycznego z receptorów błonowych do białek efektorowych. DD — domena śmierci

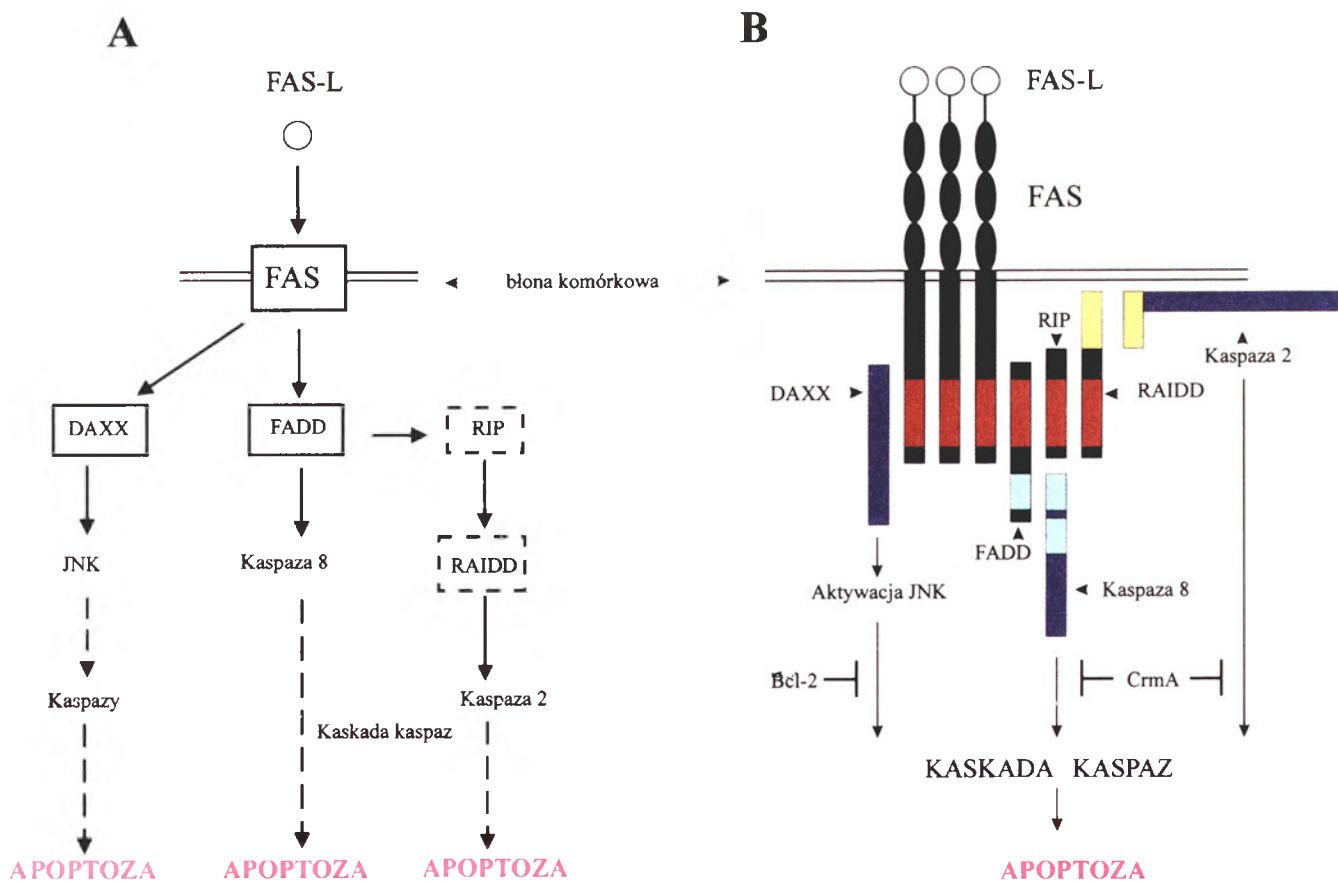
Skrót/Piśmiennictwo	Definicja	Udział w łączeniu
FADD/MORT (29,30)	Białko z DD wiążące się z receptorem FAS (<i>FAS — associating protein with death domain</i>)	Receptorów FAS i TNF-R1 z kaspazą 8 (FLICE)
DAXX (31)	Białko wiążące się z DD receptora FAS (<i>FAS death domain associated protein</i>)	Receptora FAS z kinazą JNK lub białkiem aktywującym kinazę JNK
TRADD (32, 33)	Białko z DD wiążące się z receptorem TNF-R1 (<i>TNF-R1 associated domain protein</i>)	Receptora TNF-R1 i a) poprzez FADD z kaspazą 8 b) poprzez RIP i TRAF-2 z białkiem aktywującym czynnik transkrypcyjny NFκB
FAN (34, 35)	brak danych	Receptora TNF-R1 i sfingomielinazy
SIVA (22)	brak danych	Receptora CD27 z białkiem efektorowym (?)
TRAF _s (33, 36)	Czynniki wiążące się z receptorem TNF-R (<i>TNF-R associated factors</i>)	a) Receptora TNF-R2 i białka inhibitorycznego IAP b) Receptora TNF-R1 z RIP i białkiem aktywującym czynnik NFκB
RIP (37, 38)	Białko oddziałujące z receptorem (<i>receptor — interacting protein</i>); kinaza ser/thr	a) Receptorów FAS lub TNF-R1 poprzez RAIDD z kaspazą 2 b) Receptorów TNF-R1 poprzez TRAF-2 z białkiem aktywującym czynnik NFκB
CRADD/RAIDD (38, 39)	Białko adaptorowe z DD wiążące RIP i kaspazy (<i>Caspase and RIP adaptor with death domain</i>); definicja homologiczna (<i>RIP-associated Ich-1/CED3 homologous protein with a death domain</i>)	Receptora FAS poprzez RIP z kaspazą 2

aktywowanego cytokiną TRAIL, po kilkunastu godzinach [9]. Zmiany cytoplazmatyczne typowe dla apoptozy mogą też występować w komórkach w nieobecności jądra komórkowego i w warunkach zahamowania syntezy *de novo* makrocząstek. Sugeruje to, że sygnały generowane przez powyższe cytokiny modulują nieaktywne (latente) cytoplazmatyczne białka efektorowe. Ponieważ cytoplazmatyczne fragmenty receptorów z nadrodziny TNF nie mają domen katalitycznych, ich wpływ na białka efektorowe zachodzi, jak ostatnio udokumentowano, przy udziale różnych białek adaptorowych, pośredniczących w przekazywaniu sygnału z receptorów (Tab. 1). Niektóre z tych białek współdziałają zarówno z receptorem FAS, jak i TNF-R1 (białka adaptorowe FADD i RIP) lub też jedynie z receptorem FAS (białko adaptorowe DAXX). W interakcje z receptorem TNF-R1 wchodzi białka adaptorowe TRADD, TRAF2 i FAN. W przekazywaniu sygnału z receptora TNF-R2 uczestniczą białka adaptorowe TRAF1 i TRAF2, zaś z receptora TRAIL-1 białka adaptorowe TRADD, FADD i RIP. Wykryte w 1997 r. białko adaptorowe CRADD/RAIDD, podobnie jak adaptor RIP, nie wchodzi w bezpośrednią interakcję z receptorami FAS i TNF-R1, lecz z adaptorami FADD i TRADD, a dopiero następnie z efektorową kaspazą. Wydaje się więc, że można by je

nazywać białkami adaptorowymi II rzędu.

Większość białek adaptorowych (z wyjątkiem adaptoru FAN) charakteryzuje się obecnością domeny śmierci (DD), poprzez którą wchodzi one w interakcję z DD znajdującą się w cytoplazmatycznych fragmentach receptorów. Mutacje receptorów w obrębie domeny śmierci uniemożliwiają ich interakcję z białkami adaptorowymi. Wyindukowana nadekspresja adaptorów TRADD, FADD, SIVA bądź RIP może wywoływać apoptozę [19].

Szlaki prowadzące do apoptozy poprzez pobudzenie właściwych receptorów błonowych są bardzo różne. Ich prawdopodobny przebieg przedstawiono schematycznie na rycinie 1A, B. Aktywacja receptora FAS wydaje się „angażować” co najmniej dwa białka adaptorowe — FADD i DAXX (Ryc. 1A). Efektorami szlaków, w których uczestniczy FADD są najprawdopodobniej dwie proteazy — kaspaza 8 i kaspaza 2 [40]. W szlaku wykorzystującym adaptor DAXX ostatecznymi białkami efektorowymi najprawdopodobniej są również kaspazy, lecz do ich aktywacji niezbędne jest uprzednie działanie kinaz fosforylujących czynniki transkrypcyjne, zwłaszcza kinaz JNK fosforylujących białko c-Jun [31, 41], oraz kinaz ERK [42]. Stymulacja receptora FAS może także wywoływać aktywację kinaz JNK (i apoptozę) w procesie nie



Ryc. 1. Szlaki prowadzące do apoptozy po pobudzeniu receptora FAS.

A) Schemat powiązań receptora FAS, poprzez białka adaptorowe, z efektorowymi kaspazami.

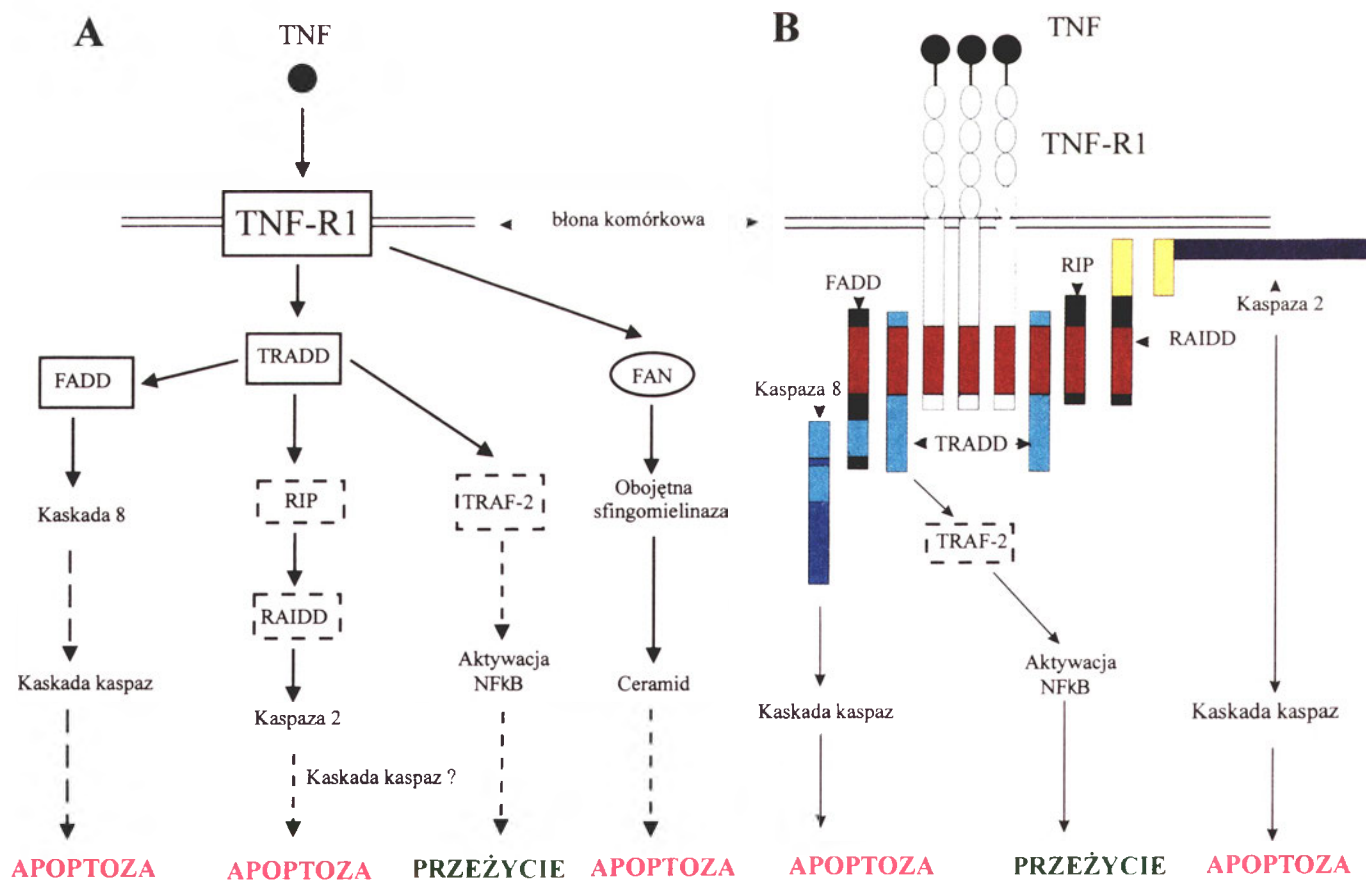
B) Rozwinięcie schematu A z uwzględnieniem elementów strukturalnych receptora, białek adaptorowych i kaspaz (wg 20 zmodyf.) Kolorem czerwonym zaznaczono domenę śmierci (DD) występującą w części cytoplazmatycznej receptora, w białkach adaptorowych FADD, TRADD, RIP i RAID, kolorami niebieskim i żółtym efektorowe domeny śmierci (DED) występujące odpowiednio w kaspazach 8 i 2.

angażującym białek adaptorowych, lecz układ sygnalizacyjny związany z małymi białkami G (Rac-1) [43]. Doniesiono także o występowaniu po stymulacji przeciwciałem receptora FAS komórek T szybkiej, trwającej około 30 minut, aktywacji kinaz tyrozynowych [44]. Zahamowanie aktywności powyższych kinaz przez specyficzne inhibitory, hamuje w komórkach fragmentację DNA i opóźnia ich apoptozę. Nie wiadomo, jak dotąd, czy w przekazywaniu sygnału z receptora FAS prowadzącego do aktywacji kinaz tyrozynowych biorą udział białka adaptorowe.

Aktywacja receptora TNF-R1 może wywoływać apoptozę uruchamiając co najmniej dwa niezależne, jak się jeszcze wydaje, szlaki (Ryc. 2A, B). W pierwszym z nich adaptor TRADD, wchodząc w interakcje bądź z adaptorem FADD, bądź też RIP i RAIDD, doprowadza do aktywacji odpowiednio kaspaz 8 i 2 i apoptozy komórek. Drugi szlak, w którym bierze udział adaptor FAN, polega na aktywacji obojętnej sfingomielinazy, której aktywność wiąże się pośrednio (na przykład poprzez udział w syntezie ceramidu) z funkcjonowaniem w komórkach wielu szlaków sygnalizacyjnych [34, 35], niekiedy także prowadzących do apoptozy [45]. W powiązaniach TNF-R1 i białka adaptorowego FAN uczestniczy 11-aminokwasowa domena znajdująca się w cytoplazmatycznej części receptora, funkcjonalnie i przestrzennie różna od obec-

nej w tym fragmencie domeny śmierci [35].

Jak już wspomniano powyżej stymulacja receptora TNF-R1 może się również powodować wzmoczoną przeżywalność komórek. Dla promowania przeżycia komórek istotna jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFκB. W przekazaniu sygnału z receptora TNF-R1 do aktywacji NFκB uczestniczą białka adaptorowe TRADD i TRAF-2. Przypuszcza się, że białko TRAF-2 może indukować (przy udziale kaskady kinaz MAP) fosforylację endogennego białkowego inhibitora (IκB) czynnika NFκB i w efekcie jego proteolizę w proteasomie [20, 46]. Aktywny, uwolniony z kompleksu z inhibitorem NFκB miałby aktywować w jądrze komórkowym ekspresję genów zawierających element odpowiedzi na NFκB i kodujących białka istotne dla przeżycia komórek [11]. Być może, są to białka blokujące przebieg „apoptotycznego szlaku” indukowanego przez TNF. Należy dodać, że również stymulacja receptora TNF-R2 prowadzi do aktywacji NFκB, w procesach, w których bierze udział jedynie białko adaptorowe TRAF-2 [47]. Możliwość uruchamiania, w wyniku stymulacji receptorów TNF, przeciwstawnych funkcjonalnie szlaków prowadzących bądź to do śmierci komórek, bądź też promujących ich przeżycie, może sprawiać, że apoptoza wywoływana działaniem TNF zachodzi wolniej niż w przypadku działania FAS-L. Ostatnio wykazano, że eksperymentalne „wy-



Ryc. 2. Szlaki prowadzące do apoptozy bądź przeżycia komórek po pobudzeniu receptora TNF-R1.

A) Schemat powiązań receptora TNF-R1, poprzez białka adaptorowe, z efektorowymi kaspazami lub czynnikiem transkrypcyjnym NFκB oraz poprzez białko FAN z obojętną sfingomielinazą

B) Rozwinięcie części schematu A z uwzględnieniem elementów strukturalnych receptora, białek adaptorowych i kaspaz (wg 20 zmodyf.). Oznaczenia jak na rycinie 1.

łączenie” działania czynnika transkrypcyjnego NFκB może zmieniać w komórkach równowagę pomiędzy stymulowanymi przez TNF mechanizmami prowadzącymi do ich śmierci lub przeżycia [48]. Świadczy o tym spotęgowanie proapoptotycznego działania TNF w komórkach myszy pozbawionych genu kodującego NFκB [49], lub też w komórkach zawierających tylko nieaktywny czynnik NFκB [50, 51]. Myśli się już o wykorzystaniu tej informacji w terapii nowotworowej [48].

Podobnie jak w przypadku pobudzenia receptora FAS, także aktywacja receptora TNF-R1 może prowadzić do wzrostu aktywności różnych kinaz białkowych, w tym kinazy JNK [52]. Sygnał do aktywacji JNK przekazywany jest w komórkach raka piersi MCF-7 przez białka adaptorowe RIP i TRAF-2, lecz aktywacja ta nie wywołuje, jak się sądzi, ich apoptozy.

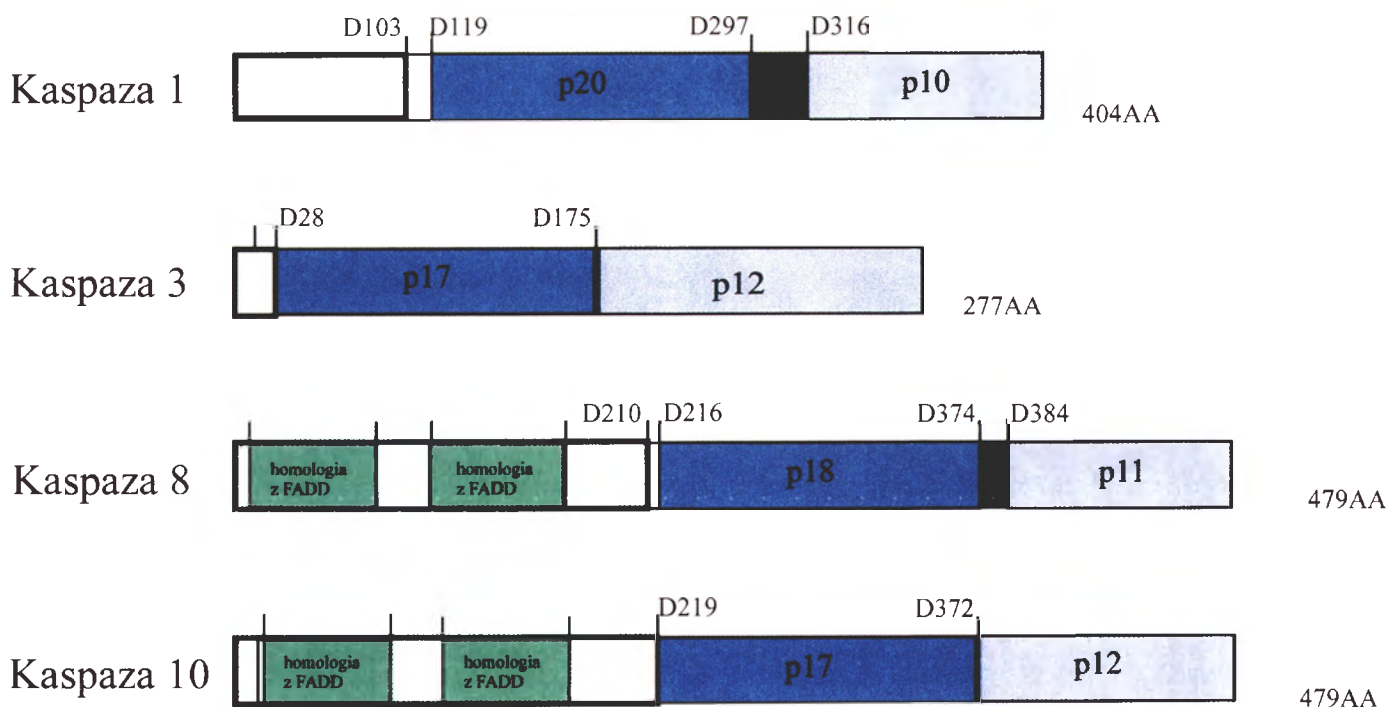
Aktywacja receptorów TRAIL-1 i TRAIL-2 również wywołuje aktywację układu kaspaz i apoptozę komórek [53, 16]. Jak dotąd udokumentowano, że w aktywacji kaspaz po stymulacji receptora TRAIL-R2 bierze udział białko adaptorowe FADD [16]. Nie rozstrzygnięto dotychczas, czy adaptor FADD (lub pokrewne mu białko adaptorowe) niezbędny jest do działania receptora TRAIL-R1.

III-2. Kaspazy jako efekторы apoptozy

Jak już pokazano w poprzednim podrozdziale zaktwowane błonowe receptory z nadrodziny TNF, oddziałują poprzez specyficzne białka adaptorowe z proteazami cysteinowymi—kaspazami. Enzymom

tym (wykrytym po raz pierwszy w komórkach nicienia *Caenorhabditis elegans*) przypisuje się kluczowe znaczenie dla przebiegu efektorowej, nieodwracalnej fazy apoptozy [13, 40, 54-59]. Szczególne cechy budowy cząsteczki kaspaz, ich powszechne, chociaż w znacznej mierze tkankowo zróżnicowane występowanie, a także zdolność do przeprowadzania proteolizy bardzo różnych strukturalnie i funkcjonalnie białek są podstawowymi czynnikami decydującymi o ich istotnej roli w apoptozie. Należy sobie jednak zdawać sprawę, że również aktywność innych proteaz komórkowych — kalpain, katepsyn, proteaz proteasomu, granzymu B, a także proteazy uwalnianej z mitochondriów (czynnik AIF, *apoptosis-inducing factor*) może być zaangażowana w przebieg apoptozy [58, 60-63].

Wszystkie poznane dotąd kaspazy (> 10) są syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy (zymogeny), składające się z dwóch podjednostek (~20kDa i ~10kDa), połączonych krótkim „łącznikiem” oraz z tzw. prodomeny, polipeptydu o różnej długości (Ryc. 3). Prodomena, która uczestniczy w dimeryzacji cząsteczek prokaspaz (i utrzymaniu ich w formie nieaktywnej), zostaje następnie odszczepiona podczas aktywacji. Aktywną enzymatycznie formą kaspaz jest tetramer (p20)₂(p10)₂, powstały w wyniku bądź autoproteolizy enzymu bądź też działania innych kaspaz lub proteaz np. granzymu B. Chociaż ogólny schemat budowy kaspaz jest zasadniczo podobny, to można je zgrupować w dwie podstawowe, filogenetycznie pokrewne podrodziny, których prototypami są kaspaza 1 — (ICE) i kaspaza 3 — (CPP32, apopaina). Rycina 4 przedstawia kaspazy z tych podrodzin, w nawiasach

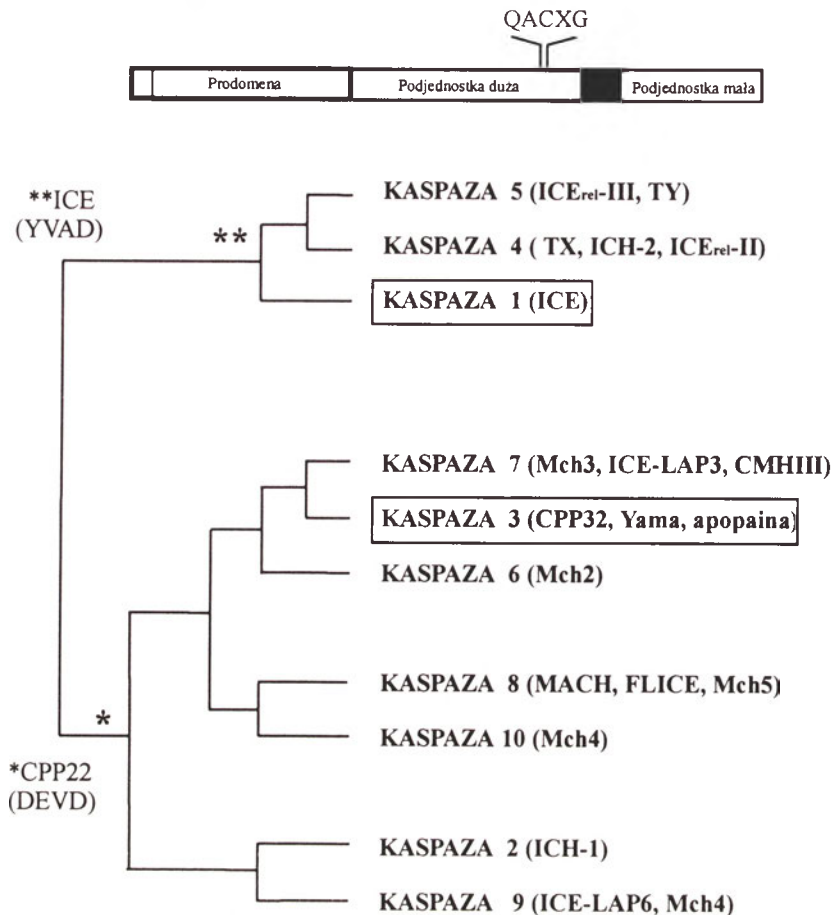


Ryc. 3. Schemat budowy wybranych kaspaz (wg 40 zmodyf.).

Linia pogrubioną zaznaczono obszar prodomeny; kolorem ciemno-niebieskim i jasno-niebieskim odpowiednio mniejszą i większą podjednostkę enzymu, czarnym zaś fragment łączący podjednostki. Symbol D oznacza resztę kwasu asparaginowego, a liczby obok niego usytuowane w peptydzie. Z prawej strony podano liczbę aminokwasów tworzących peptyd. Zaznaczone w prodomenach kaspaz 8 i 10 domeny homologiczne z FADD są określone na rycinach 1 i 2 jako domeny DED.

RODZINA KASPAZ

(cysteinył-aspartate-specific-proteinases)



Ryc. 4. Rodzina ludzkich kaspaz (wg 64 i 66 zmodyf.).

Podano obowiązujące nazewnictwo, w nawiasach obok dotychczas stosowane nazwy tych enzymów. Z lewej strony zaznaczono zwyczajowe nazwy podrodzin (ICE i CPP22), w nawiasach pod nimi preferowaną sekwencję AA w rozkładanych substratach. W schematycznie narysowanej prokaspazie zaznaczono aminokwasy występujące w jej centrum aktywnym.

podano też wcześniej stosowane nazwy tych enzymów, używane przed wprowadzeniem w końcu 1996 jednolitego ich nazewnictwa [64]. W pentapeptydzie znajdującym się w centrum aktywnym kaspaz występuje zawsze cysteina. Enzymy z podrodzin ICE i CPP32 różnią się nieco specyficznością substratową—kaspazy z podrodziny ICE preferują substraty z sekwencją YVAD, a kaspazy z podrodziny CPP32 — DEVD [56, 65, 66], wszystkie jednak rozszczepiają polipeptydy po reszcie kwasu asparaginowego.

Substratami kaspaz mogą być zarówno białka cytosolowe jak i jądrowe, a ich proteoliza może doprowadzić do aktywacji, jak też i hamowania, ich funkcji pełnionych w komórce. Badania specyficzności substratowej poszczególnych kaspaz są trudne i na ogół prowadzone *in vitro* jeszcze w ograniczonej liczbie typów komórek. Wskazują one, że niektóre kaspazy przeprowadzają proteolizę wielu substratów, inne tylko bardzo określonych. Jak te procesy zachodzą w warunkach fizjologicznych pozostaje do wyjaśnienia. Niemniej jednak wydaje się, że podczas apoptozy w większości komórek ulegają proteolizie takie białka jak laminy jądrowe, histony, polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP), niektóre białka strukturalne oraz szereg białek decydujących o efektywności replacji DNA, obróbki RNA, o prawidłowym przebiegu

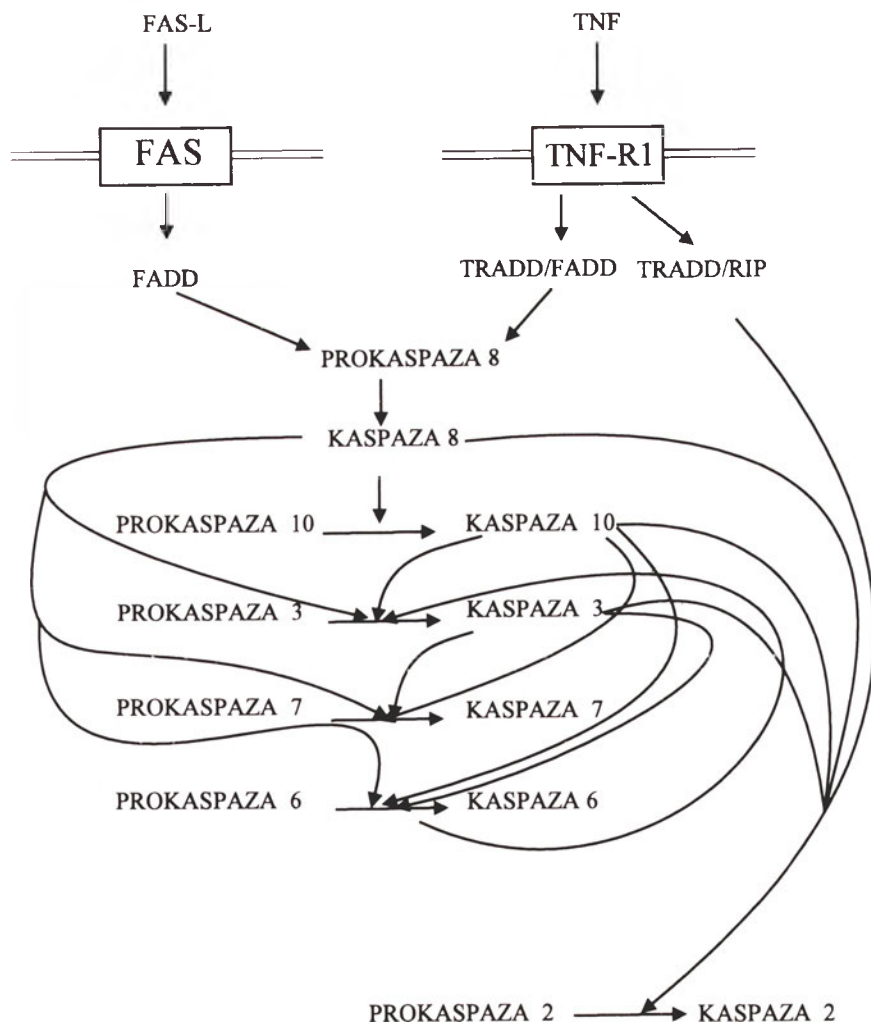
cyklu komórkowego i przekazywaniu sygnałów [40, 11, 59, 67, 68, 13, 57]. W ekstraktach z komórek ulegających apoptozie po aktywacji receptorów FAS/TNF-R udokumentowano już, przeprowadzaną przez kaspazy, proteolizę prokaspazy 3, PARP, białka Rel-B, rybonukleoproteiny U1-70kDa, α -fodryny i lamin, zachodzącą w czasie od 5 do 90 minut po związaniu liganda z receptorem [69]. W innej natomiast kolejności są rozkładane białka po stymulacji przeciwciałem receptora FAS w komórkach Jurkat. Pierwszym proteolizowanym białkiem jest α -fodryna, następnie zaś PARP, U1-70kDa i lamina B [70]. Po stymulacji receptorów FAS limfocytów T następuje też proteolityczna aktywacja istotnych dla przebiegu cyklu komórkowego kinaz PITSLRE [71, 72] oraz białka supresorowego Rb [73-75]. W układach *in vitro* wykazano także, że substratami kaspazy 3 może też być białko MDM2, negatywny regulator działania białka supresorowego p53 [76, 77] oraz białko DFF (*DNA fragmentation factor*), niezbędne w komórkach ulegających apoptozie do rozpoczęcia fragmentacji DNA, nie będące przy tym nukleazą [78].

W jaki sposób może dojść do uaktywnienia prokaspaz w czasie apoptozy następującej po związaniu z receptorem błonowym odpowiedniego liganda czy też przeciwciała? Uczestniczą w tym procesie z pew-

nością omawiane już białka adaptorowe (patrz III-1). Najprawdopodobniej łączą się one „fizycznie” swym fragmentem z N-końca, tzw. efektorową domeną śmierci (DED, *death effector domain*) z homologiczną sekwencją (*FADD homology*, porównaj Ryc. 3) obecną w prodomeńcu nieaktywnej kaspazy 8 i powodują jej autokatalityczną aktywację [40, 79-81]. Sekwencje aminokwasowe homologiczne z efektorową domeną śmierci (DED) adaptora FADD wykryto także w kaspazie 10 [82, 83] oraz w kaspazie homologicznej z kaspazą 8 tzw. FLICE-2, która ulega aktywacji podczas stymulacji zarówno receptora FAS jak i TNF-R1 [84]. W wyniku interakcji receptora FAS, białka adaptorowego FADD (tzw. DAP1/2), prokaspazy 8/10 (tzw. CAP4) oraz niezidentyfikowanego białka CAP3 powstaje heterokompleks tzw. DISC (*death inducing signalling complex*; 81) niezbędny do tego, aby zaszły dalsze etapy apoptozy. Niemożność jego utworzenia może być, jak wykazano badając apoptozę *in vitro* leukemicznych limfocytów T (linia H9), przyczyną ich oporności na apoptotyczne działanie przeciwciał anty-FAS [85]. Autoproteoliza prokaspazy w kompleksie DISC przebiega bardzo szybko, a produkty jej rozszczepienia wykrywalne są już nawet po 1 minucie od stymulacji komórek SKW6.4 przeciwciałem anty-FAS [81]. Powstały aktywny tetramer

kaspazy 8 przeprowadza następnie proteolizę dalszych kaspaz i białkowych substratów. Część odszczepionej prodomeńcy prokaspazy 8 pozostaje związana z białkiem adaptorowym FADD, część zaś wykrywalna jest w cytoplazmie. Nie wykazano dotychczas, aby w aktywacji prokaspazy 8 uczestniczyło białko CAP3. Ostatnio postuluje się, że interakcje białek adaptorowych i kaspaz mogą zachodzić poprzez tzw. domenę CARD (*caspase recruitment domain*; 86). Obecność jej stwierdzono jak dotąd w białku adaptorowym RAIDD, kilku kaspazach oraz endogennych białkowych inhibitorach apoptozy, tzw. IAP (patrz rozdział IV-3).

Na inny niż autokataliza, mechanizm aktywacji prokaspaz wskazują badania udziału w apoptozie białka CED4 *Caenorhabditis elegans* i jego homologa, białka Apaf, występującego w komórkach ssaków [87-96]. Postuluje się, że w komórkach nie zastymulowanych do apoptozy prokaspazy występują w połączeniu z usytuowanymi w błonach komórkowych i hamującymi apoptozę białkami z rodziny Bcl-2 [97-99] oraz z białkami CED4/Apaf. Po zadziałaniu zewnątrzkomórkowego sygnału do apoptozy następować miałby rozpad tego kompleksu wskutek oddysocjonowania białka BC1-2 (lub jego funkcjonalnych homologów) i utworzenie nowego kompleksu, tzw. apop-



Ryc. 5. Hipotetyczna hierarchia kaspaz aktywowanych w wyniku stymulacji receptorów błonowych FAS i TNF-R1 (wg 40 zmodyf.).

tosomu [89]. W jego skład wchodziłyby oprócz prokaspaz i białka Apaf-1, także i inne białka Apaf oraz cytochrom c, uwalniany z mitochondriów do cytoplazmy podczas wczesnych stadiów apoptozy komórek [92, 93, 100-102]. Po nieznanym jeszcze rearranżowaniu białek w kompleksie, być może na koszt energii uwalnianej podczas hydrolizy ATP (postuluje się, że CED-4/Apaf-1 jest ATPazą), następowaloby uwolnienie z kompleksu (odszczępienie) aktywnej już kaspazy. Czy tego typu aktywacja prokaspaz, zwłaszcza prokaspaz 8 i 10, następuje po stymulacji receptorów błonowych jeszcze nie wiadomo, ale obecność w białku CED4 sekwencji homologicznej do DED znajdującej się w białku adaptorowym FADD i prokaspazie 8 [56], jak również wywoływanie przez TNF uprzępczenia błony mitochondrialnej i śmierć komórek L929 [103] czynią to przypuszczenie wielce prawdopodobnym. Przeciw temu pogładowi przemawia jednak brak wpływu białka BC1-2 na przebieg apoptozy wywołanej stymulacją receptora FAS w limfocytach B, zaktywowanych limfocytach T i w tymocytach [104] oraz w komórkach leukemicznych Jurkat [105].

Nie można też wykluczyć możliwości, że w aktywacji prokaspazy 8 biorą udział inne kaspazy, np. kaspaza 1 oraz inne proteazy takie jak katepsyna D czy też serynowa proteaza AP24 [11].

Rycina 5 przedstawia hipotetyczną hierarchię kaspaz działających w komórkach po zaktywowaniu receptorów błonowych. Jak widać, większość z nich to kaspazy z podrodziny CPP32. Wydaje się więc, że uczestnictwo kaspaz z rodziny ICE nie może być znaczące dla przebiegu apoptozy, w którym kaspaza 8 jest kluczową proteazą [106], chociaż sprawa ta jest ciągle przedmiotem dyskusji [69]. Aktywne, znajdujące się najwyżej w hierarchii, kaspazy 8 i 10 (i ewentualnie kaspaza 2), zwane niekiedy kaspazami inicjującymi, aktywują następnie kolejne kaspazy tzw. wzmacniające i wykonawcze, które przeprowadzają proteolizę wspomnianych już różnych białek komórkowych [107, 108].

Zahamowanie aktywności kaspaz przez liczne syntetyczne i/lub wirusowe inhibitory, blokuje apoptozę komórek Jurkat wywołaną stymulacją ich receptorów FAS i bardzo wyraźnie zwiększa ich przeżywalność [109, 110]. Wynik ten stanowi eksperymentalne potwierdzenie znaczenia udziału kaspaz w apoptozie wywołanej stymulacją receptorów błonowych. Wskazuje także, że kaspazy mogą być enzymami docelowymi w leczeniu schorzeń, których przyczyną jest nadmierna apoptoza komórek.

IV. Prawdopodobne regulacje przebiegu transmisji sygnału do apoptozy

Efektywność transmisji sygnału proapoptycznego generowanego przy błonie komórkowej może wiązać się z:

- ilością receptorów błonowych i właściwościami ich zewnątrz- i wewnątrz- oraz cytoplazmatycznych domen
- ilością ligandów (induktorów apoptozy) i ich zdolnością do współdziałania z receptorami
- obecnością endogennych białek hamujących aktywację kaspaz „inicjujących” i tym samym hamujących przekazanie sygnału do kaspaz „wykonawczych”
- działaniem egzogennych inhibitorów kaspaz, przede wszystkim białek wirusowych.

Czynnikiem istotnym dla intensywności transmisji sygnału proapoptycznego jest także stan oksydoredukcyjny komórki [111] oraz wewnątrzkomórkowy poziom ATP [112-114]. Czynniki te są ważne dla przebiegu apoptozy wywołanej praktycznie większością przebadanych induktorów. Na podstawie danych wskazujących, że obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu ATP hamuje apoptozę komórek Jurkat i HeLa, indukowaną poprzez stymulację receptora FAS, oraz aktywność kaspaz, wysunięto w 1997 r hipotezę, że aż dwa etapy w szlaku apoptotycznym indukowanym poprzez receptor FAS są wrażliwe na niedobór ATP. Jednym z nich jest prawdopodobnie aktywacja kaspazy 8 i/lub przekazanie sygnału do kaspaz „wykonawczych”, drugim zaś etap przekazania sygnału do apoptozy z cytoplazmy do jądra, w którym prawdopodobnie uczestniczą liczne kinazy białkowe [114].

IV-1. Regulacja poziomu i właściwości składników układu FAS/FAS-L

Zarówno receptor FAS jak i jego ligand FAS-L występują na powierzchni wielu komórek, w warunkach fizjologicznych rzadko jednak receptor i ligand znajdują się jednocześnie na powierzchni tej samej komórki [115, 11]. To prawidłowe ich rozmieszczenie może się zmieniać pod wpływem różnych czynników wpływających na intensywność transkrypcji kodujących je genów. W regulacji ekspresji genu kodującego receptor FAS i/lub FAS-L uczestniczą endogenne białka: interferon γ [11], przypuszczalnie czynniki transkrypcyjne NF κ B [9, 116] i CREB [117] oraz białko supresorowe p53 [118, 119]. Nie wiadomo, czy białka te wywierają też wpływ na ekspresję genu kodującego ligand FAS-L.

Ostatnio okazało się, że wiele chemioterapeutyków, wywołujących apoptozę różnych komórek nowotworowych (komórki leukemiczne, neuroblastoma, hepatoma) indukuje w nich ekspresję genów kodujących FAS i/lub ligand FAS. Tyczy to takich cytostatyków jak dokсорubicyna, bleomycyna, metotreksat, fluorouracyl, kamptotecyna i cis-platyna [119-122]. Ekspresję genu receptora FAS stymulują również estry forbolu, hamuje zaś cyklosporyna A [12, 122]. Należy podkreślić, że indukcja ekspresji genów receptora FAS i jego liganda, i w konsekwencji apoptozy, pod wpły-

wem bleomycyny, cis-platyny lub metotreksatu nie zachodzi w komórkach hepatomy, które zostały pozabawione białka supresorowego p53 [119]. Obserwacja ta potwierdza znaczenie białka p53 w modulowaniu ekspresji tych genów. Wzrost, w wyniku terapii, ilości receptora błonowego FAS i jego liganda może podwyższać wrażliwość komórek nowotworowych na stosowane leki, a tym samym zwiększać skuteczność terapii [122]. Większe ilości uwolnionego z powierzchni komórek nowotworowych wolnego, cyrkulującego liganda FAS-L, mają też niewątpliwy wpływ na funkcjonowanie układu immunologicznego [115].

Zmiana struktury, prowadząca do zmian właściwości receptora i/lub liganda, często może wynikać z mutacji w kodujących je genach oraz z różnego typu modyfikacji potranslacyjnych zarówno fragmentów zewnątrz błonowych jak i cytoplazmatycznych tych białek. Najwcześniej poznanymi mutacjami są występujące w komórkach myszy mutacje *lpr* (*lymphoproliferation*) w genie receptora FAS i *gpl* (*generalized lymphoproliferation disease*) w genie liganda FAS [9, 11, 123]. Mutacja *lpr* wynika z wbudowania w intron genu kodującego receptor FAS wirusowego transpozonu (*transposable element*), co w efekcie powoduje przedwczesne zakończenie transkrypcji. Mutacja *gpl* genu kodującego ligand FAS jest mutacją punktową, której wynikiem jest zastąpienie jednej z fenyloalanin w części zewnątrz błonowej liganda alaniną. Obydwie mutacje powodują utratę pełnionych przez te białka funkcji. Obecność zmutowanych form receptora i/lub liganda wywołuje bardzo poważne konsekwencje biologiczne, zwłaszcza zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego, przejawiające się jako choroby limfoproliferacyjne i autoimmunologiczne, kończące się niekiedy śmiercią nosicieli mutacji [8, 9, 124, 125]. Jest też przyczyną wielu poważnych schorzeń u ludzi [126, 127]. Mutacje *lpr* i *gpl* nie są jedynymi znanymi mutantami receptora FAS i liganda FAS-L. Inne niż *lpr* i *gpl* mutacje receptora FAS znaleziono w limfocytach T pacjentów z chorobą ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*), nie są one jeszcze w pełni scharakteryzowane [127]. Badania mutacji są niezwykle pomocne w określaniu interakcji białek uczestniczących w transmisji sygnału apoptotycznego.

Przykładem najdalej posuniętej, naturalnie występującej modyfikacji receptora należącego do rodziny TNF, jest obecność w błonach komórek prawidłowych nieaktywnego receptora TRID [24, 25]. Receptor ten, wiążący cytokinę TRAIL, jest białkiem powierzchniowym, zakotwiczonym w błonie poprzez fragment glikofosfolipidowy, wykazującym znaczną homologię z zewnątrz błonowymi fragmentami aktywnych receptorów DR3/TRAIL-R2. Nie ma on jednak części cytoplazmatycznej, co sprawia, że nie przekazuje sygnału apoptotycznego do kaskady kaspaz. Komórki prawidłowe, na których powierzchni występuje receptor TRID „wytrzymują” niszczące działanie konstytutywnie występującej cytokiny TRAIL. Nieznane, jak

dotąd, są jednak czynniki wywołujące powyższą modyfikację receptora TRAIL.

Badania modyfikacji potranslacyjnych receptora FAS rozpoczęły się niedawno. Wykazały one, że cytoplazmatyczna domena receptora FAS wiąże się nie tylko z białkami adaptorowymi bezpośrednio uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału do apoptozy, lecz także z innymi białkami. Opisano jej interakcje z białkiem FAP-1 (*FAS-associated phosphatase-1*) będącym fosfatazą serynową [128, 129], białkiem RIP (*Receptor-interacting protein*), kinazą serynowo-treoninową [37], białkiem FAF-1 (*FAS-associated-factor*; 130), zidentyfikowanym ostatnio jako ubikwityna lub białko ubikwityno-podobne [131] oraz białkiem UBC-FAP (*FAS-associated protein*; 132), enzymem wyznakowującym ubikwityną białka mające ulec degradacji w proteasomie. Możliwość wiązania przez receptor FAS białek zdolnych do przeprowadzania fosforylacji i defosforylacji, a także do skierowywania białek na drogę proteolizy wskazuje, że białka te mogą w nieznanym jeszcze sposób uczestniczyć w kontroli przekazywania sygnału z receptorów FAS do białek efektorowych. Przemawiają też za wielopoziomową regulacją tego procesu.

IV-2. Udział endogennych białek w regulacji transmisji sygnału

Specyficznym, jak się obecnie wydaje, regulatorem szlaku przekazywania sygnału do apoptozy po pobudzeniu receptorów nadrodziny TNF jest białko wykryte w 1997 r. przez kilka niezależnych grup badaczy [133] i opisane pod nazwami FLIP (*Flice – inhibitory protein*; 134), CASPER (135), FLAME (*FLICE – antiapoptotic molecule*, 136), CASH [137]. I-FLICE (*Inhibitor of FLICE*; 138). Wykryto je w tkance mięśniowej, różnych komórkach limfoidalnych, a także w komórkach czerniaka [134]. Gen kodujący to białko znajduje się w komórkach ludzkich w chromosomie 8, w pobliżu genów kodujących kaspazy 8 i 10 [134, 135]. Białko to, nazywane dalej FLIP, charakteryzuje obecność w N-końcu dwóch efektorowych domen śmierci (DED), poprzez które może się ono wiązać z innymi białkami mającymi domenę DED dając homodimery (2 cząsteczki FLIP), lub heterodimery z białkiem adaptorowym FADD oraz kaspazami 8 i 10 [134, 136, 137], a także białkiem adaptorowym TRAF-2 [133]. C-końiec białka FLIP charakteryzuje podobieństwo sekwencji do prodomeiny kaspaz 8 i 10 [137, 138], brak w nim natomiast sekwencji aminokwasów występujących w centrum aktywnym kaspaz (cysteina zastąpiona jest tyrozyną) [134]. W związku z tym białko FLIP nie wykazuje aktywności katalitycznej. Można je więc traktować jako inertną (nieaktywną) kaspazę. FLIP może występować w komórkach w 2 formach — krótszej i dłuższej. Są sugestie, że występowanie tych form może być tkankowo-specyficzne [134]. Znaczenie fizjologi-

czne obecności w komórkach nieaktywnych kaspaz „inicjujących” apoptozę jest niewątpliwe, jednak różne są poglądy o sposobie ich działania. Część badaczy uważa [134, 136, 138], że jedyną fizjologiczną funkcją komórkowych białek FLIP jest hamowanie przez nie apoptozy. Ich antyapoptotyczne działanie miałyby imitować działanie wirusowych białek FLIP [139-142], które zakłócają wiązanie prokaspaz 8 i 10 z białkiem adaptorowym FADD. Inni skłonni są uważać, że komórkowe białko FLIP może być czynnikiem proapoptotycznym, wywołującym aktywację kaspazy 10, a także kaspazy 3, dzięki temu, że może ono utworzyć heterokompleks jednocześnie z tymi dwoma enzymami [138]. Do antyapoptotycznego działania FLIP może się też przyczyniać ich zdaniem, wpływ FLIP na trwałość kompleksu adaptora TRAF-2 z białkiem inhibitorowym IAP [138]. Są również wyniki wskazujące, że o tym w jaki sposób zadziała białko FLIP decydować może ekspresja jego krótszej lub dłuższej formy oraz „stan fizjologiczny” komórek [137].

Endogennymi białkowymi inhibitorami apoptozy są również białka IAP (*inhibitory apoptosis proteins*), homologi wcześniej wykrytych wirusowych białek IAP [143]. Cechuje je obecność w C-końcu struktury typu palca cynkowego (*RING finger*), zaś w N-końcu występowanie specyficznych domen tzw. BIR (*baculovirus IAP repeats*), dla których typowy jest układ aminokwasów Cys-X₂-Cys oraz Cys-X-His. Domeny BIR biorą udział w interakcjach IAP z innymi białkami, a ich obecność jest niezbędna dla spełniania inhibitorowych funkcji. Polegają one, jak się sądzi, na zakłócaniu przekazywania sygnałów z receptorów TNF-R1/R2. Niektóre białka IAP (c-IAP₁ i c-IAP₂) wiążą się bowiem z białkiem adaptorowym TRAF-1 bądź TRAF-2, „skierowującymi” sygnał do aktywacji kaspaz lub do czynnika transkrypcyjnego NFκB [144]. Molekularny mechanizm działania białek IAP nie został jeszcze w pełni poznany.

Najdawniej poznane endogenne regulatory apoptozy—białka z rodziny BCl-2, którym przypisuje się zarówno anty- jak i proapoptotyczne działanie [97-99] nie grają, jak się wydaje, bezpośredniej roli w kontrolowaniu apoptozy inicjowanej przez aktywację receptorów błonowych z rodziny TNF-R [33, 104, 105, 145]. Nie jest to jednak stwierdzenie kategoryczne, pojawiają się bowiem doniesienia o częściowym hamowaniu przez BCl-2 apoptozy niektórych komórek wywoływanej działaniem cytokin z rodziny TNF-R [146-148]. Białko BCl-2 zdolne jest też do hamowania apoptozy komórek wątroby, następującej w wyniku podania myszom przeciwciał anty-FAS [149]. Dyskusyjny jednak pozostaje ciągle problem identyfikacji etapu apoptozy, który jest wrażliwy na działanie białek BCl-2. Z pewnością nie jest to etap, w którym następuje aktywacja kaspaz 8/10, chociażby ze względu na brak białek BCl-2 w błonach plazmatycznych. Bardziej prawdopodobny wydaje się udział BCl-2 w aktywacji

kaspaz plazmatycznych, znajdujących się w pobliżu miejsc występowania białek z rodziny BCl-2, tzn. w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, endoplazmatycznym retikulum i błonie jądrowej. Za tym przypuszczeniem przemawia też wykazana ostatnio (rozdział III-2) fizyczna interakcja białka BCl-2 z białkami Apaf-1/CEDH i prokaspazami.

IV-3. Białka wirusowe jako regulatory apoptozy

Białka syntetyzowane przez wirusy mogą być aktywatorami, jak też i inhibitorami, apoptozy w zainfekowanych komórkach. Molekularne mechanizmy leżące u podstaw ich tak przeciwstawnych działań są bardzo różne i omówienie ich przekracza ramy tego artykułu, zasygnalizuję więc tylko te, które działają na szlak przekazywania sygnału do apoptozy związany z kaspazami.

Pośród białek wirusowych, będących silnymi i specyficznymi inhibitorami kaspaz, wymienić należy przede wszystkim białko CrmA (*cytokine response modifier*) wirusa ospy tzw. serpinę [150-153]. Hamuje ono aktywność kaspaz działających w różnych fazach apoptozy, jednakże w nie we wszystkich komórkach blokuje aktywację kaspazy 8 [81]. Inhibitor CrmA w odróżnieniu od białka BCl-2 hamuje skutecznie apoptozę zachodzącą, między innymi, przy udziale receptorów FAS [152, 154, 155]. Na etapie hamowania aktywacji kaspazy 8 wydają się natomiast działać syntetyzowane przez różne wirusy białka FLIP [139-142] (porównaj rozdział IV-2). Inhibitorami pewnych kaspaz są także: białko p35 i niektóre białka IAP syntetyzowane przez bakulowirusy (wirusy infekujące komórki owadzie) [143, 156-158]. Wydaje się, że hamują one kaspazy znajdujące się w hierarchii poniżej kaspazy 8 [159]. Białka IAP tylko częściowo hamują apoptozę wywołaną nadekspresją adaptorowego białka FADD [156]. Wykazano natomiast ich udział w regulacji przekazywania sygnałów z receptorów TNF-R dzięki interakcjom z białkami adaptorowymi TRAF [59, 158].

V. Uwagi końcowe

Omówione badania dotyczyły tylko jednego z licznych działań receptorów błonowych z rodziny TNF-R, jakim jest promowanie przez nie apoptozy. Należy zdawać sobie sprawę, że cytokiny aktywujące te receptory, zwłaszcza TNF-R, przejawiają ponadto bardzo szerokie spektrum działania. Funkcjonowanie ich, poprzez wpływ na syntezę innych cytokin, interferonu γ i β , białek ostrej fazy, przeciwciał, powstawanie wolnych rodników itp. [160, 161], związane jest przede wszystkim z licznymi zaburzeniami układu immunologicznego, w tym także z immunologicznym konfliktem zachodzącym pomiędzy nowotworem a jego nosicielem [162].

Podziękowanie

Autorka dziękuje serdecznie mgr Magdalenie Pęskiej za przygotowanie rycin.

Artykuł otrzymano 16 października 1997 r.
Zaakceptowano do druku 16 grudnia 1997 r.

Piśmiennictwo

- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997) *Immunol Today* **18**: 44-51
- Sikora E (1994) *Post Biochem* **40**: 150-160
- Sikora E (1995) *Kosmos* **44**: 353-363
- Sikora E (1996) *Post Biochem* **42**: 108-112
- Radziszewska E (1995) *Post Biol Kom* **22**: 247-263
- Rożynkova D (1994) *Post Biol Kom* **21**: 303-318
- Kamińska B (1994) *Mat Wiosennej Szkoły Neurobiol*: 15-22
- Roliński J (1997) *Post Biol Kom* **24**: 561-574
- Nagata S, Goldstein P (1995) *Science* **267**: 1449-1456
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) *Cell* **76**: 959-962
- Nagata S (1997) *Cell* **88**: 355-365
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995) *Trends Cell Biol* **5**: 392-399
- Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenabeele P, Fiers W (1997) *FEBS Lett* **410**: 96-106
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu G-L, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM (1996) *Science* **274**: 990-992
- Kitson J, Raven T, Jiang Y-P, Goeddel DV, Giles KM, Pun K-T, Grinham CJ, Brown R, Farrow SN (1996) *Nature (Lond)* **384**: 372-375
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997) *EMBO J* **16**: 5386-5397
- Brojatsch J, Naughton J, Rolls MM, Ziegler K, Young JAT (1996) *Cell* **87**: 845-855
- Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E (1995) *TIBS* **20**: 342-344
- Cleveland JL, Ihle JN (1995) *Cell* **81**: 479-482
- Wallach D (1997) *TIBS* **22**: 107-109
- Kamitani T, Nguyen HP, Yeh ETH (1997) *J Biol Chem* **272**: 22307-22314
- Prasad KVS, Ao Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk N, Jaquot S, Schlossman SF (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6346-6351
- Gura T (1997) *Science* **277**: 768
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goodard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) *Science* **277**: 818-821
- Pan G, Wei YF, Yu G, Genz R, Dixit VM (1997) *Science* **277**: 815-818
- Blobel CP (1997) *Cell* **90**: 589-592
- Green DR, Ware CF (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5986-5990
- Schneider P, Bodmer J-C, Holler N, Mattmann C, Scuderi P, Terskikh A, Peitsch MC, Tschopp J (1997) *J Biol Chem* **272**: 18827-18833
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit YM (1995) *Cell* **81**: 505-512
- Chinnaiya AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996) *J Biol Chem* **271**: 4961-4965
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D (1997) *Cell* **89**: 1067-1076
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995) *Cell* **84**: 495-504
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996) *Cell* **84**: 299-308
- Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, Krönke M (1996) *Cell* **86**: 937-947
- Adam D, Wiegmann K, Adam-Klages S, Ruff A, Krönke M (1996) *J Biol Chem* **271**: 14617-14622
- Rothe M, Wang SC, Henzel WJ, Goeddel DV (1994) *Cell* **78**: 681-692
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B (1996) *Cell* **81**: 513-523
- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1997) *Cancer Res* **57**: 615-619
- Duan H, Dixit VM (1997) *Nature (Lond)* **385**: 86-89
- Cohen GM (1997) *Biochem J* **326**: 1-16
- Cahil MA, Peter ME, Kischkel FC, Chinnaiyan AM, Dixit VM, Krammer PH, Nordheim A (1996) *Oncogene* **13**: 2087-2096
- Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, Tepper RJ, Davis RJ, Harlow E, Sanchez I (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3302-3307
- Brenner B, Koppenhoefer U, Weinstock C, Linderkamp O, Lang F, Gulbins E (1997) *J Biol Chem* **272**: 22173-22181
- Eischen CM, Dick CJ, Leibson PJ (1994) *J Immunol* **153**: 1947-1954
- Pena LA, Fuks Z, Kolesnick R (1997) *Biochem Pharmacol* **53**: 615-621
- Eder J (1997) *TIPS* **18**: 319-322
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV (1995) *Science* **269**: 1424-1427
- Barinaga M (1996) *Science* **127**: 724
- Beg AA, Baltimore D (1996) *Science* **274**: 782-784
- Wang C-Y, Mayo MW, Baldwin AS, Jr (1996) *Science* **274**: 784-787
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM (1996) *Science* **274**: 787-789
- Liu Z, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) *Cell* **87**: 565-576
- Mariani SM, Matiba B, Armandola EA, Karmmer PH (1997) *J Cell Biol* **137**: 221-229
- Miller DK, Myerson J, Becker JW (1997) *J Cell Biochem* **64**: 2-10
- Patel T, Gores GJ, Kaufman SH (1996) *FASEB J* **10**: 587-597
- Nagata S (1996) *Curr Biol* **6**: 1241-1243
- Nicholson DW, Thornberry NA (1997) *TIBS* **22**: 299-306
- Zhivotovsky B, Burgess DH, Vanags DM, Orrenius S (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 481-488
- Villa P, Kaufman SH, Earnshaw WC (1997) *TIBS* **22**: 388-393
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1996) *Apoptosis* **1**: 231-242
- Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A (1996) *EMBO J* **15**: 3861-3870
- Froelich CJ, Hanna WL, Poirier GG, Duriez PJ, D'Amours D, Salvesen GS, Alnemri ES, Earnshaw WC, Shah GM (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 658-665
- Quan LT, Tewari M, O'Rourke K, Dixit V, Snipas SJ, Poirier GG, Ray C, Pickup DJ, Salvesen GS (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1972-1976
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) *Cell* **87**: 171
- Talanian, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW (1997) *J Biol Chem* **272**: 9677-9682
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997) *J Biol Chem* **272**: 17907-17911
- Porter AG, Ng P, Jänicke RU (1997) *BioEssays* **19**: 501-507
- Rosen A, Casciola-Rosen L (1997) *J Cell Biochem* **64**: 50-54
- Zhivotovsky B, Burgess DH, Schlegel J, Pörn MJ, Vanags D, Orrenius S (1997) *J Cell Biochem* **64**: 43-49

70. Greidinger EL, Miller DK, Yamin TT, Casciola-Rosen L (1996) *FEBS Lett* **390**: 299-303
71. Yao SL, McKenna KA, Sharkis SJ, Bedi A (1996) *Cancer Res* **56**: 4551-4555
72. Beyaert R, Kidd VJ, Cornelis S, Van de Craen M, Denecker G, Lahti JM, Gururajan R, Vandenameele P, Fiers W (1997) *J Biol Chem* **272**: 11694-11697
73. Tan X, Martin SJ, Green DR, Wang JY (1997) *J Biol Chem* **272**: 9613-9616
74. Dou QP, An B, Antoku K, Johanson DE (1997) *J Cell Biochem* **64**: 586-594
75. Herwig S, Strauss M (1997) *Eur J Biochem* **246**: 581-601
76. Erhardt P, Tomaselli KJ, Cooper GM (1997) *J Biol Chem* **272**: 15049-15052
77. Piette J, Neel H, Marechal V (1997) *Oncogene* **15**: 1001-1010
78. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) *Cell* **89**: 175-184
79. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996) *Cell* **85**: 817-827
80. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996) *Cell* **84**: 803-815
81. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997) *EMBO J* **16**: 2794-2804
82. Fernandez-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7464-7469
83. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandez-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14486-14491
84. Vincenz C, Dixit VM (1997) *J Biol Chem* **272**: 6578-6583
85. Peter ME, Kischkel FC, Scheuerpflug CC, Medema JP, Debatin KM, Krammer PH (1997) *Eur J Immunol* **27**: 1207-1212
86. Hofmann K, Bucher P, Tschopp J (1997) *TIBS* **22**: 155-156
87. Golstein P (1997) *Science* **275**: 1081-1082
88. Spector MS, Desnoyers S, Hoepfner DJ, Hengartner MO (1997) *Nature (Lond)* **385**: 653-656
89. Hengartner MO (1997) *Nature (Lond)* **388**: 714-715
90. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM (1997) *Science* **275**: 1122-1126
91. Chinnaiyan AM, Chaudhary D, O'Rourke K, Koonin EV, Dixit VM (1997) *Nature (Lond)* **388**: 728-729
92. Wu D, Wallen HD, Nunez G (1997) *Science* **275**: 1126-1129
93. Wu D, Wallen HD, Inohara N, Nunez (1997) *J Biol Chem* **272**: 21449-21454
94. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) *Cell* **90**: 405-413
95. Vaux DJ (1997) *Cell* **90**: 389-390
96. Irmeler M, Hofman K, Vaux D, Tschopp J (1997) *FEBS Lett* **406**: 189-190
97. Grzelakowska-Sztabert B (1997) *Kosmos* **46**: 53-64
98. Jacobson MD (1997) *Curr Biol* **7**: R278-R281
99. Reed JC (1997) *Nature (Lond)* **387**: 773-777
100. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) *Cell* **86**: 147-157
101. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X (1997) *Science* **275**: 1129-1132
102. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) *Science* **275**: 1132-1136
103. Pastorino JG, Simbula G, Yamamoto K, Glascock PA, Jr, Rothman RJ, Farber JL (1996) *J Biol Chem* **271**: 29792-29798
104. Strasser A, Harris AW, Huang DCS, Krammer PH, Cory S (1995) *EMBO J* **14**: 6136-6147
105. Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM (1996) *J Biol Chem* **271**: 4573-4576
106. Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM (1997) *J Biol Chem* **272**: 2952-2956
107. Fraser A, Evan G (1996) *Cell* **85**: 781-784
108. Li H, Bergeron L, Cryns V, Pasternack MS, Zhu H, Shi L, Greenberg A, Yuan J (1997) *J Biol Chem* **272**: 21010-21017
109. Longthorne VL, Williams GT (1997) *EMBO J* **16**: 3805-3812
110. Gamem S, Marzo I, Anel A, Pineiro A, Naval J (1996) *FEBS Lett* **390**: 233-237
111. Jacobson MD (1997) *TIBS* **21**: 83-86
112. Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C (1996) *FEBS Lett* **378**: 107-110
113. Leist M, Nicotera P (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 1-9
114. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997) *Cancer Res* **57**: 1835-1840
115. Debatin K-M (1997) *J Natl Cancer Inst* **89**: 750-751
116. Ivanov WN, Lee RK, Podack ER, Malek TR (1997) *Oncogene* **14**: 2455-2464
117. Lalli E, Sassone-Corsi P (1994) *J Biol Chem* **269**: 17359-17362
118. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang W-W, Kruzel E, Radinsky R (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 3032-3040
119. Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann E-M, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR (1997) *J Clin Invest* **99**: 403-413
120. Friesen C, Herr J, Krammer PH, Debatin KM (1996) *Nat Med* **2**: 574-577
121. Fulda S, Sieverts H, Friesen C, Herr I, Debatin K-M (1997) *Cancer Res* **57**: 3823-3829
122. Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel M-T (1997) *J Natl Cancer Inst* **89**: 783-789
123. Nagata S, Suda T (1995) *Immunol Today* **16**: 39-43
124. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jeninks NA, Nagata S (1992) *Nature (Lond)* **356**: 314-317
125. Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Shigekazu N (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2131-2136
126. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts JAG, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP (1995) *Science* **268**: 1347-1349
127. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dalle JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM (1995) *Cell* **81**: 935-946
128. Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC (1995) *Science* **268**: 411-415
129. Yanagisawa J, Takahashi M, Kanki H, Yanagisawa H, Tazunoki T, Sawa E, Nishitoba T, Kamishohara M, Kobayashi E, Kataoka S, Sato T (1997) *J Biol Chem* **272**: 8539-8545
130. Chu K, Niu XH, Williams LT (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11894-11898
131. Becker K, Schneider P, Hofmann K, Mattmann C, Tschopp J (1997) *FEBS Lett* **412**: 102-106
132. Wright DA, Futcher B, Ghosh P, Geha RS (1996) *J Biol Chem* **271**: 31037-31043
133. Wallach D (1997) *Nature Lond* **388**: 123-126
134. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer J-L, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) *Nature (Lond)* **388**: 190-195
135. Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV (1997) *Immunity* **6**: 751-763
136. Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES (1997) *J Biol Chem* **272**: 18542-18545
137. Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach D (1997) *J Biol Chem* **272**: 19641-19644
138. Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM (1997) *J Biol Chem* **272**: 17255-17257

139. Shen Y, Shenk T (1995) *Curr Opin Gen Develop* **5**: 105-111
140. Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang G-H, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli K J, Cohen JI (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1172-1176
141. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer J-L, Schröter M, Scaffidi C, Kramer PH, Peter ME, Tschopp J (1997) *Nature (Lond)* **386**: 517-521
142. Hu S, Vincenz C, Buller M, Dixit VM (1997) *J Biol Chem* **272**: 9621-9624
143. Clem RJ, Duckett CS (1997) *Trends Cell Biol* **7**: 337-339
144. Uren A, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4974-4978
145. Huang DCS, Cory S, Strasser A (1997) *Oncogene* **14**: 405-414
146. Smith KGC, Strasser A, Vaux DL (1996) *EMBO J* **15**: 5167-5176
147. Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S (1993) *J Immunol* **151**: 621-627
148. Armstrong RC, Aja T, Xiang J, Gaur S, Krebs JF, Hoang K, Ba X, Korsmeyer SJ, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 16850-16855
149. Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N, Kaufmann SH, Sun S-C, Kumar R (1996) *J Biol Chem* **271**: 30354-30359
150. Lacroque V, Mignon A, Fabre M, Viollet B, Rouquet N, Molina T, Porteu A, Henrion A, Bouscary D, Varlet P, Joulin V, Kahn A (1996) *Nature Med* **2**: 80-86
151. Takahashi A, Musy P-Y, Martins LM, Poirier GG, Moyer RW, Earnshaw WC (1996) *J Biol Chem* **271**: 32487-32490
152. Geley S, Hartmann BL, Kapelari K, Egle A, Villunger A, Heidacher D, Greil R, Auer B, Kofler R (1997) *FEBS Lett* **402**: 36-40
153. Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS (1997) *J Biol Chem* **272**: 7797-7800
154. Takahashi A, Hirata H, Yonehara S, Imai Y, Lee K-K, Moyer RW, Turner PC, Mesner PW, Okazaki T, Sawai H, Kishi S, Yamamoto K, Okuma M, Sasada M (1997) *Oncogene* **14**: 2741-2752
155. Tewari M, Dixit VM (1995) *J Biol Chem* **270**: 3255-3260
156. Hawkins CJ, Uren AG, Häcker G, Medcalf RL, Vaux DL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13786-13790
157. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1996) *Nature (Lond)* **388**: 300-304
158. Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13973-13978
159. Orth K, Dixit VM (1997) *J Biol Chem* **272**: 8841-8844
160. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S (1997) *Immunol Today* **18**: 487-492
161. Buttke TM, Sandstrom PA (1994) *Immunol Today* **15**: 7-10
162. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY (1997) *Immunol Today* **18**: 493-497

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

**Gdańsk (Poland)
14-18 September, 1999**

Organized for ESSPMM

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

Chairman of the Organizing Committee: Prof. Dr Wiesław Makarewicz

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

Information and inquiries:

PP'99

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

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

Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie

Role of reactive oxygen species in apoptosis

GRZEGORZ BARTOSZ*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Reaktywne formy tlenu (RFT) mogą pośredniczyć w indukcji apoptozy
 - II-1. RFT wywołują apoptozę, przeciwutleniacze jej zapobiegają
 - II-2. RFT pośredniczą w apoptozie indukowanej działaniem innych czynników, przeciwutleniacze zapobiegają apoptozie
 - II-3. Obniżenie stężenia glutationu zachodzi we wczesnej fazie apoptozy
 - II-4. Bcl-2 i Bcl-x_L mają działanie przeciwutleniające
- III. W jaki sposób RFT mogą indukować apoptozę?
- IV. Argumenty przeciwko istotnej roli RFT w indukcji apoptozy
 - IV-1. Przewodniki nie zawsze są skuteczne
 - IV-2. Czynniki wywołujące apoptozę niekoniecznie indukują stres oksydacyjny
 - IV-3. Warunki prawie anaerobowe nie zapobiegają apoptozie
- V. Reaktywne formy tlenu, mitochondria a apoptoza
- VI. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Reactive oxygen species (ROS) may mediate induction of apoptosis
 - II-1. ROS induce apoptosis, antioxidants prevent apoptosis
 - II-2. ROS mediate apoptosis induced by other agents, antioxidants prevent apoptosis
 - II-3. Diminution of glutathione concentration occurs in an early stage of apoptosis
 - II-4. Bcl-2 and Bcl-x_L act as antioxidants
- III. How ROS can mediate apoptosis?
- IV. Arguments against an important role of ROS in the induction of apoptosis
 - IV-1. Antioxidants are not always efficient
 - IV-2. Apoptosis-inducing agents do not necessarily induce oxidative stress
 - IV-3. Near-anaerobic conditions do not prevent apoptosis
- V. Reactive oxygen species, mitochondria and apoptosis
- VI. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: BHA — butylohydroksyanizol; BHT — butylohydroksytoluen; BSO — butioniosulfoksymina; DCF — dichlorofluorescyna; DMPO — 5,5-dimetylopyrrolino-N-tlenek; DTPA — dietylotetraaminopentaocetan; EDTA — etylenodiaminotetraocetan; GSH — glutation zredukowany, GSSG — glutation utleniony (disulfid glutationu); NAC — N-acetylocysteina; PBN — N-t-butylo(-fenylo)nitron; RFT — reaktywne formy tlenu; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa; TEMPO — 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl.

I. Wstęp

Różnorodność czynników wywołujących apoptozę skłania do zastanowienia, czy wszystkich z nich nie łączy wspólny mechanizm działania. Pytanie to krzyżuje się z innym, stawianym od szeregu lat przez badaczy reaktywnych form tlenu: czy reaktywne formy tlenu, oprócz destruktywnego działania na składniki komórek nie pełnią jakiejś korzystnej funkcji przenośników informacji, podobnie jak zbliżona do nich pod względem wielu właściwości reaktywna forma azotu, tlenek azotu [1, 2]? Przesłanki te legły u boku podstaw hipotezy, iż wszystkie czynniki wywołujące apoptozę indukują stres oksydacyjny w komórkach wzmagając

wytwarzanie reaktywnych form tlenu lub upośredzając przeciwutleniające mechanizmy ochronne komórek [3, 4].

II. Reaktywne formy tlenu (RFT) mogą pośredniczyć w indukcji apoptozy

II-1. RFT wywołują apoptozę, przeciwutleniacze jej zapobiegają

Stwierdzono, że RFT lub czynniki upośredzające antyoksydacyjne mechanizmy obronne indukują apoptozę komórek wielu typów, a przeciwutleniacze wykazują w tych przypadkach działanie ochronne. Apoptozę komórek wywołują bezpośrednio reaktywne formy tlenu i azotu, produkty reakcji RFT (np. nadtlenuki) i związki powstające z rozpadu tych produktów oraz czynniki indukujące bądź zwiększające wytwarzanie RFT (Tab. 1). Należy jednak wspomnieć, że wymieniony w tabeli tlenek azotu może też działać antyapoptycznie [48, 49]. Donor tlenu azotu, S-nitrozoglutation indukuje apoptozę tymocytów w niskich stężeniach (<0,6 mM), natomiast w wyższych stężeniach (1-2 mM) hamuje apoptozę wywołaną działaniem innych czynników [50].

Mechanizm apoptycznego działania TNF wydaje się polegać na indukcji wytwarzania RFT w mitochon-

* Prof. dr hab., Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl

Tabela 1.

Niektóre czynniki wywołujące apoptozę: reaktywne formy tlenu, produkty ich reakcji i czynniki indukujące bądź zwiększające wytwarzanie reaktywnych form tlenu

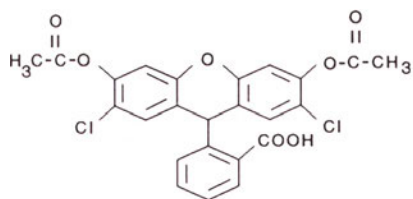
Czynnik	Piśmiennictwo
Nadtlenek wodoru, niskie stężenia (10– 100 μ M)	[5-9]
Ozon	[10]
Tlenek azotu	[11-13]
Nadtlenoazotyn	[14-17]
Wodoronadtlenek <i>t</i> -butylowy	[18, 125]
Nadtlenki lipidów	[19, 20]
4-Hydroksynonenal	[21]
Akroleina	[22]
Oksydacyjnie modyfikowana lipoproteina o niskiej gęstości (LDL)	[23]
Wysokie ciśnienie parcjalne tlenu	[24, 25]
Promieniowanie nadfioletowe	[26, 27]
Promieniowanie jonizujące	[9, 28]
Terapia fotodynamiczna	[29, 30]
Antracykliny	[31]
Menadion i inne naftochinony	[32, 123]
Parakwat	[33]
<i>cis</i> -Diaminochloroplatyna	[34]
Bleomycyna	[9]
Neokarcynostatyna	[9]
Dopamina	[35, 36]
Dopamino-melanina	[37]
Cyjanki	[38]
Jony żelaza	[39]
Jony miedzi	[40]
Jony manganu	[41, 42]
Jony wanadu	[43]
Jony rtęci	[44]
Cukry redukujące, w tym glukoza	[45, 46]
Czynnik martwicy guzów (TNF)	[47]

driach [50], choć nie wszyscy badacze podzielają ten pogląd [51, 52]. Anomalie struktury mitochondriów typowe dla stresu oksydacyjnego stwierdzono w komórkach niektórych przynajmniej typów poddanych działaniu TNF [53]. Indukcji apoptozy przez TNF przeciwdziałała atmosfera beztlenowa i nadekspresja zlokalizowanej w mitochondriach MnSOD [54].

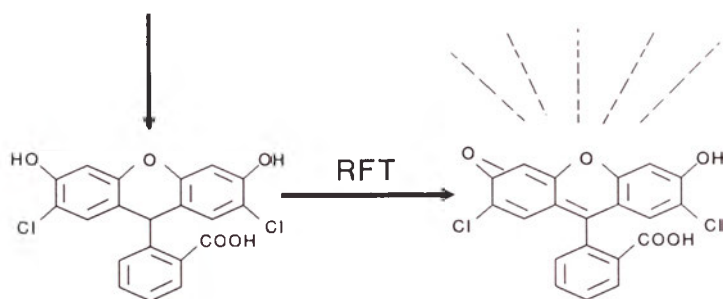
Indukcja apoptozy hepatocytów *in vitro* przez etanol wiąże się ze stresem oksydacyjnym. W komórkach poddanych działaniu etanolu obserwowano wzrost szybkości wewnątrzkomórkowego utleniania dichlorofluorescyny (będącej miarą szybkości tworzenia nadtlenków; Ryc. 1). Apoptoza wywołana przez etanol była hamowana przez przeciwutleniacze i 4-metylopirazol (inhibitor dehydrogenazy alkoholowej), co sugeruje, że mechanizm apoptycznego działania etanolu polega na stymulacji wewnątrzkomórkowego wytwarzania RFT podczas metabolizmu etanolu [55]. Istnieją również podstawy, by sądzić, że amyloid odkładający się w blaszkach włókien nerwowych osób dotkniętych chorobą Alzheimera powoduje apoptozę neuronów poprzez mechanizm stresu oksydacyjnego. Cytotoksyczne fragmenty amyloidu wywołują bowiem *in vitro* apoptozę neuronów embrionów szczura indukując równocześnie znaczne obniżenie stężenia glutationu w tych komórkach [56, 57].

Przeciwutleniacze i przeciwutleniające enzymy ochronne hamują apoptozę wywołaną działaniem RFT i wytwarzających je czynników. Ekspozycja na działanie układu glukoza/oksydaza glukozy (wytwarzającego nadtlenek wodoru) lub na działanie dimetylomaleinianu (tworzącego koniugat z glutationem i pozbawiającego komórki tego głównego hydrofilowego przeciwutleniacza) wywołują apoptozę komórek mięśni gładkich, której przeciwdziała katalaza i chelator jonów żelaza, deferryoksamina [58]. Apoptozie wywołanej przez TNF przeciwdziała tioredoksyna i N-acetylocysteina [59] oraz wysoki poziom aktywności SOD w komórkach [60]. N-(2-Merkaptoetylo)-1,3-propanodiamina (związek WR-1065) hamuje apoptozę wywołaną działaniem promieniowania jonizującego [61]. Apoptoza mieloidalnych komórek białaczkowych M1, zarówno zależna, jak i niezależna od genu p53, jest hamowana przez przeciwutleniacze takie jak N-acetylocysteina (NAC), PBN, BHT i BHA, a wzmagana przez egzogenne nadtlenek wodoru [62]. Odwrotnie, obniżenie stężeń przeciwutleniaczy i obniżenie aktywności przeciwutleniających enzymów ochronnych może mieć działanie apoptyczne. Apoptoza zachodzi w następstwie obniżenia stężeń głównych wewnątrzkomórkowych przeciwutleniaczy, zwłaszcza glutationu [63] i utlenienia innych wewnątrzkomórkowych tioli [64]. Komórki wykazujące niedobór peroksydazy glutationowej są bardziej wrażliwe na apoptyczne działanie czynników wytwarzających nadtlenek wodoru [65]. Niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej zwiększa podatność leukocytów na apoptyczne działanie czynników takich jak promieniowanie jonizujące czy daunomycyna [66]. Nadekspresja dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) przeciwdziała apoptozie neuronów spowodowanej pozbawieniem czynnika wzrostu neuronów [67], natomiast oligonukleotydy antysensowe specyficzne wobec RNA dla CuZnSOD indukują apoptozę w komórkach PC12 [68]. Neurony myszy transgenicznym pozbawionych

Dioctan dichlorofluorescyny



Dichlorofluoresaceina



Dichlorofluorescyna (DCF)

geny CuZnSOD łatwiej ulegają apoptozie w następstwie niedokrwienia i reperfuzji mózgu [69].

Podwyższenie aktywności SOD (wytwarzającej nadtlenek wodoru), któremu nie towarzyszy odpowiedni wzrost aktywności enzymów usuwających H_2O_2 wywołuje jednak stres oksydacyjny spowodowany zwiększeniem poziomu nadtlenku wodoru. Taki stres oksydacyjny może również wywoływać apoptozę. Neurony kory mózgu 16-19-tygodniowych embrionów z zespołem Downa (trisomia 21 prowadząca m.in. do zwiększonej aktywności CuZnSOD kodowanej przez gen umiejscowiony na tym chromosomie) ulegają spontanicznej apoptozie po 7-14 dniach hodowli, podczas gdy neurony embrionów nie obciążonych tym zespołem nie wykazują oznak apoptozy. Neurony pochodzące od embrionów z zespołem Downa również szybciej utleniają DCF, a ich apoptozie przeciwdziałają przeciwutleniacze [70]. Neurony myszy transgenicznych wykazujących nadekspresję CuZnSOD cechują się niższym poziomem glutationu, zapewne w następstwie stresu oksydacyjnego. Neurony te łatwiej ulegają apoptozie wywołanej działaniem kwasu kainowego [71]. Komórki hemopoetyczne i tymocyty myszy z nadekspresją CuZnSOD łatwiej ulegają apoptozie, szybciej utleniają DCF i wykazują wyższą peroksydację lipidów [72]. Również neurony, w których uzyskano ekspresję zmutowanej formy CuZnSOD, charakterystycznej dla rodzinnej postaci stwardnienia zanikowego bocznego (choroby Lou-Geringa) łatwiej ulegają apoptozie po pozbawieniu surowicy w pożywce; chelatory metali (dietyloditiokarbaminian i penicyloamina) hamują tę apoptozę [73].

Interesujące obserwacje dotyczą wpływu nadtlenku wodoru na komórki *in vitro*. Dobowa ekspozycja fibroblastów na działanie niższych stężeń tego czynnika (50-100 μM , tj. 1-2 $\mu mol/10^6$ komórek) powoduje pojawienie się „fenotypu starych komórek”, niezdol-

nych do podziału, ale też nie wykazujących oznak apoptozy; wyższe stężenia nadtlenku wodoru (300-400 μM) powodują apoptozę [74]. Nadtlenek wodoru nie indukuje apoptozy w starych fibroblastach [7]. Komórki linii T (CCRF-CEM) w pożywce bez surowicy ulegają apoptozie, jeśli ich stężenie jest niższe niż $2 \cdot 10^5/ml$. Zdolność tych komórek do wzrostu w wyższych stężeniach jest uwarunkowana autokrynnym wydzielaniem przez nie katalazy do środowiska [75].

Indukcja apoptozy przez stres oksydacyjny może być fizjologicznym mechanizmem regulacyjnym. W sytuacjach, w których makrofagi [76] i neutrofile [13] zabijają komórki indukując w nich apoptozę, głównymi mediatorami tego działania wydają się być RFT i tlenek azotu. Hemopoeza wątrobowa ustaje u gryzoni w okresie perinatalnym. Wydaje się, że przyczyną apoptozy komórek hemopoetycznych, jaka zachodzi w tym okresie jest obniżenie stężenia GSH w wątrobie i prawdopodobnie zmniejszone uwalnianie tego związku przez hepatocyty przed końcem ciąży [77].

W sytuacjach, w których apoptoza indukowana przez stres oksydacyjny jest zjawieniem dla organizmu, przeciwutleniacze mogą wykazywać paradoksalnie niekorzystne działanie. Istotnie wykazano, iż dieta bogata w witaminę E (przeciwutleniacz) sprzyja wzrostowi nowotworów wątroby myszy poddanych działaniu dietylnitrozoaminy, zmniejszając apoptozę komórek nowotworowych [78].

Zanik ogona podczas metamorfozy kijanek zachodzi dzięki apoptozie komórek tworzących ten organ. Wydaje się, że indukcja apoptozy komórek ogona kijanki żaby *Rana rugosa* jest indukowana przez nadtlenek wodoru: w okresie poprzedzającym apoptozę w tkankach ogona wzrasta aktywność CuZnSOD (wytwarzającej H_2O_2), a maleje aktywność katalazy (usuwającej H_2O_2). Analogicznych zmian nie obserwowano w innych tkankach [79].

Ryc. 1. Pomiar utleniania niefluoryzującej 2', 7'-dichlorofluorescyny (DCF) do fluoryzującej 2', 7'-dichlorofluoresceiny jest najczęściej metodą oceny wytwarzania RFT w komórce. Substrat dla reakcji z RFT powstaje w wyniku wewnątrzkomórkowej hydrolizy estru DCF, łatwo przenikającego przez błonę plazmatyczną DCF i produkt jej utlenienia przenikają znacznie gorzej i są zatrzymywane w komórce.

Z drugiej strony, stres oksydacyjny wydaje się też leżeć u podłoża apoptozy towarzyszącej wielu chorobom i procesowi starzenia się: apoptozy neuronów istoty czarnej mózgu zachodzącej podczas starzenia się organizmu [80], apoptozy neuronów w następstwie urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego [69] i w przebiegu takich chorób charakteryzujących się degeneracją neuronów jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimera i stwardnienie zanikowe boczne [81], apoptozy komórek nerek towarzyszącej nefropatii cukrzycowej [82] oraz apoptozy limfocytów T zaatakowanych przez wirusa HIV [83, 84].

II-2. RFT pośredniczą w apoptozie indukowanej działaniem innych czynników, przeciwutleniające zapobiegają apoptozie

Samo wykazanie indukcji apoptozy przez stres oksydacyjny nie dałoby asumptu do wnioskowania o bardziej uniwersalnej roli RFT w tym procesie. Stwierdzono jednak, że przeciwutleniające chronią także przed apoptozą indukowaną przez szereg innych czynników, które niekoniecznie wiązano z zaburzeniem równowagi pomiędzy peroksydantami a antyoksydantami czyli z indukcją stresu oksydacyjnego. Przyjrzyjmy się kilku przykładom. Szereg chelatorów metali takich jak etylenodiaminotetraoctan (EDTA), dietylotetraaminopentaoctan (DTPA), przeciwutleniające takie jak 2,2,6,6-tetrametylopiperidyno-1-oksyl (TEMPO) i pułapki spinowe N-t-butylo- α -fenylnitron (PBN) czy 5,5-dimetylo-1-pirolino-1-tlenek (DMPO) hamują apoptozę tymocytów indukowaną działaniem deksametazonu czy etopozydu [85, 86]. Przeciwutleniacz WR-1065 przeciwdziała także apoptozie tymocytów indukowanej przez glukokortykoidy i jonofory Ca^{2+} [61], a przeciwutleniacz kurkumina [87] i pułapki spinowe [88] apoptozie tych komórek wywołanej przez glukokortykoidy, tapsygarginę i etopozyd. Przeciwutleniające hamują apoptozę indukowaną przez inhibitory topoizomerazy [89]. Hybrydy komórek T ulegają apoptozie po pobudzeniu receptora T; apoptozie tej przeciwdziała NAC [90]. Przeciwutleniające przeciwdziałają apoptozie komórek białaczkowych HL-60 indukowanej działaniem syntetycznego retinoidu, o prawdopodobnych właściwościach przeciwnowotworowych [91], apoptozie komórek raka jajnika indukowanej przez transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$ [92], apoptozie neuronów wywołanej przez endogenną neurotoksynę (N-metylo(R)salizolinol) [93], apoptozie hepatocytów wywołanej przez kwasy żółciowe [94] oraz apoptozie komórek leukemicznych WEH231 indukowanej przez ceramid i sieciowanie IgM na powierzchni komórek [95]. Proapoptyczne działanie leków cytotoksycznych (etopozyd, kamptotecyna, melfalan i chlorambucyl) jest hamowane przez katalazę [29]. Obniżenie stężenia glutationu wzmacnia, a dodanie katalazy hamuje apoptozę zainfekowanych wirusem HIV limfocytów T wywołaną

Tabela 2.

Niektóre czynniki przeciwdziałające apoptozie: antyoksydanty i chelatory jonów metali

Czynnik	Písmienictwo
Glutation	[63, 96, 106]
Witamina E	[78]
N-Acetylocysteina	[59, 62, 90]
BHA	[62]
BHT	[62]
TEMPO	[85, 86]
DMPO	[85, 86]
PBN	[62, 85, 86]
Kurkumina	[87]
N-(2-Merkaptoetylo)-1,3-propanodiamina (związek WR-1065)	[61]
Tlenowe pochodne fullerenów	[98]
Tioredoksyna	[59]
Dysmutaza ponadtlenkowa	[60, 67, 69]
Katalaza	[58]
Dietyloditiokarbaminian	[73]
Penicyloamina	[74]
EDTA	[85, 86]
DTPA	[85, 86]

przez kwas retinoidowy [96]. Współhodowla transformalnych i normalnych fibroblastów w obecności transformującego czynnika wzrostu β prowadzi do specyficznej eliminacji komórek nowotworowych na drodze apoptozy tych komórek. Proces ten jest hamowany przez przeciwutleniające [97]. Jako ciekawostkę chemiczną warto wspomnieć, że wśród przeciwutleniaczy skutecznie hamujących apoptozę znajdują się również polihydroksylowe pochodne buckminsterfullerenu $C_{60}(OH_nO_m)$ (przypomnijmy, że fullereny to aromatyczne klastery węgla o regularnej strukturze przestrzennej i ciekawych właściwościach fizycznych; ich odkrycie zostało uhonorowane nagrodą Nobla w zakresie chemii w roku 1996) [98]. Lista szeregu przeciwutleniaczy i chelatorów jonów metali, których antyapoptyczne działanie zostało wykazane doświadczalnie zestawiona jest w tabeli 2.

Istnieją dane wskazujące, że wiele czynników indukujących apoptozę wzmacnia wytwarzanie RFT w komórkach. Jest tak w przypadku pozbawienia komórek surowicy w pożywce [99-102] co (przynajmniej w przypadku hepatocytów) zwiększa w nich pulę słabo związanego żelaza, mogącego uczestniczyć w reakcji Fentona [101] i działania N-(4-hydroksyfenylo)-retinoamidu [91]. Transformujący czynnik wzrostu

TGF β 1 indukujący apoptozę komórek β trzustki [103] i hepatocytów w hodowli [104, 105] wzmacnia wytwarzanie RFT, obniżając równocześnie aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej w komórkach β , a stężenie GSH w hepatocytach. Apoptoza komórek nowotworowych wątroby hodowanych w pożywce bez surowicy w obecności jonów cynku, zależna od genu *c-myc*, związana jest z obniżeniem zawartości GSH i podwyższeniem szybkości utleniania DCF. Glutamina przeciwdziała apoptozie podwyższając poziom wewnątrzkomórkowego glutationu [106]. Wzmoczone wytwarzanie RFT ma miejsce w takich sytuacjach indukujących apoptozę jak pobudzenie receptora CD95L komórek Th1 przez glikoproteinę gp120 wirusa HIV (107) oraz pobudzenie komórek mikrogleju przez białko prionowe [108]. Stwierdzono, że zwiększenie wytwarzania RFT zachodzi we wczesnym etapie apoptozy tymocytów indukowanej przez deksametazon [109]. Początkowe stadia apoptozy kończącej życie neutrofilii charakteryzują się spadkiem poziomu glutationu i aktywności CuZnSOD [110]. Deprenyl hamujący apoptozę neuronów indukuje w tych komórkach syntezę CuZnSOD i MnSOD [111]. Apoptoza neurofilii, zarówno spontaniczna jak i indukowana przez aktywację receptora Fas/APO-1 zachodzi znacznie wolniej w przypadku komórek pochodzących od osób z przewlekłą chorobą ziarniniakową (charakteryzującą się defektem oksydazy NADPH, wytwarzającej anionorodnik ponadtlenkowy w tych komórkach) [112].

C2-Ceramid (N-acetylosfingozyna), uważany za wtórny przekaznik takich czynników apoptycznych jak TNF, zwiększa uwalnianie RFT przez mitochondria, (kompleks oddechowy I) [113-115]. Wśród genów, których ekspresja ulega zwiększeniu w następstwie uaktywnienia genu *p53*, znajdują się białka indukujące lub odpowiadające na stres oksydacyjny [116]. Komórki, w których uzyskano nadekspresję genu *p53*, wykazywały znacznie zwiększone wytwarzanie RFT [117].

II-3. Obniżenie stężenia glutationu zachodzi we wczesnej fazie apoptozy

W przebiegu apoptozy indukowanej działaniem szeregu czynników obserwowano obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia zredukowanego glutationu. Znaczne obniżenie stężenia GSH obserwowano we wczesnych stadiach apoptozy tymocytów wywołanej przez deksametazon, tapsygarginę i gliotoksynę [118]. Egzogenne zredukowane glutation (GSH) przeciwdziałał apoptozie, podczas gdy utleniony glutation (GSSG) nasilał ją [119].

Obniżenie poziomu zredukowanego glutationu niekoniecznie musi zachodzić w wyniku utlenienia; niektóre czynniki apoptyczne mogą indukować wpływ zredukowanego glutationu z monocytów [120] czy limfocytów [121]. Niezależnie jednak od mechanizmu,

obniżenie stężenia głównego wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza jeśli nie jest następstwem stresu oksydacyjnego, to indukuje go.

II-4. Bcl-2 i Bcl-xL mają działanie przeciwutleniające

Ekspresja genu *Bcl-2* zapobiega apoptozie komórek ssaków. Jakkolwiek biologiczna rola produktu tego genu nie jest w pełni wyjaśniona [122], jedną z przypisywanych mu funkcji jest funkcja przeciwutleniająca [28, 123-125]. Ekspresja genu *Bcl-2* chroni komórki przed apoptozą wywołaną działaniem nadtlenu wodoru, menadionu [123] i wodoronadtlenku *t*-butylu [125] oraz obniżeniem poziomu GSH indukowanym działaniem dietylomaleinianu lub inhibitora syntezy glutationu, butionylosulfoksiminy (BSO) [124]. Ekspresja genu *Bcl-2* w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych SOD zwiększa ich przeżywalność w atmosferze tlenowej [124]. Mechanizm postulowanego przeciwutleniającego działania produktu genu *Bcl-2* nie jest jednak jasny. W doświadczeniach Kane'a i w s.p. [124] ekspresja genu *Bcl-2* w komórkach linii neuronalnej Gtl-7 przeciwdziałała obniżeniu poziomu GSH, podwyższeniu wytwarzania w tych komórkach reaktywnych form tlenu (mierzonych poprzez utlenianie DCF) i peroksydacji lipidów, co sugeruje hamowanie wytwarzania RFT. Doświadczenia Hockenbery'ego i w s.p. [123] w komórkach kilku typów wykazały brak zmian szybkości utleniania DCF, lecz obniżenie stopnia peroksydacji lipidów, co może wskazywać na przeciwutleniające działanie samego produktu genu *Bcl-2* lub na indukcję biosyntezy przeciwutleniaczy lub enzymów usuwających RFT. Transgeniczne myszy pozbawione obu kopii genu *Bcl-2* cechują się m.in. szybką depigmentacją włosów (6-tygodniowe myszy siwieją), co sugeruje zaburzenia wewnątrzkomórkowych procesów redoks uniemożliwiających prawidłową syntezę melanin [28]. Nadekspresja genu *Bcl-2* nie prowadzi do zmian aktywności takich enzymów antyoksydacyjnych jak SOD, katalaza i peroksydaza glutationowa, natomiast wpływa na stan redoks komórek zmniejszając stosunek stężeń utlenionego do zredukowanego glutationu [126]. Komórki PC12 transfekowane genem *Bcl-2* wykazują mniejszą peroksydację lipidów po ekspozycji na parakwat [33] i egzogenne źródło wolnych rodników nadtlennokowych [127].

Pogląd o przeciwutleniającym działaniu produktu genu *Bcl-2* został zakwestionowany przez Steinmana [128]. Stwierdził on zwiększenie częstości mutacji u bakterii *Escherichia coli*, u których wywołano ekspresję genu *Bcl-2*. Może to wskazywać na prooksydacyjne, a nie antyoksydacyjne działanie produktu genu *Bcl-2*. Zwiększenie aktywności katalazy-peroksydazy w komórkach *E. coli* w następstwie ekspresji genu *Bcl-2* może być przejawem odpowiedzi adaptacyjnej na prooksydacyjne działanie genu *Bcl-2*

wyrażające się przypuszczalnie wzmożeniem endogenego wytwarzania RFT [128].

Gen Bcl-x_L, homologiczny z genem Bcl-2, chroni również komórki przed apoptozą wywołaną przez promieniowanie gamma, ceramid i oksydanty. Ekspresja genu Bcl-x_L zmniejsza szybkość utleniania DCF i podwyższa poziom GSH w komórkach [129]. Wydaje się, że ekspresja genu Bcl-x_L musi prowadzić do wzmożenia syntezy GSH, bowiem w wyniku wzmożenia ekspresji genu Bcl-x_L obserwowano podwyższenie stężenia GSH nawet w komórkach eksponowanych na 1-chloro-2,3-dinitrobenzen, w których stężenie GSH spadło do niewykrywalnych wartości. Ekspresja genu Bcl-x_L przeciwdziała również obniżeniu stężenia GSH będącemu skutkiem zaprzestania podawania interleukiny 3 komórkom zależnym od tego czynnika i apoptozie komórek wywołanej brakiem interleukiny [130].

Gen ced-9 nicienia *Caenorhabditis elegans*, homolog ssaczego genu Bcl-2 może pełnić rolę w reakcjach redoks, bowiem koduje on białko podobne do cytochromu b560 kompleksu II mitochondrialnego łańcucha oddechowego [131]. Początkowo sądzono, że białkowy produkt genu Bcl-2 jest zlokalizowany na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Następnie stwierdzono jednak, że jest on związany z zewnętrzną błoną mitochondrialną, siateczką śródplazmatyczną i otoczką jądrową [132-134]; tak czy inaczej znajduje się więc w pobliżu głównych źródeł RFT w komórce.

III. W jaki sposób RFT mogą indukować apoptozę?

Wysunięto szereg, niekoniecznie wzajemnie wykluczających się hipotez dotyczących możliwych mechanizmów indukcji apoptozy przez RFT (stres oksydacyjny). RFT indukują podwójne pęknięcia DNA prowadzące do powstawania dużych fragmentów DNA zawierających 1-2 miliony par zasad. Zjawisko to poprzedza dalszą fragmentację DNA i być może jest czynnikiem indukującym apoptozę [9]

Stwierdzono także, że nadtlenek wodoru, zależnie od stężenia, może aktywować bądź hamować aktywność kaspaz [135]. Aktywacja kaspaz przez niskie stężenia H₂O₂ mogłaby bezpośrednio indukować apoptozę. Sfingomielinaza związana z błonami komórek wielu typów jest hamowana przez fizjologiczne stężenia glutationu. Zatem obniżenie stężenia glutationu może aktywować sfingomielinazę prowadząc do wytworzenia ceramidu [136].

RFT mogą też indukować apoptozę poprzez interakcję z komórkowymi szlakami przekazywania informacji zależnymi od fosforylacji reszt tyrozynowych [137].

Szereg czynników transkrypcyjnych (zwłaszcza NF-κB i AP-1) ulega aktywacji przez nadtlenek wodoru i inne RFT [138-140]. Z kolei indukcja czynnika NF-κB prowadzi m.in. do aktywacji czynnika trans-

krypcyjnego p53 [141]. Być może więc aktywacja czynników transkrypcyjnych prowadzi do ekspresji „genów śmierci komórki”. Z drugiej jednak strony, aktywacja czynnika NF-κB w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu nie musi prowadzić do apoptozy. Jest ona także konieczna, by zapobiec, drogą indukcji syntezy MnSOD, apoptozie neuronów wywołanej działaniem takich czynników jak TNFα i ceramid [142].

IV. Argumenty przeciwko istotnej roli RFT w indukcji apoptozy

IV-1. Przeciwutleniacze nie zawsze są skuteczne

Przeciwutleniacze, przeciwdziałające apoptozie indukowanej działaniem wielu czynników, nie są jednak skuteczne we wszystkich przypadkach. Niektórzy autorzy stwierdzili, że przeciwutleniacze nie hamują apoptozy indukowanej aktywacją receptora Fas [143, 144], pozbawieniem surowicy w pożywce, działaniem staurosporiny [70, 144] czy działaniem TNF [143].

Wiele przeciwutleniaczy może zresztą wywierać działanie niekoniecznie poprzez efekt antyoksydacyjny. Hamowanie apoptozy przez ditiokarbaminiany jest powszechnie przypisywane ich właściwościom przeciwutleniającym. Jednak związki te wywierają także działanie prooksydacyjne, a wykazano, że ich utlenione formy skuteczniej hamują apoptozę niż formy zredukowane (o właściwościach przeciwutleniających). Wydaje się, że antyapoptyczne działanie ditiokarbaminianów wiąże się głównie z hamowaniem aktywacji pro-kaspazy 3 przez disulfidy tych związków [145, 146].

IV-2. Czynniki wywołujące apoptozę niekoniecznie indukują stres oksydacyjny

Niektórym badaczom nie udało się stwierdzić, by początkowym stadium apoptozy towarzyszyło zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu uwidaczniające się jako wzmożenie szybkości utleniania DCF [62]. Porównanie przebiegu apoptozy tymocytów wywołanej działaniem różnych czynników wykazało, że o ile metyloprednizolon i tapsynergina zwiększają wytwarzanie RFT we wczesnych etapach apoptozy, o tyle etopozyd wręcz obniża produkcję RFT i peroksydację lipidów w porównaniu z komórkami kontrolnymi [147]. Donoszono również o obniżeniu wytwarzania RFT w tymocytach w następstwie działania deksametazonu indukującego apoptozę [148].

IV-3. Warunki prawie anaerobowe nie zapobiegają apoptozie

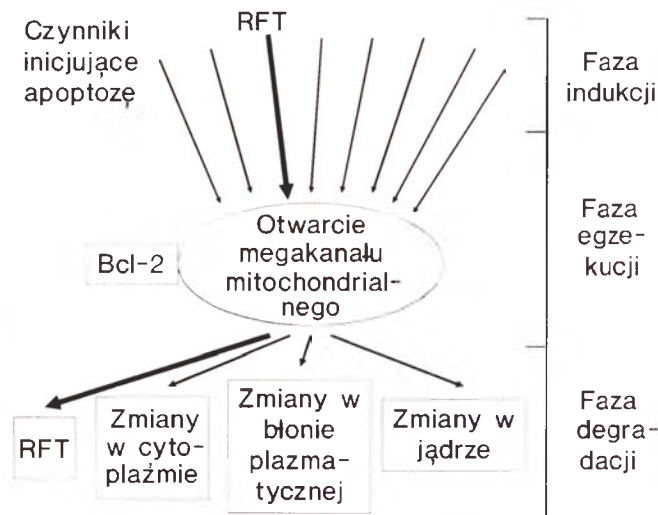
Jeśli apoptozę wywołuje stres oksydacyjny, to nie powinna ona zachodzić w warunkach, w których stres oksydacyjny nie może wystąpić — w warunkach

anaerobowych czy prawie anaerobowych. Obserwano wprawdzie, że atmosfera prawie anaerobowa (<20 ppm O₂) hamuje apoptozę wywołaną przez szereg czynników (sieciowanie receptora T, glukokortykoidy, jonofor Ca²⁺, promieniowanie jonizujące) [149], jednak sama ekspozycja na warunki prawie anaerobowe może powodować apoptozę, której zapobiega ekspresja genów Bcl-2 lub Bcl-x_L, lecz nie przeciwutleniacze [150]. Ekspresja genu Bcl-2 chroni więc przed apoptozą także w warunkach prawie anaerobowych. Ponadto, warunki prawie anaerobowe (<1 ppm O₂) przeciwdziałają wprawdzie apoptozie indukowanej przez czynniki utleniające (menadion czy Cu²⁺/askorbinian), lecz nie mają wpływu na przebieg apoptozy wywołanej przez inne czynniki (takie jak staurosporyna czy przeciwciała przeciw antygenowi Fas) [144]. Donoszono również o hamowaniu apoptozy zależnej od stymulacji antygenem Fas przez podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia anionorodnika ponadtlenkowego [151].

V. Reaktywne formy tlenu, mitochondria a apoptoza

Szereg przesłanek wskazuje na kluczową rolę mitochondriów w przebiegu apoptozy. Wiele czynników wywołujących apoptozę okazało się powodować niespecyficzne uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej (otwarcie megakanalu mitochondrialnego), a przeciwdziałanie otwarciu megakanalu działaniem takich czynników jak kwas bongkrekowy zapobiega apoptozie [152-154]. Otwarcie megakanalu i związane z nim obniżenie (bezwzględnej wartości) potencjału błonowego oraz wpływ Ca²⁺ z mitochondriów poprzedza, zdaniem K r o e m e r a i w s p., inne zmiany charakterystyczne dla apoptozy takie jak kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA i zmiany w błonie komórkowej [153, 155-157]. Może też prowadzić do wtórnego tworzenia dużych ilości RFT [158]. Uszkodzone w wyniku otwarcia megakanalu mitochondria mogą uwalniać cytochrom c, który współdziałając z innymi czynnikami może aktywować proteazę z rodziny kaspaz określaną symbolem CPP32 (apopainę) indukując apoptozę [154, 159]. Wczesnym etapem apoptozy, poprzedzającym fragmentację jądrowego DNA jest (przynajmniej w przypadkach apoptozy indukowanej działaniem oksydantów) fragmentacja mitochondrialnego DNA, rRNA i mRNA [160]. W myśl tej koncepcji, rola RFT w apoptozie jest dwójaka: RFT mogą indukować niespecyficzne uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej, a ten proces może z kolei wywoływać wtórną nadprodukcję RFT w komórce [161] (Ryc. 2). Nadekspresja genu Bcl-2 przeciwdziała nie tylko apoptozie, lecz także niespecyficznemu uprzepuszczalnieniu błony mitochondrialnej [154].

Stres oksydacyjny jest jednym z czynników, które mogą powodować otwarcie megakanalu mitochond-



Ryc. 2. Koncepcja kluczowej roli mitochondriów w indukcji apoptozy. RFT mogą indukować niespecyficzne uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej, któremu przeciwdziała produkt genu Bcl-2. W następstwie niespecyficznego uprzepuszczalnienia błony mitochondrialnej może dojść do wtórnej zwiększonej produkcji RFT.

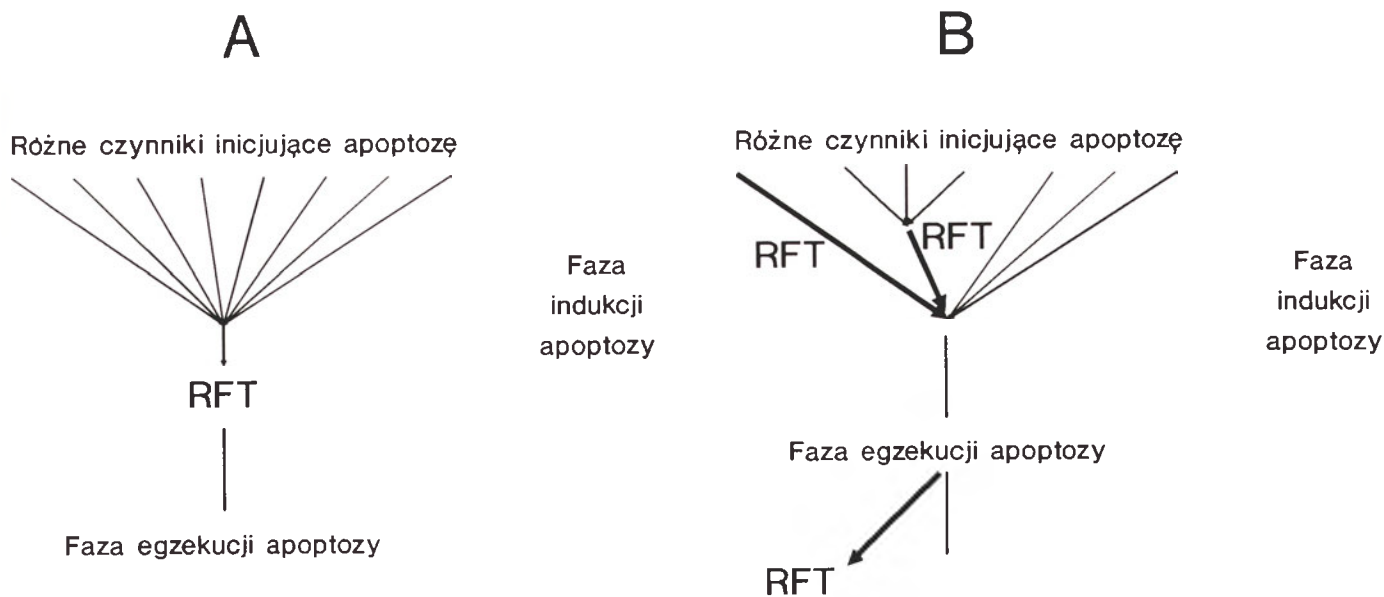
rialnego [157, 162] i to w dwojaki sposób. Wykazano istnienie dwóch centrów redoks regulujących otwarcie kanału. Jedno kontrolowane jest przez stopień utlenienia układu dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych (NADH/NAD⁺ i NADPH/NADP⁺), drugie natomiast zależy od stopnia utlenienia wewnątrzkomórkowych tioli (czyli głównie GSH/GSSG) [163].

W myśl jednej z hipotez, apoptoza wykształciła się w toku endosymbiozy prokariotycznych przodków mitochondriów jako proces umożliwiający endosymbiontowi zabicie komórki-żywiciela w sytuacji znacznie zmniejszonego dopływu substratów dla metabolizmu tlenowego, uwarunkowanego złą kondycją komórki [164]. Inna hipoteza zakłada, że niespecyficzne uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej jest mechanizmem umożliwiającym eliminację mitochondriów podczas gdy apoptoza pozwala na eliminację komórek wytwarzających zbyt duże ilości RFT [165].

Z drugiej strony, argumentują przeciwnicy mitochondrialnej koncepcji apoptozy, proces ten może być indukowany także w komórkach nie mających funkcjonalnych mitochondriów [51, 166].

VI. Podsumowanie

Hipoteza o istotnej roli RFT w przebiegu apoptozy ma swoich zwolenników i przeciwników. W ekstremalnej formie postulowała ona, że RFT są pośrednikami działań wszystkich czynników indukujących apoptozę. Ta teza nie doczekała się doświadczonego poparcia, choć liczne badania wskazały na indukcję stresu oksydacyjnego przez wiele czynników apoptycznych (Ryc. 3). Popularna obecnie koncepcja wiąże indukcję apoptozy z zaburzeniem funkcji głównego źródła RFT w komórce, jakim są mitochondria, upatrując w niespecyficznym uprzepuszczalnieniu błony mitochondrialnej mechanizmu indukcji apoptozy. Zwiększone



Ryc. 3. Różne koncepcje roli RFT w przebiegu apoptozy: A) RFT są uniwersalnym wtórnym przekaźnikiem wszystkich czynników apoptycznych; B) RFT inicjują apoptozę i mogą pośredniczyć w indukcji apoptozy przez niektóre czynniki; ich zwiększone wytwarzanie może też towarzyszyć późniejszym stadiom apoptozy.

wytwarzanie RFT może też mieć miejsce w późniejszych stadiach apoptozy.

Artykuł otrzymano 28 listopada 1997 r.
Zaakceptowano do druku 18 grudnia 1997 r.

Piśmiennictwo

- Lander HM (1997) *FASEBJ* **11**: 118-124
- Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A (1997) *Free Radic Biol Med* **22**: 269-285
- Buttke TM, Sandstrom PA (1994) *Immunol. Today* **15**: 7-10
- Jacobson MD (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 83-86
- Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG (1991) *Cell Prolif* **24**: 203-214
- Satoh T, Sakai N, Enokido Y, Uchiyama Y, Hatanaka H (1996) *J Biochem* **120**: 540-546
- Gansauge S, Gansauge F, Gause H, Poch B, Schoenberg MH, Beger HG (1997) *FEBS Lett* **404**: 6-10
- Hellquist HB, Svensson I, Brunk UT (1997) *Redox Rep* **3**: 65-70
- Higuchi Y, Matsukawa S (1997) *Free Radic Biol Med* **23**: 90-99
- Kirichenko A, Li L, Morandi MT, Holian A (1996) *Toxicol Appl Pharmacol* **141**: 416-424
- Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS (1993) *J Immunol* **150**: 5080-5085
- Messmer UK, Ankarcona M, Nicotera P, Brüne B (1994) *FEBS Lett* **355**: 23-26
- Uchida T, Yamashita T, Araki A, Watanabe H, Sendo F (1997) *Int J Cancer* **71**: 231-236
- Lin K-T, Xue J-Y, Nomen M, Sour B, Wong PY-K (1995) *J Biol Chem* **270**: 16487-16490
- Salgo MG, Pryor WA (1996) *Arch Biochem Biophys* **333**: 482-488
- Salgo MG, Squadrito GL, Pryor WA (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **215**: 1111-1118
- Sandoval M, Zhang X-J, Liu X, Mannick EE, Clark DA, Miller MJS (1997) *Free Radic Biol Med* **22**: 489-495
- Klaidman LK, Mukherjee SK, Hutchin TP, Adams JD (1996) *Neurosci Lett* **206**: 5-8
- Sandstrom PA, Tebbey PW, van Cleave S, Buttke TM (1994) *J Biol Chem* **269**: 798-801
- Aoshima H, Satoh T, Sakai N, Yamada M, Enokido Y, Ikeuchi T, Hatanaka H (1997) *Biochim Biophys Acta* **1345**: 35-42
- Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP (1997) *J Neurosci* **17**: 5089-5100
- Li L, Hamilton RF Jr, Taylor DE (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* **145**: 331-339
- Sugawa M, Ikeda S, Kushima Y, Takashima Y, Cynshi O (1997) *Brain Res* **761**: 165-172
- Enokido Y, Hatanaka H (1990) *Brain Res* **536**: 23-29
- Kubo T, Enokido Y, Yamada M, Oka T, Uchiyama Y, Hatanaka H (1996) *Brain Res* **733**: 175-183
- Gorman A, McGowan A, Cotter TG (1997) *FEBS Lett* **404**: 27-33
- Pourzand C, Rossier G, Reelfs O, Borner C, Tyrrel RM (1997) *Cancer Res* **57**: 1405-1411
- Veis DJ, Sorenson CM, Shutter RJ, Korsmeyer SJ (1993) *Cell* **75**: 229-240
- Manev H, Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamov E, Ikonomic MD, Grayson DR (1995) *Exp Neurol* **133**: 198-206
- Separovic D, He J, Oleinick NL (1997) *Cancer Res* **57**: 1717-1721
- Muller I, Jenner A, Bruchelt G, Niethammer D, Halliwell B (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 254-257
- Dickancaite E, Cenas N, Kalvelyte A, Serapienienė N (1997) *Biochem Mol Biol Int* **41**: 987-994
- Fabisiak JP, Kagan VE, Ritov VB, Johnson DE, Lazo JS (1997) *Am J Physiol* **272**: C675-C684
- Walter Z, Mankiewicz J, Woźniak K (1997) XXXIII Zjazd Pol Tow Biochem. Kraków, Streszcz s 22
- Offen D, Ziv I, Sternin H, Melamed E, Hochman A (1996) *Exp Neurol* **141**: 32-39
- Shinkai T, Zhang L, Mathias SA, Roth GS (1997) *J Neurosci Res* **47**: 393-399
- Offen D, Ziv I, Barzilai A, Gorodin S, Glater E, Hochman A, Melamed E (1997) *Neurochem Inr* **31**: 207-216
- Mills EM, Gunasekar PG, Pavlakovic G, Isom GE (1996) *J Neurochem* **67**: 1039-1046
- Whittaker P, Hines FA, Robl MG, Dunkel VC (1996) *Toxicol Pathol* **24**: 558-563
- Tsang SY, Tam SC, Bremner I, Burkitt MJ (1996) *Biochem J* **317**: 13-16
- Desole MS, Sciola L, Delogu MR, Sircana S, Migheli R (1996) *Neurosci Lett* **209**: 193-196
- Desole MS, Sciola L, Delogu MR, Sircana S, Migheli R, Miele E (1997) *Neurochem Int* **31**: 169-176
- Bay BH, Sit KH, Paramanatham R, Chan YG

- (1997) *Biometals* 10: 119-122
44. Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D (1996) *Kidney Int* 50: 1032-1043
 45. Kaneto H, Fuji J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, Suzuki K, Nakamura M, Tsumi H, Yamasaki Y, Taniguchi N (1996) *Neurodegeneration* 5: 441-444
 46. Donnini D, Zambito AM, Perella G, Ambesi-Impiomato FS, Curcio F (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 219: 412-417
 47. Wallach D, Beldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenabeele P, Fiers W (1997) *FEBS Lett* 410: 96-106
 48. Mannik JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS (1994) *Cell* 79: 1137-1146
 49. Nicotera P, Brune B, Bagetta G (1997) *Trends Pharmacol Sci* 18: 189-190
 50. Sandau A, Brüne B (1996) *Cell Signal* 8: 173-177
 51. Gamen S, Anel A, Montoya J, Marzo I, Pinciro A, Naval J (1995) *FEBS Lett* 376: 15-18
 52. O'Donnell VB, Spycher S, Azzi A (1995) *Biochem J* 310: 133-141
 53. Matthews N (1983) *Br J Cancer* 48: 405-410
 54. Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV (1989) *Cell* 58: 923-931
 55. Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H (1997) *Hepatology* 25: 368-378
 56. Blanc EM, Toborek M, Mark RJ, Hennig B, Mattson MP (1997) *J Neurochem* 68: 1870-1881
 57. Müller WEG, Romero FJ, Perovic S, Pergande G, Pialoglou P (1997) *J Neurochem* 68: 2371-2377
 58. Li P-F, Dietz R, von Harsdorf R (1997) *FEBS Lett* 404: 249-252
 59. Chang DJ, Ringold GM, Heller RA (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 188: 538-546
 60. Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ, Matsushima K (1993) *FASEB J* 7: 361-368
 61. Ramakrishnan N, Catravas G (1992) *J Immunol* 148: 1817-1821
 62. Lotem J, Peled-Kamar M, Groner Y, Sachs L (1996) *Proc Nat Acad Sci USA* 93: 9166-9171
 63. Iwata S, Hori T, Sato N, Hirota K, Sasada T, Mitsui A, Hirkawa T, Yodoi J (1997) *J Immunol* 158: 3108-3117
 64. Sato N, Iwata S, Nakamura K, Hori T, Mori K, Yodoi J (1995) *J Immunol* 154: 3194-3203
 65. Kayanoki Y, Fuji J, Islam KN, Suzuki K, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N (1996) *J Biochem* 119: 817-822
 66. Efferth T, Fabry U, Glatte P, Osieka R (1995) *J Mol Med* 73: 47-49
 67. Greenlund LJS, Deckwerth TL, Johnson EM Jr (1995) *Neuron* 14: 303-315
 68. Troy CM, Shelanski ML (1994) *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 6384-6387
 69. Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, Hoffman EK, Scott RW, Epstein CJ, Chan PH (1997) *J Neurosci* 17: 4180-4189
 70. Busciglio J, Yankner BA (1995) *Nature (Lond)* 378: 776-779
 71. Bar-Peled O, Korkotian E, Segal M, Groner Y (1996) *Proc Nat Acad Sci USA* 93: 8530-8535
 72. Peled-Kamar M, Lotem J, Okon E, Sachs L, Groner Y (1995) *EMBO J* 14: 4985-4993
 73. Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizuadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS, Bredesen DE (1996) *Science* 271: 515-518
 74. Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB, Kola I (1997) *Cell Growth Different* 8: 589-598
 75. Sandstrom PA, Buttke TM (1993) *Proc Nat Acad Sci USA* 90: 4708-4712
 76. Aliprantis AO, Diez-Roux G, Mulder LCF, Zychlinsky A, Lang RA (1996) *Immunol Today* 17: 573-576
 77. Yamamasu S, Sato EF, Ogita S, Inoue M (1997) *Free Radic Biol Med* 23: 100-109
 78. Kolaja KL, Klaunig JE (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 143: 380-387
 79. Hanada H, Kashiwagi A, Takehara Y, Kanno T, Yabuki M, Sasaki J, Inoue M, Utsumi K (1997) *Free Radic Biol Med* 23: 294-301
 80. Anglade P, Vyas S, Hirsch EC, Agid Y (1997) *Histol Histopathol* 12: 603-610
 81. Simonian NA, Coyle JT (1996) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 83-106
 82. Zhang W, Khanna P, Chan LL, Campbell G, Ansari NH (1997) *Biochem Mol Med* 61: 58-62
 83. Pace GW, Leaf CD (1995) *Free Radic Biol Med* 19: 523-528
 84. Buttke TM, Sandstrom PA (1995) *Free Radic Res* 22: 389-397
 85. Wolfe JT, Ross D, Cohen GM (1994) *FEBS Lett* 352: 58-62
 86. Slater AFG, Nobel CSI, Maellaro E, Bustamante J, Kimland M, Orrenius S (1995) *Biochem J* 306: 771-778
 87. Sikora E, Bielak-Żmijewska A, Piwocka K, Skierski J, Radziszewska E (1997) *Biochem Pharmacol* 54: 899-907
 88. McConkey DJ, Orrenius S (1994) *Trends Cell Biol* 4: 370-375
 89. Verhaegen S, McGowan AJ, Brophy AR, Fernandes RS, Cotter TG (1995) *Biochem Pharmacol* 50: 1021-1029
 90. Sandstrom PA, Mannie MD, Buttke TM (1994) *J Leukoc Biol* 55: 221-226
 91. Delia D, Aiello A, Meron L, Nicolini M, Reed JC, Pierotti MA (1997) *Carcinogenesis* 18: 943-948
 92. Lafon C, Mathieu C, Guerrin M, Pierre O, Vidal S, Valette A (1996) *Cell Growth Differ* 7: 1095-1104
 93. Maruyama W, Benedetti MS, Takahashi T, Naoi M (1997) *Neurosci Lett* 232: 147-150
 94. Patel T, Gores GJ (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 142: 116-122
 95. Fang W, Rivard JJ, Ganser JA, LeBien TW, Nath KA, Mueller DL, Behrens TW (1995) *J Immunol* 155: 66-75
 96. Furuke K, Sasada T, Ueda-Taniguchi Y, Yamauchi A, Inamoto T, Yamaoka Y, Masutani H, Yodoi J (1997) *Cancer Res* 57: 4916-4923
 97. Langer C, Jürgensmeier JM, Bauer G (1996) *Exp Cell Res* 222: 117-124
 98. Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP, Lin TS, Choi DW (1996) *Neurobiol Dis* 3: 129-135
 99. Atabay C, Cagnoli CM, Kharlamov E, Ikonomicov MD, Manev H (1996) *J Neurosci Res* 43: 465-475
 100. Satoh T, Sakai N, Enokido Y, Uchiyama Y, Hatanaka H (1996) *Brain Res* 733: 9-14
 101. Ollinger K, Roberg K (1997) *J Biol Chem* 272: 23707-23711
 102. Barroso MP, Gomez-Diaz C, Lopez-Lluch G, Malagon MM, Crane FL, Navas P (1997) *Arch Biochem Biophys* 343: 243-248
 103. Islam KN, Kayanoki Y, Kaneto H, Suzuki K, Asahi M, Fuji J, Taniguchi N (1997) *Free Radic Biol Med* 22: 1007-1017
 104. Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I (1996) *J Biol Chem* 271: 7416-7422
 105. Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I (1997) *Hepatology* 26: 935-943
 106. Xu Y, Nguyen Q, Lo DC, Czaja ML (1997) *J Cell Physiol* 170: 192-199
 107. Radrizzani M, Accornero P, Delia D, Kurrle R, Colombo MP (1997) *FEBS Lett* 411: 87-92
 108. Brown DR, Kretzschmar HA (1997) *Histol Histopathol* 12: 883-892
 109. Torres-Roca JF, Lecoeur H, Amatore C, Gougeon M-L (1995) *Cell Death Differentiation* 2: 309-319
 110. Narayanan PK, Ragheb K, Lawler G, Robinson JP (1997) *J Leukoc Biol* 61: 481-488
 111. Tatton WG, Wadia S, Ju WY, Chalmers-Redman RM, Tatton NA (1996) *J Neural Transm Suppl* 48: 45-49

112. Kasahara Y, Iwai K, Yachie A, Ohta K, Konno A, Seki H, Miywaki T, Taniguchi N (1997) *Blood* **89**: 1748-1753
113. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC (1997) *J Biol Chem* **272**: 11369-11377
114. France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M (1997) *J Neurochem* **69**: 162-1621
115. Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G (1997) *J Biol Chem* **272**: 21388-21395
116. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) *Nature (Lond)* **389**: 300-305
117. Johnson TM, Yu Z-X, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11848-11852
118. Macho A, Hirsch T, Marzo I, Marchetti P, Dallaporta B, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1997) *J Immunol* **158**: 4612-4619
119. Beaver JP, Waring P (1995) *Eur J Cell Biol* **68**: 47-54
120. Ghibelli L, Coppola S, Rotilio G, Lafavia E, Maresca V, Ciriolo MR (1995) *Biochem Biophys Res Comm* **216**: 313-320
121. van den Dobbelsteen DJ, Nobel SI, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S, Slater AFG (1996) *J Biol Chem* **271**: 15420-15427
122. Reed JC (1997) *Nature (Lond)* **387**: 773-776
123. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) *Cell* **75**: 241-251
124. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Örd T, Bredesen DE (1993) *Science* **262**: 1274-1277
125. Zhong L-T, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4533-4537
126. Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G, Kane DJ, Testa MP, Kayalar C, Bredesen DE (1996) *J Neurochem* **67**: 1259-1267
127. Tyurina YY, Tyurin VA, Carta G, Quinn PJ, Schor NF, Kagan VE (1997) *Arch Biochem Biophys* **344**: 413-423
128. Steinmann HM (1995) *J Biol Chem* **270**: 3487-3490
129. Fang W, Nath K, Mackey MF, Noelle RJ, Mueller DL, Behrens TW (1997) *Am J Physiol* **272**: C950-C959
130. Bojes HK, Datta K, Xu J, Chin A, Simonian P, Nunez G, Kehrer JP (1997) *Biochem J* **325**: 315-319
131. Hengartner MO, Horvitz HR (1994) *Cell* **76**: 665-676
132. Reed JC (1995) *J Cell Biol* **124**: 1-6
133. Cory S (1995) *Ann Rev Immunol* **13**: 513-543
134. Park JR, Hockenbery DM (1996) *J Cell Biochem* **60**: 12-17
135. Hampton MB, Orrenius S (1997) *FEBS Lett* **414**: 552-556
136. Liu B, Hannun YA (1997) *J Biol Chem* **272**: 16281-16287
137. Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB, Dackiw AP, Marshall JC (1996) *Surgery* **120**: 150-157
138. Schreck R, Meier B, Männel DN, Dröge W, Bauerle PA (1992) *J Exp Med* **175**: 1181-1194
139. Meyer M, Schreck R, Bauerle PA (1993) *EMBO J* **12**: 2005-2015
140. Müller JM, Rupec RA, Bauerle PA (1997) *Meth Companion Meth Enzymol* **11**: 301-312
141. Wu H, Lozano G (1994) *J Biol Chem* **269**: 20067-20074
142. Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K (1997) *J Neurosci Res* **49**: 681-697
143. Hug H, Enari M, Nagata S (1994) *FEBS Lett* **351**: 311-313
144. Jacobson MD, Raff MC (1995) *Nature (Lond)* **374**: 814-816
145. Orrenius S, Nobel CSI, van den Dobbelsteen DJ, Burkitt MJ, Slater AFG (1996) *Biochem Soc Trans* **24**: 1032-1038
146. Stefan C, Nobel I, Burgess DH, Zhivotovsky B, Burkitt MJ, Orrenius S, Slater AFG (1997) *Chem Res Toxicol* **10**: 636-643
147. Bustamante J, Tovar AB, Montero G, Boveris A (1997) *Arch Biochem Biophys* **337**: 121-128
148. Wang JF, Jerrels TR, Spitzer JJ (1996) *Free Radic Biol Med* **20**: 533-542
149. Mc Laughlin KA, Osborne BA, Goldsby RA (1996) *Eur J Immunol* **26**: 1170-1174
150. Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y (1995) *Nature (Lond)* **374**: 811-813
151. Clement MV, Stamenkovic I (1996) *EMBO J* **15**: 216-225
152. Petit PX, Loceur H, Zorn E, Dauget C, Mignotte B, Gougeon ML (1995) *J Cell Biol* **130**: 157-167
153. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G (1996) *J Exp Med* **183**: 1533-1544
154. Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B, Kroemer G (1996) *J Immunol* **157**: 4830-4836
155. Kroemer G, Petit PX, Zamzami N, Vayssiere J-L, Mignotte B (1995) *FASEB J* **9**: 1277-1287
156. Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G (1996) *J Immunol* **157**: 512-521
157. Hirsch T, Marzo I, Kroemer G (1997) *Biosci Rep* **17**: 67-76
158. Macho A, Castedo M, Marchetti P, Aguillar JJ, Decaudin D, Zamzami N, Girard PM, Uriel J, Kroemer G (1995) *Blood* **86**: 2481-2487
159. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) *Cell* **86**: 147-157
160. Davies KJA (1997) *Soc Free Radic Res Summer Meeting, Abano Terme, Abstracts*, s. 71
161. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1996) *Apoptosis* **1**: 231-242
162. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF (1997) *Biosci Rep* **17**: 43-52
163. Constantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P (1996) *J Biol Chem* **271**: 6746-6751
164. Frade JM, Michaelidis TM (1997) *BioEssays* **19**: 827-832
165. Skulachev VP (1996) *FEBS Lett* **397**: 7-10
166. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC (1993) *Nature (Lond)* **361**: 365-369

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

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

Antyterminacja transkrypcji u bakterii i bakteriofagów

Transcription antitermination in bacteria and bacteriophages

KRYSTYNA I. WOLSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Antyterminacyjne białka modyfikujące polimerazę RNA
 - II-1. Białko N bakteriofaga λ
 - II-2. Białko Q bakteriofaga λ
 - II-3. Antyterminacja transkrypcji operonów rRNA (*rrn*) *Escherichia coli*
- III. Antyterminacyjne białka modyfikujące drugorzędową strukturę RNA
- IV. Antyterminacja transkrypcji z udziałem RNA
- V. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: *nut* (ang. *N utilization*) — segment RNA konieczny do N-zależnej antyterminacji; *qut* (ang. *Q utilization*) — segment DNA konieczny do Q-zależnej antyterminacji; RAT (RNA antiterminator) — drugorzędowa struktura antyterminacyjna w operonach katabolicznych; pz — pary zasad.

I. Wstęp

Każdy organizm, zarówno pro- jak i eukariotyczny dysponuje wieloma mechanizmami regulującymi ekspresję genów. Liczna grupa tych mechanizmów związana jest z terminacją transkrypcji. Terminatory transkrypcji zlokalizowane są nie tylko na końcach jednostek transkrypcyjnych (operonów), ale również w sekwencjach poprzedzających geny strukturalne, w obszarach między genami a nawet w obrębie genów. Można więc wnioskować *a priori* o konieczności supresji terminacji (antyterminacji) w zależności od warunków, w których znajduje się organizm.

Mechanizmy regulujące terminację transkrypcji są inne niż mechanizmy kontrolujące inicjację transkrypcji i mogą wykorzystywać takie mechanizmy jak translacja i posttranslacyjna modyfikacja RNA. Istotnymi czynnikami regulacyjnymi są również białka antyterminacyjne, z których większość to białka wiążące się do RNA.

Kontrolna rola białek antyterminacyjnych stanowi temat niniejszej pracy przeglądowej. Odróżniamy dwa podstawowe mechanizmy działania tych białek: 1) przez modyfikację polimerazy RNA i 2) przez modyfikację drugorzędowej struktury RNA. Problemy te

Contents:

- I. Introduction
- II. Antitermination proteins modifying RNA polymerase
 - II-1. Phage λ N protein
 - II-2. Phage λ Q protein
 - II-3. Antitermination in the rRNA (*rrn*) operons in *Escherichia coli*
- III. Antitermination proteins modifying RNA secondary structure
- IV. tRNA-directed transcription antitermination
- V. Concluding remarks

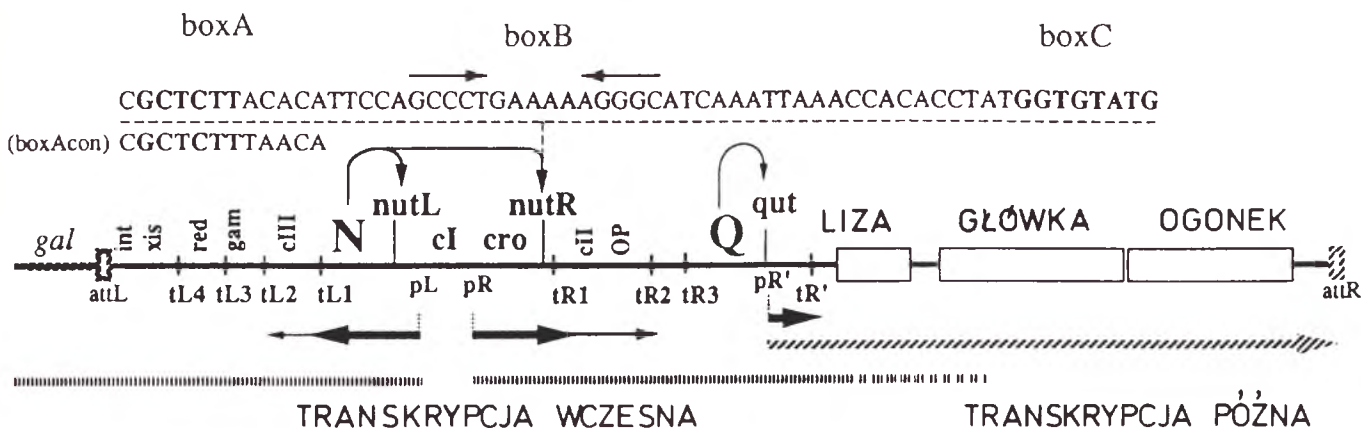
stanowią przedmiot kilku publikowanych ostatnio artykułów. Białka antyterminacyjne modyfikujące polimerazę RNA są szczegółowo omówione w rozdziale 55 ostatniego wydania znakomitej pracy monograficznej „*Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology” [1] oraz w artykułach [2-4]. Sposoby regulacji ekspresji genów przez zmiany drugorzędowej struktury RNA są przedstawione w pozycjach [4-6].

W tym artykule nie omówiono regulacji transkrypcji przez translację. Zainteresowanych tematem odsyłam przede wszystkim do kilku prac przeglądowych [5, 7-9]. Natomiast szczegółowe informacje związane z atenuacją transkrypcji w poszczególnych operonach można znaleźć w pracach: operony bi syntezy aminokwasów — [10-16], operony kodujące małą (*pheS*) i dużą (*pheT*) podjednostkę syntetazy fenyloalanylo-tRNA — [17, 18], operony biosyntezy pirymidyny, *pyrB1* i *pyrE* — [19, 20], operon β -laktamazy — [21, 22] oraz operon tryptofanazy *tna* — [23-25].

II. Antyterminacyjne białka modyfikujące polimerazę RNA

Antyterminacja transkrypcji z udziałem białek modyfikujących polimerazę RNA stanowi podstawowy mechanizm pozytywnej kontroli ekspresji genów umiarkowanego bakteriofaga λ , którego gospodarzem jest *Escherichia coli*. Fag λ koduje dwa białka antyterminacyjne N i Q, działające na kolejnych etapach rozwoju faga w komórce gospodarza [3]. Wydajny proces antyterminacji uzależniony jest również od aktywności białek bakteryjnych Nus [1]. Antyterminacja transkrypcji bakteryjnej na drodze modyfikacji polimerazy RNA ogranicza się do siedmiu opero-

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



Ryc. 1. Antyterminacja transkrypcji bakteriofaga λ .

Mapa genetyczna faga (środek), sekwencja *nutR* (góra), wpływ N i Q na antyterminację transkrypcji (dół).

nów *E. coli* kodujących stabilne RNA (*rrn*). W procesie tym biorą udział białka Nus i jeszcze niezidentyfikowany, być może białkowy, czynnik [1].

II-I. Białko N bakteriofaga λ

N jest małym białkiem zasadowym złożonym z 107 aminokwasów [26]. Okres jego półtrwania wynosi 2 do 5 min [27] a za degradację odpowiedzialna jest proteaza Lon [28]. Fagi lambdoidalne, 21 i P22, kodują białka homologiczne, które są jednak niezdolne do komplementacji mutacji N^- faga λ [29, 30]. Część N-terminalna wszystkich trzech białek zawiera sekwencje bogate w argininę, charakterystyczne dla wielu pro- i eukariotycznych białek wiążących RNA [30, 31]. Antyterminacyjna aktywność białka N umożliwia transkrypcję mRNA kodujących kilka innych białek fagowych w tym: *cII* i *cIII* — niezbędnych do lizogenizacji, *O* i *P* — koniecznych w replikacji i *Q* — aktywatora cyklu litycznego (Ryc. 1) [32, 33].

Na antyterminacyjną funkcję białka N wskazują następujące dane eksperymentalne: 1) Mutacje N^- nie mają wpływu na inicjację transkrypcji w promotorach, a więc N nie funkcjonuje jak aktywator inicjacyjny lub kodowany przez faga czynnik σ polimerazy RNA [2]. 2) Białko N dodane do układu transkrypcyjnego *in vitro* pozwala na wydłużenie krótkich prawo- i lewo-kierunkowych transkryptów za Rho-zależne terminatory t_{L1} i t_{R1} [34, 35].

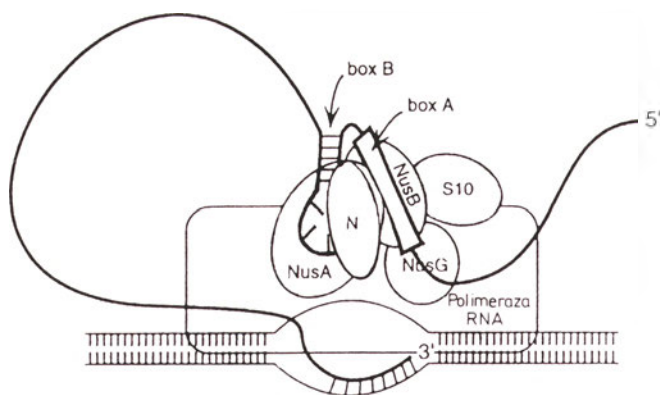
N umożliwia nie tylko supresję fagowych Rho-zależnych i właściwych (Rho-niezależnych) terminatorów, ale również licznych terminatorów bakteryjnych [36, 37]. Jedyńm warunkiem antyterminacyjnej funkcji N jest obecność miejsca *nut* przed suprymowanymi terminatorami [38, 39]. W genomie faga λ zlokalizowano dwa takie miejsca, *nut_L* [40] i *nut_R* [41]. Funkcjonalną formą jest *nutRNA*, co potwierdzają liczne badania genetyczne i biochemiczne [45-50]. Miejsca *nut* zawierają dwie sekwencje istotne dla ich prawidłowego funkcjonowania, *boxA* i *boxB* [46, 51-53]. Sekwencje *boxA* wszystkich bakteriofagów lambdoidalnych są bardzo podobne (*consensus*: GCCTCTTA) [29], natomiast sekwencje *boxB* różnią się znacznie, wszystkie jednak zachowują

zdolność do tworzenia drugorzędowej struktury transkryptu typu „pętla i trzonek”. Struktury te są rozpoznawane przez N-końcowe, bogate w argininę domeny białek N^1 , N^{21} i N^{P22} [30]. *boxB* faga λ jest krótką, 15-nukleotydową sekwencją. W wiązaniu białka N istotna jest reszta guaniny w jednoniciowej pętli; jakkolwiek zmiana tej zasady całkowicie niweluje wiązanie N. W interakcjach białka z *boxB* ważna jest również drugorzędowa struktura „trzonka” [54, 55].

Wydatna antyterminacja wymaga niekiedy supresji terminatorów znajdujących się w znacznej odległości od miejsca *nut*, które rozpoznaje i w którym wiąże się początkowo białko N. Istnieje duża ilość danych eksperymentalnych wskazujących, że zapętlenie transkryptu umożliwia trwały kontakt fizyczny między *nutRNA* a polimerazą RNA zaangażowaną w proces transkrypcji — *nutRNA* funkcjonuje więc jak sekwencja wzmacniająca transkrypcję (*enhancer*) i umożliwia modyfikację polimerazy w odległych miejscach [49, 56]. Prawdopodobnie *nutRNA* wiążąc N zwiększa jego miejscowe stężenie, co ułatwia oddziaływania z polimerazą RNA [2].

Modyfikacja polimerazy RNA przez białko N wymaga współdziałania białek Nus gospodarza: NusA, NusB, NusE (S10) i NusG. Początkowa analiza genetyczna pozwoliła zidentyfikować geny *nusA*, *nusB* i *nusE* [57-60] a następne badania *in vitro* przy użyciu ekstraktów komórkowych wykazały bezpośredni udział białek kodowanych przez te geny w N-zależnej antyterminacji transkrypcji [44, 61-65]. Późniejsze badania genetyczne oraz próba rekonstrukcji N-zależnej antyterminacji *in vitro* w obecności trzech wyżej wymienionych białek doprowadziła do identyfikacji i charakterystyki jeszcze jednego białka funkcjonującego w antyterminacji, NusG [66-68].

Dane dostarczone przez kilka zespołów badawczych i uzyskane przy użyciu licznych technik (żele opóźniające, chromatografia, immunoprecypitacja) stały się podstawą opracowania obowiązującego obecnie modelu budowy nukleoproteinowego kompleksu antyterminacyjnego bakteriofaga λ (Ryc. 2) [67, 69-72]. W kompleksie tym NusA pośredniczy w oddziaływaniach N z polimerazą RNA a NusE w oddziaływaniach



Ryc. 2. Model N-zależnego kompleksu antyterminacyjnego bakteriofaga λ .
Wg Richardsona i Greenblatta [1].
Wytłumaczenie w tekście.

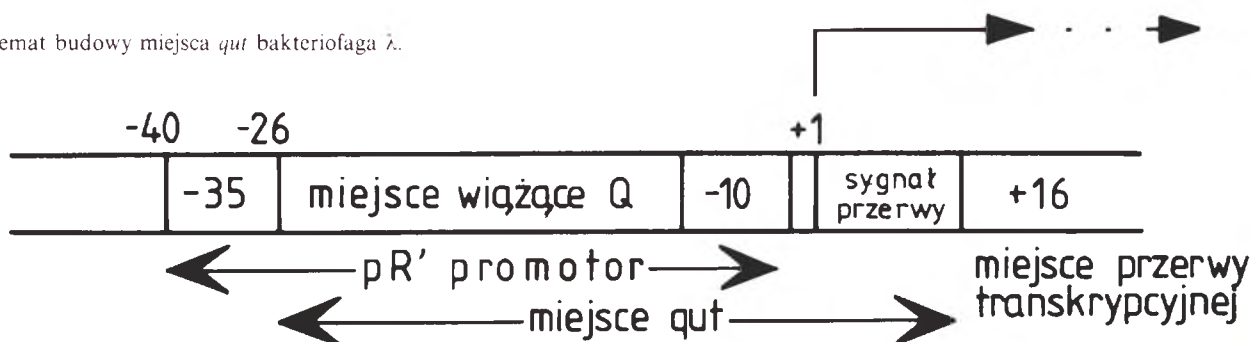
polimerazy RNA z NusB [69, 72]. Wykazano również istnienie interakcji dwóch białek z transkrypcyjnym RNA: białka N z sekwencją *boxB*, co zostało omówione powyżej i NusB z *boxA* [73]. Przedstawiony opis dotyczy tylko niektórych interakcji w kompleksie antyterminacyjnym. W rzeczywistości każdy element systemu oddziałuje przynajmniej z dwoma innymi składnikami a poszczególne oddziaływania białko-białko są słabe, co pociąga za sobą konieczność współdziałania wielu elementów [44, 73, 74].

Wieloskładnikowy kompleks jest trwały i zdolny do supresji terminatorów oddalonych o 5 a nawet o 10 tysięcy par zasad od miejsca *nut*; białka NusB, NusE i NusG pełnią w nim rolę stabilizacyjną [54, 75, 76]. Niepełny kompleks antyterminacyjny, zawierający obok N jedynie NusA, którego formowanie zachodzi nawet w nieobecności sekwencji *boxA*, jest niestabilny i mało procesywny. Kompleks ten jest zdolny do supresji terminatorów położonych blisko miejsca *nut* [47, 77]. Wykazano, że polimeraza RNA zmodyfikowana przez białko N w obecności NusA nie przerywa polimeryzacji RNA w licznych miejscach genomu określających przerwy transkrypcyjne a co za tym idzie charakteryzuje się zwiększoną wydajnością elongacji [76, 77a]. Zatrzymanie elongacji jest warunkiem koniecznym dla terminacji transkrypcji, a więc supresja przerw transkrypcyjnych wydaje się podstawowym mechanizmem antyterminacyjnej aktywności N [1].

II-2. Białko Q bakteriofaga λ

Białko Q zapobiega terminacji w terminatorze t_R

Ryc. 3. Schemat budowy miejsca *qut* bakteriofaga λ .



położonym za promotorem p_R bakteriofaga λ , co pozwala na wydajną transkrypcję odcinków kodujących tzw. „późne” funkcje faga [78, 79]. Antyterminacyjne działanie białka Q, podobnie jak białka N, nie jest zależne od suprimowanych terminatorów, ale od sekwencji *qut* częściowo zachodzącej na promotor późnego operonu p_R (Ryc. 3) [80-85]. Tuż za promotorem p_R , w pozycji +16 lub +17 zlokalizowane jest miejsce determinujące przerwę w procesie transkrypcji i właśnie pauzująca polimeraza RNA może być modyfikowana przez białko Q [81, 85-87].

W przeciwieństwie do N, białko Q jest przykładem białka wiążącego się z DNA a miejsce wiązania zlokalizowane jest między pozycją -30 a +10. Mutacje w -13 i -15 całkowicie hamują wiązanie Q z DNA, natomiast mutacje w +2 hamują modyfikację polimerazy RNA przez Q [85]. Zmodyfikowana polimeraza nie jest zdolna do terminacji transkrypcji w terminatorach właściwych i terminatorach Rho-zależnych [84, 86]. Ten sposób pozytywnej regulacji transkrypcji wydaje się być uniwersalny i wykorzystywany nie tylko przez białka N i Q, ale również przez regulatory transkrypcji eukariotycznej [88].

Q-zależna antyterminacja transkrypcji faga λ stymulowana jest jedynie przez białko NusA [86], natomiast białko Q faga lambdoidalnego 82 nie wymaga współdziałania z innymi białkami [89]. Prawdopodobna wydaje się więc możliwość bezpośredniego kontaktu Q z polimerazą RNA [1].

Jak dotąd istnieją dwie, nierozstrzygnięte eksperymentalnie, hipotezy tłumaczące trwałą modyfikację polimerazy RNA przez białko Q, co umożliwia supresję terminatorów odległych od miejsca *qut*. Pierwsza hipoteza zakłada, że kontakt polimerazy RNA i Q możliwy jest przez zapętlenie matrycy a to z kolei pozwala również na ciągły kontakt Q z sekwencją *qut*; druga hipoteza przyjmuje, że Q odłącza się od miejsca *qut* i utrzymuje połączenie jedynie z polimerazą RNA podczas elongacji transkrypcji [1].

II-3. Antyterminacja transkrypcji operonów rRNA (*rrn*) *Escherichia coli*

W genomie *E. coli* znajduje się siedem operonów kodujących stabilne RNA, których ekspresja jest pozytywnie regulowana przez antyterminację transkrypcji w Rho-zależnych terminatorach zlokalizowanych

w obrębie operonów [90-92]. W każdym z operonów *rrn* antyterminacja zależy od dwóch sekwencji zlokalizowanych między promotorami P2 a suprymowanymi terminatorami; *boxA* — analogicznej do odnajdywanej w operonach faga λ i położonej za nią drugiej sekwencji, jak dotąd bliżej niescharakteryzowanej [93, 94]. Układ antyterminacji *in vitro* wymaga użycia nieoczyszczonych ekstraktów komórkowych i nie udało się go odtworzyć stosując oczyszczone białka Nus. Wysznuo stąd wniosek, że antyterminacja w operonach *rrn* zależna jest przynajmniej od jeszcze jednego nieznanego czynnika [95, 96].

System antyterminacji operonów bakteryjnych *rrn* wykazuje daleko idące podobieństwo do N-zależnej antyterminacji faga λ i prawdopodobnie uwarunkowanych jest wytworzeniem stabilnego kompleksu pomiędzy polimerazą RNA a *boxA*RNA, czterema białkami Nus i niezidentyfikowanym czynnikiem (czynnikami) [1]. Podstawowa różnica między tymi dwoma systemami polega na supresji w operonach *rrn* jedynie terminatorów Rho-zależnych. Dwa alternatywne hipotetyczne wytłumaczenia tej obserwacji zakładają, że: a) kompleks antyterminacyjny wiąże białko NusG i przez to hamuje jego współdziałanie z białkiem Rho w terminacji lub b) Rho zostaje odłączone od kompleksu antyterminacyjnego (przez współdziałanie z NusG) co uniemożliwia jego terminacyjne funkcjonowanie [97].

III. Antyterminacyjne białka modyfikujące drugorzędową strukturę RNA

Antyterminacja transkrypcji przy udziale białek wiążących RNA i modyfikujących jego strukturę jest opisana dla dziewięciu operonów (regulonów) bakteryjnych. Osiem z nich to operony kataboliczne. Jeden, regulon *nas Klebsiella pneumoniae*, koduje białko niezbędne do asymilacji azotynów i azotanów. Pozytywna, regulacyjna funkcja tych białek polega na uniemożliwieniu utworzenia struktury terminatora co czasami, choć niekoniecznie, związane jest ze stabilizacją nietrwalej, alternatywnej struktury antyterminatora RAT.

Tabela 1 zawiera listę i krótką charakterystykę systemów antyterminacyjnych związanych z modyfi-

kacją struktury RNA. Sześć z tych systemów zostało zidentyfikowanych w gramododatniej bakterii *Bacillus subtilis*, trzy w gramujemnych bakteriach *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*. Antyterminacja transkrypcji indukowana jest przez niskocząsteczkowe związki, substraty reakcji katabolicznej [6]. Mechanizm indukcji jest różny, w kilku przypadkach związany z dwuskładnikowym systemem regulacyjnym i fosforylacją (defosforylacją) bezpośredniego aktywatora [98].

Pięć pierwszych, wymienionych w tabeli, systemów regulacyjnych (*E. coli bgl*, *B. subtilis sacPA*, *B. subtilis sacB*, *B. subtilis hgl* i *B. subtilis lic*) odznacza się znacznym podobieństwem i wchodzi w skład grupy operonów *bgl* – *sac*. Sekwencja białek antyterminacyjnych regulujących te operony jest homologiczna, mają one podobną wielkość i, do pewnego stopnia, zdolne są do wzajemnej komplementacji defektów funkcjonalnych [99]. W operonach tej grupy znajdują się bardzo podobne sekwencje istotne dla antyterminacji i umożliwiające utworzenie drugorzędowej struktury charakterystycznej dla antyterminatorów (RAT). Mechanizm aktywacji związany jest z fosforylacją białek regulatorowych. To podobieństwo systemów regulacyjnych operujących w różnych, niespokrewnionych bakteriach świadczy o międzygatunkowym, horyzontalnym przekazywaniu informacji genetycznej [6].

Prace Andrew Wrighta i w.s.p. pozwoliły na dokładne poznanie na poziomie molekularnym ekspresji pierwszego z badanych operonów katabolicznych, *bgl E. coli*. Operon *bgl* składa się z trzech genów, których produkty pozwalają na rozkład β -glukozydów: gen *bglG* — kodujący białko antyterminatora, gen *bglF* — kodujący białko transportujące β -glukozydy i gen *bglB* — kodujący β -glukozydazę [100-102]. W nieobecności β -glukozydów transkrypcja operonu kończy się w Rho-niezależnym terminatorze (atenuatorze) zlokalizowanym przed pierwszym genem strukturalnym *bglG* [103], drugi terminator znajduje się między genami *bglG* i *bglF* (Ryc. 4) [102]. Terminacja suprymowana jest przez pozytywny regulator transkrypcji, białko BglG [103, 104]. Brak β -glukozydów powoduje, że białko BglF fosforyluje małą, wewnątrzkomórkową ilość białka BglG, co prowadzi do jego

Tabela 1.

Operony regulowane przez antyterminacyjne białka wiążące mRNA

Operon (regulon)/funkcja	Organizm	Regulacyjne białko	Induktor antyterminacji
<i>bgl</i> /rozkład β -glukozydów	<i>E. coli</i>	BglG	β -glukozydy
<i>sacPa</i> /rozkład sacharozy	<i>B. subtilis</i>	SacT	sacharoza 1 mM
<i>sacB</i> /rozkład sacharozy	<i>B. subtilis</i>	SacY	sacharoza 30 mM
<i>bgl</i> /rozkład β -glukozydów	<i>B. subtilis</i>	LicT	β -glukozydy
<i>lic</i> /rozkład β -glukozydów	<i>B. subtilis</i>	LicT	tetrasacharydy
<i>glp</i> /rozkład glicerolu	<i>B. subtilis</i>	GlpP	glicerolo-3-fosforan
<i>hut</i> /rozkład L-histydyny	<i>B. subtilis</i>	HutP	histydyna
<i>ami</i> /rozkład amidów	<i>P. aeruginosa</i>	AmiR	alifatyczne amidy
<i>nas</i> /wykorzystanie azotynów i azotanów	<i>K. pneumoniae</i>	NasR	azotany/azotyny (operon anaboliczny)

inaktywacji [105-107]. Fosforylacja BglG przez BglF zapobiega tworzeniu dimerów zdolnych do wiązania RNA i aktywnych w antyterminacji [108]. Obecność β -glukozydów umożliwia defosforylację BglG przez BglF a co za tym idzie jego dimeryzację i funkcjonowanie jako antyterminatora transkrypcji [105-107]. Niefosforylowane dimery BglG wiążą się w sekwencjach mRNA poprzedzających i częściowo zachodzących na sekwencje terminatorów, zapobiegając tworzeniu się drugorzędowej struktury typu „pętla i trzonek”. Prawdopodobnie wiązanie BglG stabilizuje tworzenie się alternatywnych drugorzędowych struktur antyterminatorów [109, 110]. Wydaje się, że dwa inne gatunki bakterii, *Erwinia chrysanthemii* [111] i *Lactococcus lactis* [112] zawierają operony *bgl* regulowane w sposób zbliżony do opisanego dla *E. coli*.

Regulon *sac* *B. subtilis* składa się z czterech operonów kodujących białka enzymatyczne konieczne do wykorzystania sacharozy jako źródła węgla i białka regulacyjne [113-116]. Wiodące transkrypty trzech operonów, *sacPA*, *sacB* i prawdopodobne *sacXY* zawierają sekwencje terminatorów i częściowo na nie zachodzące sekwencje RAT [114, 116-118]. W obecności sacharozy białka antyterminacyjne, SacT i SacY, zapobiegają terminacji transkrypcji odpowiednio w operonach *sacPA* i *sacB*. [113, 114, 119, 120]. Obserwowano również krzyżową stymulację ekspresji [121]. Aktywność białka SacY regulowana jest przez białko SacX na drodze fosforylacji/defosforylacji [113], natomiast bardziej skomplikowany mechanizm aktywacji SacT związany jest z fosforylacją jednego z ważnych funkcjonalnie miejsc zwanego miejsce „ak-

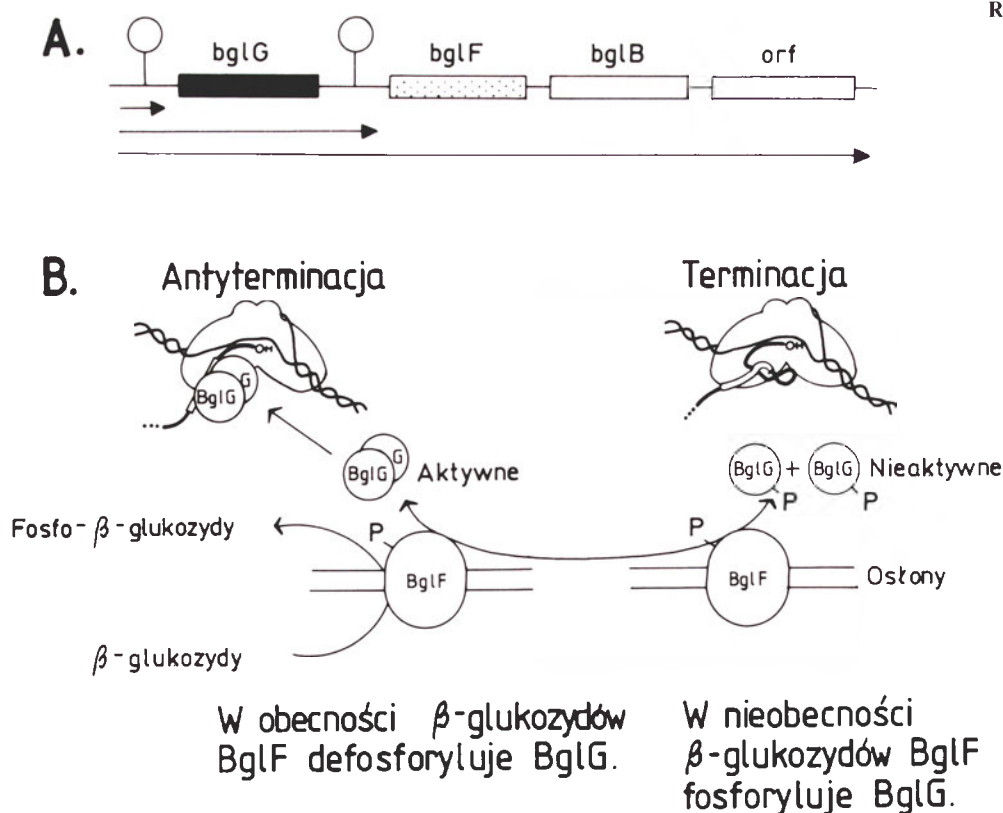
tywacyjnym” i defosforylacją drugiego, zwanego miejscem „inaktywacyjnym” [122].

W antyterminacji operonów *lic* i *bgl* *B. subtilis* bierze udział antyterminator LicT [99, 123, 124]. Białko LicT podobne jest do regulatorów BglG *E. coli* oraz SacT i SacY *B. subtilis* [99]. Szczegóły mechanizmu antyterminacji i aktywacji LicT mają wiele cech wspólnych z wyżej opisanymi systemami [6].

Regulon *glp* *B. subtilis* odpowiedzialny jest za katabolizm glicerolu i glicerolo-3-fosforanu i składa się z czterech operonów: *glpP*, *glpFK*, *glpD* i *glpTQ*; *glpP* koduje białko antyterminacyjne [125, 126, 127]. W odcinkach liderowych operonów *glpFP*, *glpD* i *glpTQ* znajdują się sekwencje terminatorów funkcjonujące przy braku indukcji operonów (w nieobecności glicerolo-3-fosforanu) [128, 129]. Gdy glicerolo-3-fosforan jest obecny, zaktywowane białko GlpP antyterminuje transkrypcję [6]. Istnieją doniesienia wskazujące, że białko to nie tylko działa jak antyterminator transkrypcji, ale również stabilizuje nietrwałą mRNA *glpD* [130].

Antyterminacyjna kontrola w operonie *hut* *B. subtilis* nie jest dokładnie poznana na poziomie molekularnym. Operon koduje enzymy niezbędne do katabolizmu L-histydyny [131]. Między genami *hutP* a *hutH* zlokalizowany jest terminator transkrypcji supresowany przez białko terminacyjne HutP [132, 133].

Operon *ami* *P. aeruginosa* składa się z pięciu genów i determinuje rozkład alifatycznych amidów [134, 135]. Między pierwszym (*amiE*) a drugim (*amiB*) genem struktury znajduje się terminator transkrypcji, którego supresja wymaga aktywności białka antyterminacyjnego AmiR [136, 137]. AmiR jest negatywnie regulo-



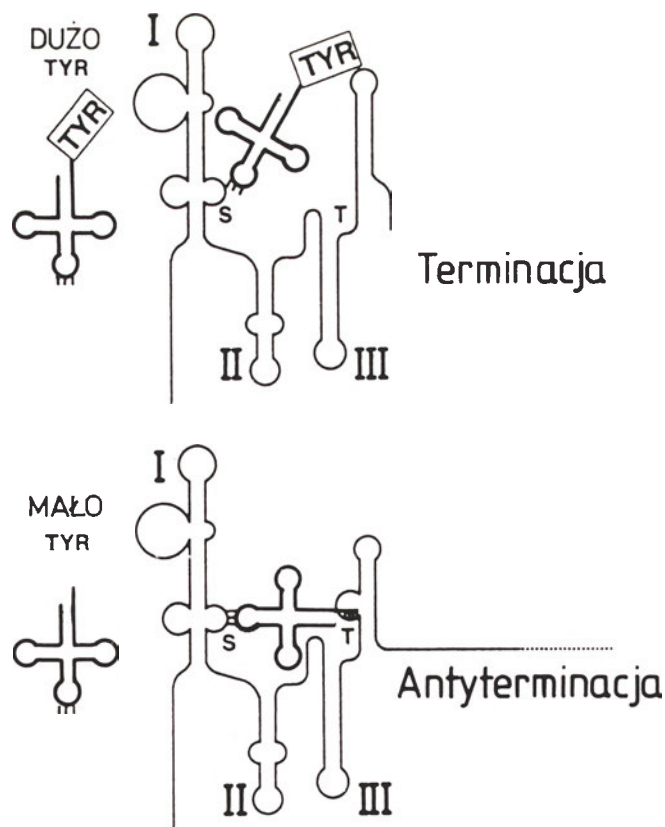
Ryc. 4. Regulacja operonu *bgl* *E. coli*. Schemat organizacji operonu i wzory jego transkrypcji (A), model kontroli antyterminacyjnej (B).

wany przez białko AmiC — dwa białka tworzą nieaktywny antyterminacyjny kompleks. Niskocząsteczkowy induktor (acetamid) powoduje dysocjację kompleksu AmiC-AmiR i uwolnienie AmiR, tym samym stymulując antyterminację [137].

Pozytywna regulacja ekspresji regulonu *nas*, umożliwiającego asymilację azotynów i azotanów jako jedyne źródła azotu w warunkach tlenowych, przypomina opisaną wyżej kontrolę operonów katabolicznych [138, 139]. W sekwencjach liderowych głównego operonu *nasF* znajduje się terminator transkrypcji, w którego supresji bierze udział białko antyterminacyjne NasR aktywowane przez azotyny i azotany [140, 141].

IV. Antyterminacja transkrypcji z udziałem tRNA

Transkrypcja przynajmniej 18 genów i operonów kodujących syntetazy aminoacylo-tRNA oraz enzymy związane z biosyntezą niektórych aminokwasów w bakteriiach gramododatnich kontrolowana jest przez antyterminację [142, 143]. Liderowe odcinki tych operonów zawierają trzy kolejne struktury typu „pętla i trzonek” oznaczone I, II i III, po których następuje silnie konserwowana sekwencja złożona z 14 pZl (-box) oraz drugorzędowa struktura terminatora [143]. Niesparowane trzy zasady stanowiące kodon odpowiedniego aminokwasu zlokalizowane są w wybrzuszeniu struktury I (S).



Ryc. 5. Model antyterminacji z udziałem tRNA (na przykładzie operonu *tyrS*).
Wytłumaczenie w tekście.

Znaczenie tej rozbudowanej struktury dla antyterminacji wykazano badając operony *tyrS* [145-147], *ilv-leu* [148] i *thrS* [149]. W każdym z odcinków liderowych istnieje możliwość utworzenia struktury antyterminatora, w której segment T, z wyjątkiem siedmiu środkowych zasad tworzących wybrzuszenie, sparowany jest z 5' segmentem wchodzącym w skład terminatora [143]. Struktura terminacyjna stabilizowana jest przez nieaminoacylowany tRNA, który wiąże się do dwóch wybrzuszeń — w strukturze I oraz w antyterminatorze (Ryc. 5A). Aminoacylowany tRNA nie wiąże się z antykodonom umiejscowionym w strukturze I, co umożliwia utworzenie drugorzędowej struktury terminatora (Ryc. 5B) [143]. Czynnikiem indukującym antyterminację danego operonu jest więc niedobór odpowiedniego aminokwasu [147-149].

V. Uwagi końcowe

Regulacja na etapie terminacji transkrypcji wydaje się mieć podstawowe znaczenie w ekspresji genów bakteryjnych i bakteriofagowych. Można wymienić cały wachlarz czynników, które potencjalnie podlegają tej regulacji, w tym: polimeraza RNA, białka wiążące się z RNA, rybosomy zaangażowane w proces translacji, czynniki terminacyjne, transkrypty jako takie [5].

Strategie regulacji przez modyfikację polimerazy RNA, nazwane przez Richardsona i Greenblatta „procesywnymi”, mają znaczenie ogólne. Strategie wykorzystujące modyfikację struktury transkryptu działają lokalnie, w obrębie jednego operonu lub regulonu. Ich różnorodność pozwala podejrzewać, że istnieje cała grupa jeszcze nie odkrytych mechanizmów tego typu regulacji.

Jak dotąd, znane są tylko nieliczne przykłady antyterminacyjnej kontroli transkrypcji w organizmach wyższych i ich wirusach. Stosunkowo dobrze zbadany mechanizm antyterminacyjnego działania białka TAR wirusa HIV-1 ma wiele cech wspólnych z N-zależną antyterminacją faga λ [88].

Artykuł otrzymano 11 września 1997 r.
Zaakceptowano do druku 8 grudnia 1997 r.

Piśmiennictwo

- Richardson J.P., 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
- Das A (1992) *J Bacteriol* **174**: 6711-6716
- Das A (1993) *Ann Rev Biochem* **62**: 893-930
- Wolska KI (1994) *Acta Microbiol Polon* **43**: 9-19
- Landick R, Turnbough CL Jr, Yanofsky C (1996) W: Neidhardt NC, Curtiss III R, Ingraham JL, Linn 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 1263-1286
- Rutberg B (1997) *Mol Microbiol* **23**: 413-421
- Landick R, Turnbough CL Jr (1992) W: McKnight SL,

- Yamamoto KR (red) Transcriptional regulation, CSH Lab, Cold Spring Harbor, NY
8. Landick R, Yanofsky C (1987) W: Neidhardt NC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (red) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Am Soc Microbiol, Washington DC, str 1276-1301
 9. Wolska KI (1991) *Postępy Mikrobiol* **30**: 243-268
 10. Artz S W, Holzschu D (1983) W: Herrmann KM, Somerville RL (red) Amino Acids, Biosynthesis and Genetic Regulation, Addison Wesley Publishing Co, Reading, Mass, str 379-404
 11. Frieden P, Newman T, Freundlich M (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6156-6160
 12. Hudson G, Davidson B (1984) *J Mol Biol* **180**: 1023-1051
 13. Lawther R, Hatfield G (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1862-1866
 14. Lynn S, Gardner J, Reznikoff W (1987) *J Mol Biol* **183**: 4363-371
 15. Wessler S, Calvo J (1984) *Mol Biol Evol* **1**: 143-161
 16. Yanofsky C (1984) *Mol Biol Evol* **1**: 143-161
 17. Springer M, Trundel M, Plumbridge J, Fayat M, Mayaux J-F, Sacredot C, Blanquet S, Grunberg-Manago M (1983) *J Mol Biol* **171**: 263-279
 18. Springer M, Mayaux J-F, Fayat M, Graffe S, Blanquet M, Grunberg-Manago M (1985) *J Mol Biol* **185**: 467-478
 19. Bonekamp F, Clemmensen K, Karlström O, Jensen KF (1984) *EMBO J* **3**: 2857-2861
 20. Turnbough CL Jr, Hicks KL, Donahue JP (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 368-372
 21. Grundström T, Normark S (1985) *Mol Gen Genet* **198**: 411-415
 22. Jaurin B, Grundström T, Edlund T, Normark SJ (1981) *Nature (Lond)* **290**: 221-225
 23. Gollnick P, Yanofsky C (1990) *J Bacteriol* **172**: 3100-3107
 24. Stewart VJ, Yanofsky C (1985) *J Bacteriol* **166**: 217-233
 25. Stewart VJ, Yanofsky C (1986) *J Bacteriol* **167**: 383-386
 26. Greenblatt J, Malnoe P, Li J (1980) *J Mol Biol* **255**: 1465-1470
 27. Greenblatt J (1973) *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 421-424
 28. Gottesman S, Gottesman M, Shaw JE, Pearson ML (1991) *Cell* **24**: 255-233
 29. Franklin NC (1985) *J Mol Biol* **181**: 75-84
 30. Lazinski D, Grządzińska E, Das A (1989) *Cell* **59**: 207-218
 31. Franklin NC (1993) *J Mol Biol* **231**: 343-361
 32. Friedman DI (1988) W: Calendar R (red) *The Bacteriophages*, vol II, Plenum Publ Corp, NY, str 263-391
 33. Herskowitz I, Hagen D (1980) *Annu Rev Genet* **14**: 399-445
 34. Roberts JW (1969) *Nature (Lond)* **224**: 1168-1174
 35. Robert JW (1988) *Cell* **25**: 5-6
 36. Adhya S, Gottesman M (1978) *Annu Rev Genet* **47**: 967-996
 37. Ghosh B, Grządzińska E, Bhattacharya P, Peralta E, DeVito J, Das A (1991) *J Mol Biol* **222**: 59-66
 38. deCrombrughe B, Mudryj M, DiLauro R, Gottesman M (1979) *Cell* **18**: 1145-1151
 39. Friedman DI, Wilgus GS, Mural RJ (1973) *J Mol Biol* **81**: 505-516
 40. Salstrom JS, Szybalski W (1978) *J Mol Biol* **124**: 195-221
 41. Rosenberg M, Court D, Shimatake H, Brady C, Wulff DL (1978) *Nature (Lond)* **272**: 414-423
 42. Barik S, Ghosh B, Whalen W, Lazinski D, Das A (1987) *Cell* **50**: 885-899
 43. Greenblatt J (1984) *Can J Biochem Cell Biol* **62**: 79-88
 44. Horwitz RJ, Li J, Greenblat J (1987) *Cell* **51**: 631-641
 45. Nodwell JR, Grennblat J (1991) *Genes Dev* **5**: 2144-2151
 46. Olson ER, Tomich CSC, Friedman DI (1981) *J Mol Biol* **180**: 1053-1063
 47. Patterson TA, Zhang Z, Baker T, Johanson IL, Friedman DI, Court D (1994) *J Mol Biol* **236**: 217-228
 48. Warren F, Das A (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3612-3616
 49. Whalen W, Das A (1990) *New Biol* **2**: 975-991
 50. Zuber M, Patterson TA, Court DL (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4515-4518
 51. Doeling JH, Franklin NC (1990) *Nucl Acids Res* **17**: 5565-5577
 52. Friedman DI, Olson ER (1983) *Cell* **34**: 143-149
 53. Olson ER, Flamm EL, Friedman DI (1982) *Cell* **31**: 61-70
 54. Chattopadhyay S, Garcia-Mena J, DeVito J, Wolska K, Das A (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4061-4065
 55. Das A, Pal M, Garcia-Mena J, Whalen W, Wolska K, Crossley R, Rees W, von Hippel P, Constantino N, Court D, Mazzua M, Altieri AS, Byrd RA, Chattopadhyay S, DeVito J, Ghosh B (1996) *Methods Enzymol* **274**: 374-402
 56. DeVito J, Das A (1992) *J Cell Biochem Suppl* **16E**: 177
 57. Friedman DI, Baron LS (1974) *Virology* **58**: 141-148
 58. Friedman DI, Baumann M, Baron LS (1976) *Virology*, **73**: 119-127
 59. Friedman DI, Sauer AT, Baumann MR, Baron LS, Adhya SI (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1115-1118
 60. Keppel F, Georgopoulos C, Eisen H (1974) *Biochimie* **56**: 1503-1509
 61. Das A, Wolska K (1984) *Cell* **38**: 165-173
 62. Das A, Ghosh B, Wolska K (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4070-4070
 63. Ghosh B, Das A (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6305-6309
 64. Goda Y, Greenblatt J (1985) *Nucl Acids Res* **13**: 25569-2582
 65. Swindle J, Żylicz M, Georgopoulos C, Li J, Greenblatt J (1988) *J Biol Chem* **263**: 10229-10235
 66. Burova E, Hung SC, Sagitov V, Stitt BL, Gottesman ME (1995) *J Bacteriol* **177**: 1388-1392
 67. Li J, Horwitz R, McCracken S, Greenblatt J (1992) *J Biol Chem* **267**: 6012-6019
 68. Sullivan SL, Ward DF, Gottesman ME (1992) *J Bacteriol* **174**: 1339-1344
 69. Greenblatt J, Li J (1981) *J Mol Biol* **147**: 11-23
 70. Greenblatt J, Li J (1981) *Cell* **24**: 412-428
 71. Mason S, Greenblatt J (1991) *Genes Dev* **5**: 1504-1512
 72. Mason S W, Li J, Greenblatt J (1992) *J Mol Biol* **223**: 55-66
 73. Nodwell JR, Greenblatt J (1993) *Cell* **72**: 261-268
 74. Mogridge J, Mah T-F, Greenblatt J (1995) *Genes Dev* **9**: 2831-2844
 75. DeVito J, Das A (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8660-8664
 76. Mason S W, L, J Greenblatt J (1992) *J Biol Chem* **267**: 19418-19426
 77. Whalen W, Ghosh B, Das A (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2494-2498
 - 77a. Wolska KI (1997) *Post. Biochem* **43**: 182-188
 78. Grayhack EJ, Roberts JW (1982) *Cell* **30**: 637-648
 79. Friedman DI, Gottesman M (1983) W: Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA (red) *Lambda II*, CSH Lab, Cold Spring Harbor, NY, str 21-51
 80. Forbes D, Herskowitz I (1982) *J Mol Biol* **160**: 549-569
 81. Kaizn M, Roberts J (1992) *Science* **255**: 838-841
 82. Somashekar G, Szybalski W (1983) *Gene* **26**: 291-294
 83. Yang X, Hart CM, Grayhack EJ, Roberts JW (1987) *Genes Dev* **1**: 217-226
 84. Yang X, Roberts JW (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5301-5305
 85. Yarnell WS, Roberts JW (1992) *Cell* **69**: 1181-1189
 86. Grayhack EJ, Yang X, Lau LF, Roberts W (1985) *Cell* **42**: 259-269
 87. Ring BZ, Roberts JW (1994) *Cell* **78**: 317-324
 88. Greenblatt J, Nodwell JR, Mason SW (1993) *Nature (Lond)* **361**: 401-406
 89. Yang X, Goliger JA, Roberts JW (1989) *J Mol Biol* **210**: 453-460
 90. Aksoy S, Squires CL, Squires C (1984) *J Bacteriol* **159**: 260-264
 91. Albrechtern B, Squires CL, Li S, Squires C (1990) *J Mol Biol* **213**: 123-134
 92. Holben WE, Morgan AR (1984) *Proc Natl Acad Sci USA*

- 81: 6789-6793
93. Berg K L, Squires C, Squires C L (1989) *J Mol Biol* **209**: 345-358
 94. Li S C, Squires C L, Squires C (1984) *Cell* **38**: 851-860
 95. Squires C L, Greenblatt J, Li J, Condon C, Squires C I (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 970-974
 96. Sharrock R A, Gourse R I, Nomura M (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5275-5279
 97. Li J, Mason S W, Greenblatt J (1993) *Genes Dev* **7**: 161-172
 98. Saier M H Jr (1994) *Res Microbiol* **145**: 349-355
 99. Schnetz K, Stülke J, Gertz S, Krüger S, Krug M, Hecker M, Rak B (1996) *J Bacteriol* **78**: 1971-1979
 100. Bramley H F, Kornberg H (1987) *J Gen Microbiol* **133**: 563-573
 101. Mahadevan S, Reynolds A E, Wright A (1987) *J Bacteriol* **169**: 2570-2578
 102. Schnetz K, Toloczky C, Rak B (1987) *J Bacteriol* **169**: 2579-2590
 103. Mahadevan S, Wright A (1987) *Cell* **50**: 485-494
 104. Schnetz K, Rak B (1988) *EMBO J* **7**: 3271-3277
 105. Amster-Choder O, Houman F, Wright A (1989) *Cell* **58**: 847-855
 106. Amster-Choder O, Wright A (1990) *Science* **249**: 540-542
 107. Schnetz K, Rak B (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5074-5078
 108. Amster-Choder O, Wright A (1993) *Science* **257**: 1395-1398
 109. Amster-Choder O, Wright A (1993) *J Cell Biochem* **51**: 83-90
 110. Houman F, Diaz-Torrez M R, Wright A (1990) *Cell* **62**: 1153-1163
 111. El Hassouni M, Henrissat B, Chippaux M, Barras F (1992) *J Bacteriol* **174**: 756-771
 112. Bardowski J, Ehrlich S D, Chopin A (1994) *J Bacteriol* **176**: 5681-5685
 113. Crutz A-M, Steinmetz M, Aymerich S, Richter R, Le Coq D (1990) *J Bacteriol* **172**: 1043-1050
 114. Débarbouillé M, Arnaud M, Fouet A, Klier A, Rapoport G (1990) *J Bacteriol* **172**: 3966-3973
 115. Fouet A, Arnaud M, Klier A, Rapoport G (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 877-8777
 116. Steinmetz M, Le Coq D, Aymerich S, Gonzy-Tréboul G, Gay P (1985) *Mol Gen Genet* **200**: 220-228
 117. Shimotsu H, Henner D J (1986) *J Bacteriol* **168**: 380-388
 118. Tortosa P, Le Coq D (1995) *Microbiology* **141**: 2921-2927
 119. Arnaud M, Vary P, Zagrodec M, Klier A, Débarbouillé M, Postma P, Rapoport G (1992) *J Bacteriol* **174**: 3161-3170
 120. Aymerich S, Steinmetz M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10410-10414
 121. Steinmetz M, Le Coq D, Aymerich S (1989) *J Bacteriol* **171**: 1519-1523
 122. Arnoud M, Vary P, Zagorec M, Klier A, Débarbouillé M, Postma P, Rapoport G (1992) *J Bacteriol* **174**: 3161-3170
 123. Le Coq D, Linder C, Krüger S, Steinmetz M, Stülke J (1995) *J Bacteriol* **177**: 1527-1535
 124. Krüger S, Hecker M (1995) *J Bacteriol* **177**: 5590-5597
 125. Beijer L, Nilsson R P, Holmberg C, Rutberg L (1993) *J Gen Microbiol* **139**: 349-359
 126. Nilsson R-P, Beijer L, Rutberg B (1994) *Microbiology* **140**: 723-730
 127. Lindberg V, Rutberg L (1974) *J Bacteriol* **119**: 431-442
 128. Holmberg C, Rutberg B (1991) *Mol Microbiol* **5**: 2891-2900
 129. Holmberg C, Rutberg L (1992) *Mol Microbiol* **6**: 2931-2938
 130. Glatz E, Nilsson R-P, Rutberg L, Rutberg B (1996) *Mol Microbiol* **19**: 319-328
 131. Kimhi Y, Magasanik B (1970) *J Biol Chem* **245**: 3545-3548
 132. Oda M, Sugishita A, Furukawa K (1988) *J Bacteriol* **170**: 3199-3205
 133. Wray L Jr, Fisher S (1994) *J Bacteriol* **176**: 5466-5473
 134. Drew R E, Lowe N (1989) *J Gen Microbiol* **135**: 817-823
 135. Wilson S A, Wachira S J, Drew R E, Jones D, Pearl L H (1993) *EMBO J* **12**: 3637-3642
 136. Wilson S A, Drew R E (1995) *J Bacteriol* **177**: 3052-3057
 137. Wilson S A, Wachira S J M, Norman R A, Pearl L H, Drew R E (1996) *EMBO J* **15**: 5907-5916
 138. Lin J T, Goldman B S, Stewart V (1993) *J Bacteriol* **175**: 2370-2378
 139. Lin J T, Goldman B S, Stewart V (1994) *J Bacteriol* **176**: 2551-2559
 140. Goldman B S, Lin J T, Stewart V (1994) *J Bacteriol* **176**: 5077-5085
 141. Lin J T, Stewart V (1996) *J Mol Biol* **256**: 423-435
 142. Henkin T M (1994) *Mol Microbiol* **13**: 381-387
 143. Grunberg-Manago M (1996) W: Neidhardt N C, Curtiss III R, Ingraham J L, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Rezikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E (red) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Am Soc Microbiol, Washington DC, str 1432-1457
 144. Grundy E J, Henkin T M (1993) *Cell* **74**: 475-482
 145. Grundy E J, Henkin T M (1994) *J Mol Biol* **235**: 798-804
 146. Grundy F J, Rollins S M, Henkin T M (1994) *J Bacteriol* **176**: 4518-4526
 147. Henkin T M, Glass B I, Grundy F J (1992) *J Bacteriol* **174**: 1299-1306
 148. Grandoni J A, Zahler S A, Calvo J M (1992) *J Bacteriol* **174**: 3212-3219
 149. Putzer H, Gendron N, Grunberg-Manago M (1992) *EMBO J* **11**: 3117-3127

Errata

W zeszycie nr 4 roku 1997 Postępów Biochemii (str. 289, łam prawy, wiersze 30 i 31 od góry jest: 20 mM przy pH 7 [43], 100 mM przy pH 8 i 160 mM przy pH 9,5 [5] ma być: 20 μM przy pH 7 [43], 100 μM przy pH 8 i 160 μM przy pH 9,5 [5]. Za niedopatrzenie błędów w maszynopisie autorka uprzejmie Czytelników przeprasza.

Kontrolowana ekspresja egzogennych genów w komórkach ssaków

Controlled expression of exogenous genes in mammalian cells

JACEK JAWORSKI*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Represory, transaktywatory i sekwencje operatorowe *tetO*
 - II-1 Transaktywator tetracyklinowy
 - II-2 Odwrotny transaktywator tetracyklinowy
 - II-3 tTA, rtTA i zwierzęta transgeniczne
 - II-4 Warianty systemu tetracyklinowego
- III. Nowe spojrzenie na hormony sterydowe
 - III-1 Ekdyzon
 - III-2 RU486
- IV. Chemiczne induktory dimeryzacji
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AP-1 (ang. *activator protein 1*) — białko aktywatorowe 1; CAT — acetylotransferaza chloramfenikolu; CID (ang. *chemical inducer of dimerization*) — chemiczny induktor dimeryzacji; CMVE1 — promotor wczesny cytomegalowirusa; EcR — receptor ekdyzonu; ERE (ang. *estrogen responsive element*) — sekwencja wiążąca receptor estrogenu; GAL4 — czynnik transkrypcyjny GAL4 z *S. cerevisiae*; GRE (ang. *glucocorticoid responsive element*) — sekwencja wiążąca receptor glukokortykoidu; HSV — wirus opryszczki; IL-2 — interleukina 2; IRES (ang. *ribosome internal entry site*); LexA — białko LexA *E. coli*; MMTV — wirus mysiej białaczki Maloneya; rtTA — odwrotny transaktywator tetracyklinowy; RXR — receptor retinoidu X; Spl — czynnik transkrypcyjny Spl; tetO — sekwencja operatorowa operonu tetracyklinowego; tetR — receptor tetracykliny *E. coli*; Tn10 — transpozon 10 *E. coli*; tTA — transaktywator tetracyklinowy; USP — produkt genu ultraspiracle.

I. Wstęp

Wprowadzenie do komórek genów kodujących białka prawidłowe lub zmutowane jest szeroko wykorzystywane w ciągu ostatnich dwudziestu lat zarówno w badaniach podstawowych, jak i stosowanych biologii molekularnej. Bardzo często ważne jest, aby ich ekspresję można było regulować tak czasowo jak i przestrzennie. O ile w przypadku prostych organizmów, takich jak bakterie [1], czy drożdże [2], udało się znaleźć zadowalające rozwiązania, o tyle w przypadku komórek ssaczy wciąż trwają poszukiwania właściwego systemu. Próbowano kontrolować ekspresję

Contents:

- I. Introduction
- II. Repressors, transactivators, *tetO* regulatory sequence
 - II-1 Tetracycline transactivator
 - II-2 Reverse tetracycline transactivator
 - II-3 tTA and rtTA transgenic animals
- III. New look at steroids
 - III-1 Ecdysone
 - III-2 RU486
- IV. Chemical inducers of dimerization
- V. Concluding remarks

wprowadzonych genów przy użyciu szoku cieplnego, steroidów lub metali ciężkich [3]. Niestety wszystkie wymienione metody miały trzy istotne wady:

- efekty toksyczne wywoływane przez induktor,
- plejotropowe efekty induktora wywołwane w komórce, wynikające z aktywacji, również innych genów niż wprowadzony,
- wysoki poziom ekspresji badanego genu w warunkach braku indukcji (poziom podstawowy).

Wydaje się, że ostatnio znaleziono rozwiązania, które są bardziej satysfakcjonujące i co ważniejsze sprawdziły się tak *in vitro*, jak i *in vivo* [45]. Są to systemy oparte o: 1) elementy regulatorowe pochodzące z operonów organizmów prokariotycznych: tetracyklinowego i laktozowego z *E. coli*; 2) hormony sterydowe owadów — (ekdyzon); 3) syntetyczne substancje chemiczne. Charakteryzują się one brakiem wpływu na organizmy ssaków, niską podstawową ekspresją badanego genu, wysokim poziomem indukcji. Stwarzają one możliwości włączania i wyłączania ekspresji oraz utrzymywania jej na ściśle zdefiniowanym poziomie. Intencją tego artykułu jest przedstawienie najnowszych rozwiązań, pozwalających na ścisłą kontrolę ekspresji genów wprowadzonych do komórek ssaków.

II. Represory, transaktywatory i sekwencje operatorowe *tetO*

Specyficzną cechą ekspresji genów u bakterii jest organizacja genów w operony. Są to jednostki transkrypcji, w których zebrane są geny kodujące białka zaangażowane w reakcje danego szlaku metabolicz-

*Mgr, Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

nego. Znajdują się one pod kontrolą wspólnego regionu regulatorowego i dają w wyniku transkrypcji policistronowe RNA. Wspomniany region regulacyjny pełni rolę włącznika lub wyłącznika, do którego przyłączają się produkty genów regulatorowych. W komórkach są one produkowane niezależnie od ekspresji regulowanych przez siebie operonów, a ich zdolność wiązania się z sekwencją regulatorową jest najczęściej związana z obecnością niskocząsteczkowego efektora. Jako przykład można podać operon tetracyklinowy bakterii *E. coli*. W jego skład wchodzi geny znajdujące się na transpozonie *Tn10*, warunkujące oporność bakterii na tetracyklinę. W warunkach braku tego antybiotyku w środowisku represor operonu (*tetR*) wiąże się z sekwencją regulatorową (*tetO*) uniemożliwiając transkrypcję genów operonu. Natomiast w obecności tetracykliny następuje jej wiązanie do białka *tetR*. Kompleks represora i antybiotyku nie może przyłączyć się do sekwencji regulatorowej, co umożliwia ekspresję genów związanych z opornością na tetracyklinę (Ryc. 1) [6].

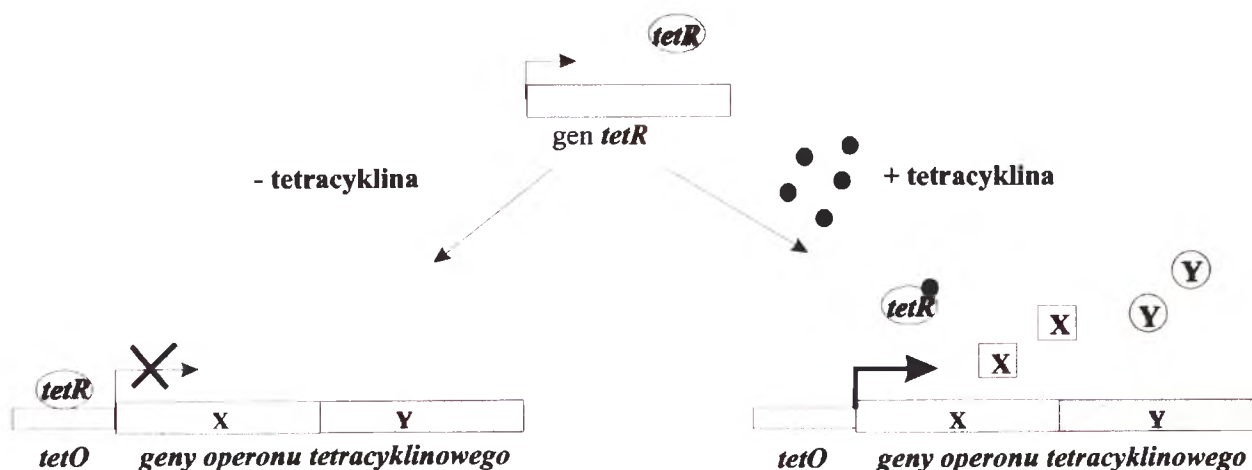
II-1. Transaktywator tetracyklinowy

Początkowo do kontroli transkrypcji genów wprowadzonych do komórek ssaków wykorzystywano elementy operonu laktozowego *E. coli* [7-10]. Równocześnie pokazano, że przy użyciu analogicznych elementów operonu tetracyklinowego można kontrolować ekspresję genów w komórkach roślin [11]. Opierając się o te dwa fakty Bujard i w.s.p. [6] skonstruowali białko fuzyjne będące czynnikiem transkrypcyjnym zależnym od obecności tetracykliny, tzw. transaktywator tetracyklinowy (tTA). Składało się ono z represora operonu tetracykliny i z C-terminalnej domeny białka VP16 pochodzącego z wirusa opryszczki (*Herpes simplex*, HSV). Białko VP16 jest znanym aktywatorem transkrypcji genów wirusowych podczas infekcji. Gen kodujący tTA umieszczono pod kontrolą wczesnego promotora cytomegalowirusa (tzw.

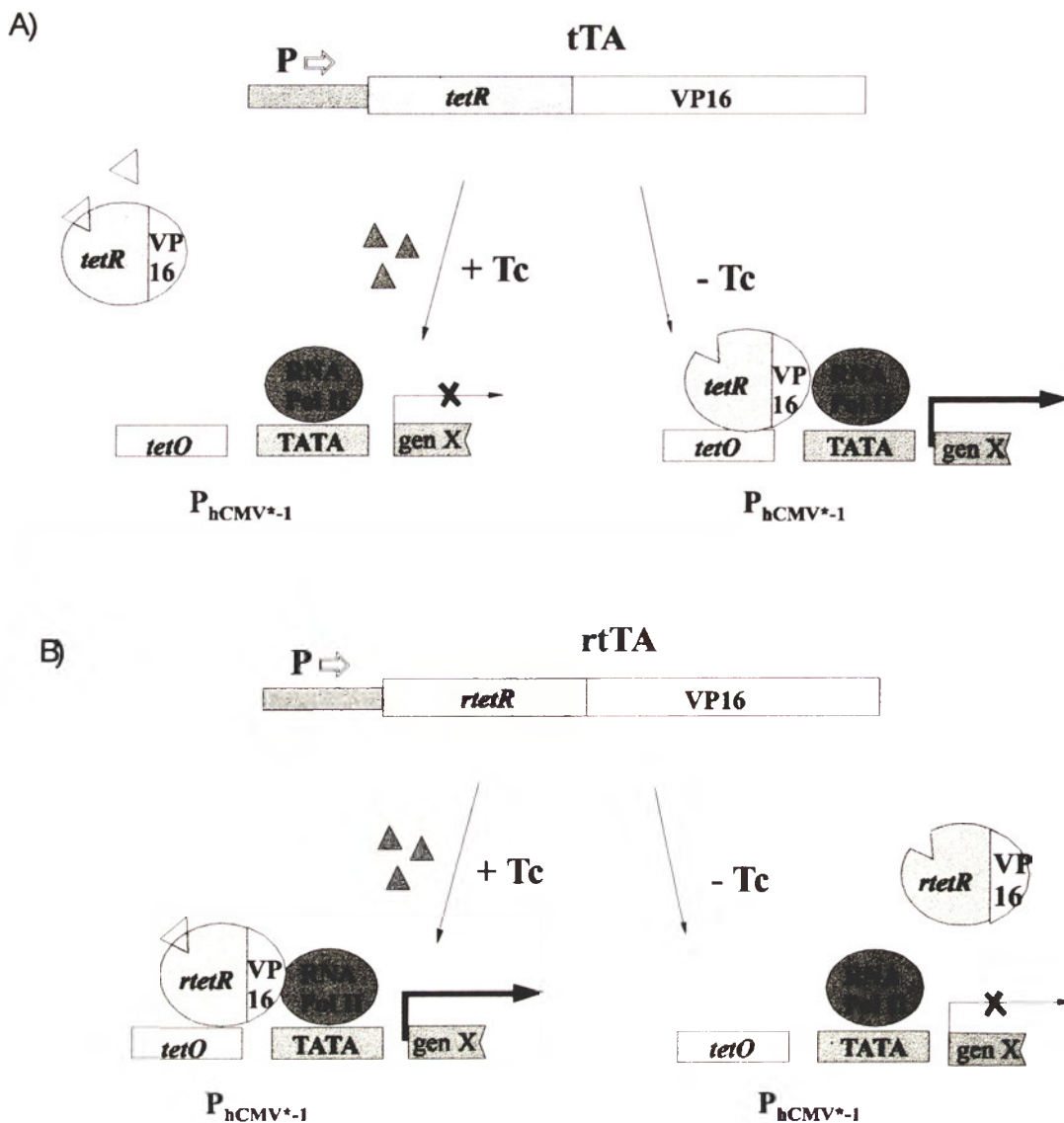
CMVE1). Jednocześnie skonstruowano drugi wektor, w którym sekwencja genu reporterowego (lucyferazy) była poprzedzona sekwencjami: TATA z promotora CMVE1 (promotor minimalny) i operatorową *tetO* (doświadczalnie ustalono, że najwydajniejszą ekspresję uzyskiwano umieszczając siedem takich sekwencji regulatorowych) — tzw. promotor $P_{hCMV^{*}-1}$. Właściwości tak skonstruowanego układu sprawdzano w komórkach HeLa, które transfekowano DNA kodującym transaktywator tetracyklinowy (tTA) i plazmidem z sekwencją genu kodującego lucyferazę pod kontrolą promotora $P_{hCMV^{*}-1}$. Gdy hodowano transfekowane komórki w obecności tetracykliny, stwierdzano bardzo niską aktywność lucyferazy. Przeniesienie hodowli na podłoże nie zawierające antybiotyku, powodowało znaczny wzrost aktywności lucyferazy. Schemat działania transaktywatora tetracyklinowego przedstawia rycina 2A. Maksymalna indukcja transkrypcji rzędu 10^5 była osiągana po ok. 24 godzinach od usunięcia tetracykliny. Ponowne dodanie do hodowli tetracykliny powodowało spadek aktywności lucyferazy do poziomu podstawowego w czasie ok. 12 godzin.

II-2. Odwrotny transaktywator tetracyklinowy

W 1996 r. Gossen i Bujard [12] skonstruowali białko fuzyjne o właściwościach przeciwnych do oryginalnego tTA. Tzw. odwrotny transaktywator (rtTA) ma zmienione cztery aminokwasy w części pochodzącej z *tetR* i aktywuje transkrypcję w obecności antybiotyku. Schemat działania odwrotnego transaktywatora przedstawiono na rycinie 2B. W porównaniu z tTA wykazuje on niższy poziom indukcji aktywności lucyferazy w hodowlach komórkowych, bo tylko 1000-krotny po 24 godzinach. Ważnym elementem tego układu jest rodzaj stosowanego analogu tetracykliny. Przetestowano pięć różnych związków: tetracyklinę, oksytetracyklinę, chlorotetracyklinę, anhydrotetracyklinę oraz doksycyklinę. Maksymalną indukcję otrzymano podając dwa ostatnie. Pozostałe związki były



Ryc. 1. Schemat działania operonu tetracyklinowego *E. coli*. Produkt genu *tetR* jest produkowany stale. Gdy w środowisku brak tetracykliny, łączy się on z sekwencją *tetO*, umożliwiając transkrypcję genów operonu. Gdy tetracyklina jest obecna wiąże się ona z białkiem *tetR*. Taki kompleks nie może przyłączyć się do sekwencji *tetO*, co umożliwia zajście transkrypcji genów warunkujących oporność bakterii na tetracyklinę. X, Y — schematyczne oznaczenie genów operonu.



Ryc. 2. Schemat systemu tetracyklinowego wykorzystującego A) transaktywator i B) odwrotny transaktywator. Objaśnienia w tekście: tTA — transaktywator tetracyklinowy; rtTA — odwrotny transaktywator tetracyklinowy; TC — tetracyklina; P — promotor konstytuowany; tetO — sekwencja operatorowa operonu tetracyklinowego; TATA — sekwencja TATA.

dużo słabszymi induktorami. Dodatkową zaletą doksylicyny jest fakt, iż będąc silniejszym induktorem ma mniejsze niż tetracyklina toksyczne działanie na organizmy ssaków.

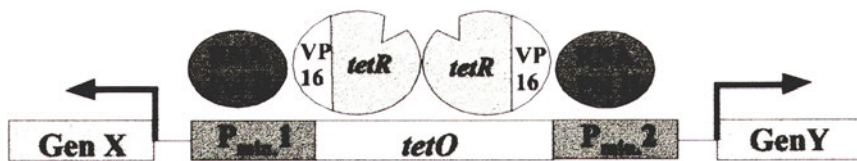
II-3. tTA, rtTA i zwierzęta transgeniczne

System tetracyklinowy poddano także badaniom w układach *in vivo*. Zespół Bujarda wprowadził linię myszy transgenicznych, u której ekspresja badanego genu była zależna od transaktywatora tetracyklinowego [13]. Do jednej linii myszy wprowadzono gen kodujący transaktywator, do drugiej zaś gen kodujący lucyferazę umieszczony pod kontrolą minimalnego promotora P_{hCMV^*-1} . Myszy takie krzyżowano ze sobą otrzymując podwójnie transgeniczną linię posiadającą obie sekwencje. Wykazano, że aktywność lucyferazy w poszczególnych tkankach była bardzo niska jeśli transgeniczne myszy miały podawaną doksylicynę, zaś ulegała indukcji gdy antybiotyk nie był obecny w ciele zwierząt. Poziom podstawowy ekspresji

genu reporterowego i stopień indukcji były zróżnicowane w zależności od rodzaju tkanki. Największą indukcję uzyskano w komórkach skóry, mięśni uda, języka (ponad 100-razy). Nie stwierdzono aktywacji w wątrobie.

W następnej pracy Bujarda i w s.p. [14] wykorzystali nowo wprowadzone linie podwójnie transgenicznych myszy, o dużo niższym podstawowym poziomie ekspresji genu reporterowego (lucyferazy). Jako induktor zastosowano doksylicynę. Maksymalną indukcję aktywności lucyferazy uzyskano w komórkach trzustki (ok. 10 000 razy) a nieco niższą w nerkach i żołądku. Nie stwierdzono ekspresji w wątrobie, płucach i limfocytach, czego powodem było zapewne to, że nie działa w nich promotor CMVE1 i poprzedzający sekwencję kodującą tTA. Ci sami badacze uzyskali ekspresję w komórkach wątroby gdy zamieniono powyższy promotor na tkankowo specyficzny [14].

Czas potrzebny do aktywacji i inaktywacji ekspresji transgenów w układzie tetracyklinowym badano w dość nietypowym doświadczeniu, wykorzystującym



Ryc. 3. Schemat użycia wspólnego regionu regulatorowego *tetO* do jednoczesnej regulacji ekspresji dwóch różnych genów; *tetR*-VP16 — transaktywator tetracyklinowy; RNA Pol II — RNA polimeraza II; P_{min1} i P_{min2} — promotory minimalne; geny X i Y — geny, których ekspresja jest kontrolowana przez region *tetO*.

fakt, że mięśnie szkieletowe mogą być transfekowane przez bezpośrednie wstrzyknięcie do nich DNA (tzw. „nagiego” DNA, gdyż nie używa się w tym celu żadnego rodzaju nośnika np. liposomów lub wektorów wirusowych). Wektory zawierające sekwencje DNA kodujące: transaktywator i gen lucyferazy pod kontrolą promotora $P_{hCMV^{*}-1}$, wstrzyknięto do mięśni szkieletowych myszy [15]. Tetracyklinę podawano im w wodzie pitnej albo dootrzewnowo. Pokazano, że sześć godzin po usunięciu antybiotyku z wody podawanej zwierzętom do picia, można było wykryć aktywność lucyferazy, a maksymalny jej poziom był osiągnięty po 7 dniach.

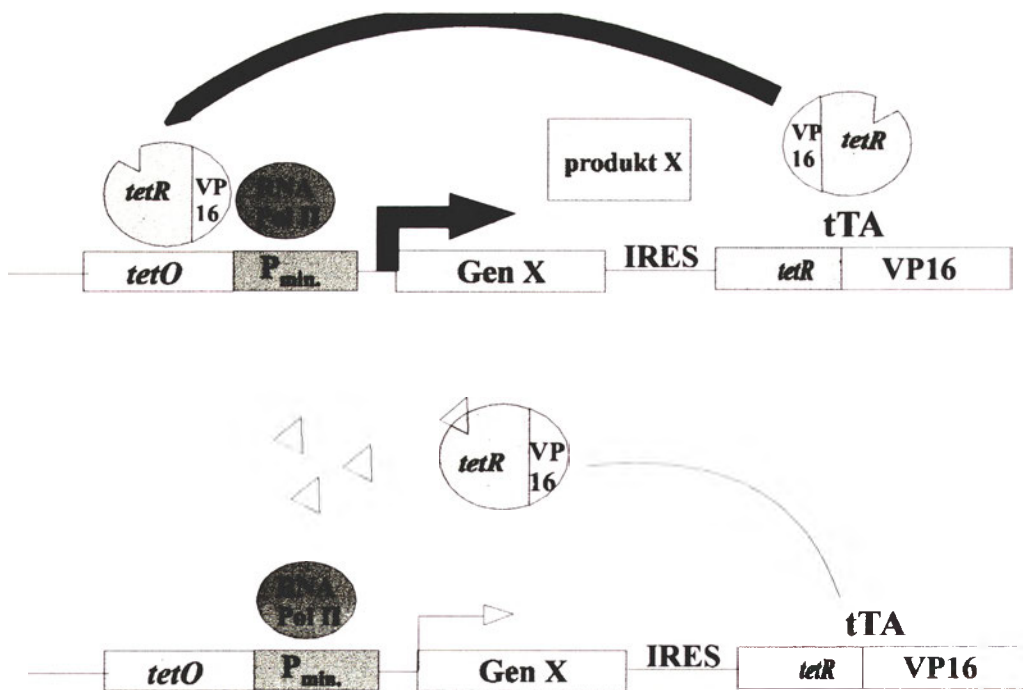
Bujard i wsp. [14] uzyskali również myszy transgeniczne produkujące odwrotny transaktywator. Zasada konstrukcji podwójnie transgenicznych mysich szczepów była podobna, do omówionej wcześniej, z tą jednak różnicą, że jedna z linii posiadała sekwencję kodującą rtTA zintegrowaną z genomem. Po podaniu doksycykliny, u podwójnie transgenicznych osobników (zawierających też gen reporterowy) obserwowano indukcję aktywności lucyferazy już po 4 godzinach, zaś maksymalną po 24. Najwyższą indukcję (około 10000 razy) stwierdzono w komórkach trzustki. Eks-

presji nie stwierdzono w wątrobie, płucach, mózgu i limfocytach.

II-4. Warianty systemu tetracyklinowego

Istnieje wiele wariantów wykorzystujących do aktywacji transkrypcji tTA. Jednym z ciekawszych pomysłów jest wykorzystanie wspólnego regionu regulatorowego (*tetO*)₇ dla dwóch różnych genów znajdujących się pod kontrolą minimalnych promotorów po przeciwległych stronach sekwencji operatorowej (Ryc. 3) [16]. Umożliwia to np. równoczesną kontrolę ekspresji genów: badanego i markerowego lub dwóch różnych podjednostek w przypadku białek złożonych.

Innym, ciekawym pomysłem jest układ samoregulujący, w którym gen kodujący transaktywator zajmuje się kontrolą promotora $P_{hCMV^{*}-1}$ [17, 18]. Pozwala to na uzyskanie większej ilości transaktywatora niż w układach stale go produkujących. Uważa się bowiem, że niskie stężenie tTA w komórkach jest najprawdopodobniej związane z toksycznym wpływem C-terminalnej domeny białka VP16 [19]. Dlatego też, przy ciągłej produkcji tTA przeżywają tylko te komórki lub zwierzęta transgeniczne, które nie osiągają



Ryc. 4. Schemat działania układu tetracyklinowego w wariantcie autoregulacyjnym. Gen kodujący transaktywator tetracyklinowy znajduje się pod kontrolą promotora, na który oddziałuje. W przypadku braku tetracykliny — rys. górny — zachodzi wysoka ekspresja obu kontrolowanych genów. W obecności tetracykliny — rys. dolny — następuje znaczne obniżenie poziomu ekspresji; *tetR*-VP16 — transaktywator tetracyklinowy; *tetO* — sekwencja operatorowa operonu tetracyklinowego; P_{min} — promotor minimalny; IRES — sekwencja umożliwiająca przyłączenie rybosomów; RNA Pol III — RNA polimeraza III.

krytycznego stężenia transaktywatora. Autoregulacja pozwala na uzyskanie większych ilości transaktywatora w momencie indukcji.

Kolejnym pomysłem jest użycie pojedynczego wektora retrowirusowego. Wykorzystany jest tu element zwany IRES (ang. *internal ribosome entry site*) wstawiony pomiędzy gen reporterowy znajdujący się pod kontrolą promotora $P_{hCMV^{*}-1}$ i genem kodującym transaktywator tetracyklinowy (Ryc. 4) [18]. Zakłada się, że podobnie jak w poprzednio opisanym autoregulowanym systemie, występowanie pewnego podstawowego poziomu transkrypcji i powstanie tTA. Po podaniu tetracykliny następuje indukcja ekspresji, w wyniku której powstaje dużo większa ilość tego policistronowego transkryptu. Efektem jego translacji są: białka genu reporterowego i tTA.

System tetracyklinowy jest obecnie często wykorzystywany. Zaczął być używany do badania udziału konkretnych białek w procesach komórkowych tak w hodowli jak i z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych. System ten znalazł zastosowanie w badaniu procesu onkogenezy [20-22], plastyczności komórek układu nerwowego [23], czy cyklu komórkowego [24].

III. Nowe spojrzenie na hormony sterydowe

Mimo, podkreślanych we wstępie, wad hormonów sterydowych używanych jako induktorów ekspresji, wciąż nie słabnie zainteresowanie ich wykorzystaniem. Przyczyną są ich zalety takie jak: zdolność przenikania przez błony biologiczne bez pośrednictwa skomplikowanego systemu przekazywania sygnału od błony do jądra komórkowego oraz szybkość działania. Wynika to z mechanizmu w jaki działają hormony sterydowe. Wnikają one do cytoplazmy gdzie łączą się ze swoimi receptorami będącymi zarazem czynnikami transkrypcyjnymi zależnymi od liganda. Związany z hormonem receptor ma zdolność wniknięcia do jądra komórkowego i aktywacji transkrypcji tych genów, które posiadają sekwencje rozpoznawcze przez dany aktywator. Podstawową wadą sterydów jako induktorów był fakt ich powszechnego występowania oraz wszechstronnego wpływu jaki mają na komórki wyższych kręgowców. Znalaziono jednakże dwa rozwiązania:

1. użycie hormonów i ich receptorów, które nie oddziałują na komórkę, do której wprowadzamy interesujący nas gen (np. owadzi hormon sterydowy — ekdyzon).

2. zmodyfikowanie występujących naturalnie receptorów tak aby były rozpoznawane tylko i wyłącznie przez syntetyczne pochodne hormonów sterydowych mające nikły wpływ na komórki ssaków.

III-1. Ekdyzon

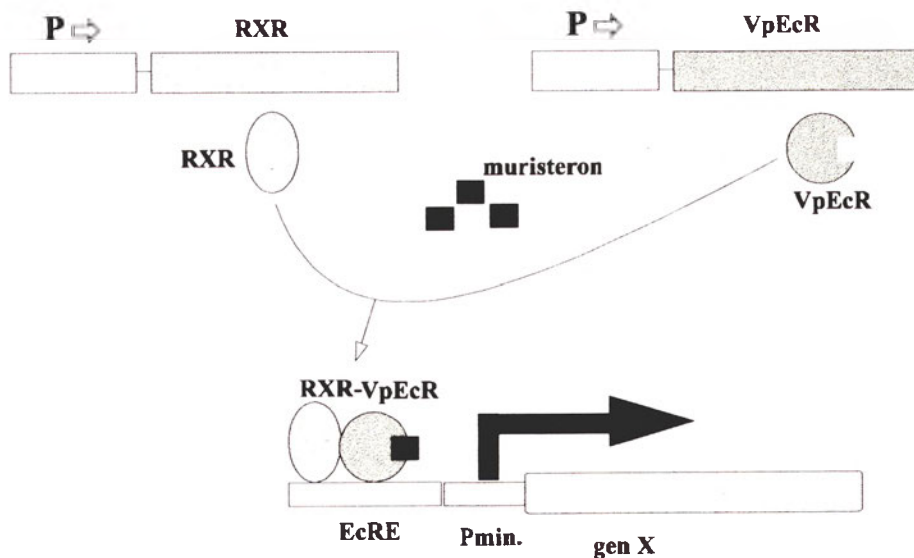
Ekdyzon jest typowym hormonem sterydowym,

występującym powszechnie u owadów. Jest on zaangażowany w proces ich metamorfozy. Po wniknięciu do cytoplazmy łączy się ze swoim receptorem (EcR) będącym czynnikiem transkrypcyjnym. Ten ostatni wiąże się z sekwencją EcRE (ang. *ecdysone responsive element*) jako heterodimer w parze z produktem genu USP [25]. Z punktu widzenia dalszych rozważań warto zaznaczyć, że białko USP jest homologiem receptora X retinoidu (RXR), który jest składnikiem heterodimerów receptorów hormonów sterydowych w komórkach wyższych kręgowców [26].

Pierwsze próby z użyciem ekdyzonu do kontroli ekspresji genów w komórkach ssaczy udowodniły funkcjonalność tego systemu. Christopherson i w s p. [27] badali aktywację ekspresji genu reporterowego — acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT), znajdującego się pod kontrolą promotora wirusa mysiej białaczki Moloneya (MMTV) poprzedzonego czterokrotnym powtórzeniem sekwencji wiążącej receptor ekdyzonu. Gen ten został wprowadzony do komórek linii 293 równocześnie z plazmidem warunkującym produkcję EcR. Testowano wpływ różnych pochodnych ekdyzonu na poziom aktywacji ekspresji genu CAT. Stwierdzono, że w komórkach ssaków tylko ponasteron A oraz muristeron A wiążą się z EcR w sposób umożliwiający indukcję transkrypcji genu reporterowego. Jednocześnie stwierdzono, że obie substancje nie aktywują ekspresji genu reporterowego jeśli sekwencja promotorowa jest poprzedzona przez element rozpoznawany przez receptor glukokortykoidu (GRE) lub estrogenu (ERE). W dalszych eksperymentach wykluczono aktywację genu CAT poprzedzonego sekwencjami EcRE przez występujące najczęściej u ssaków hormony sterydowe. Robertson i w s p. [27] dowiedli, że poprzez zmianę domeny aktywującej transkrypcję z oryginalnej dla receptora ekdyzonu na VP 16 można zwiększyć poziom produkcji CAT dziesięciokrotnie.

Stwierdzono również, iż wymiana sekwencji wiążącej DNA na pochodzącą z bakteryjnego białka LexA, oraz jednoczesne wprowadzenie do komórek genu reporterowego, którego promotor poprzedzony był przez sekwencję rozpoznawaną przez LexA, nie zmienia zdolności regulacji takiego układu przez ekdyzon. Daje to możliwość stworzenia całej rodziny transaktywatorów regulowanych przez ekdyzon, a rozpoznających różne sekwencje w DNA.

Ekdyzon jako aktywator ekspresji genów wprowadzających do komórek ssaczy zastosowali No i w s p. [25]. Użyto w tym celu systemu składającego się z trzech elementów (patrz Ryc. 5), które muszą zostać wprowadzone do komórki. Pierwszym z nich jest gen kodujący zmodyfikowany receptor ekdyzonu. Drugim, gen warunkujący ekspresję wspomnianego wcześniej homologu białka USP czyli RXR. Trzecim zaś interesujący nas gen, znajdujący się pod kontrolą minimalnego promotora poprzedzonego, przez sekwencję rozpoznawaną przez powstający heterodimer.



Ryc. 5. Schemat systemu wykorzystującego do kontroli ekspresji genów wprowadzonych do komórek ssaków pochodne ekdyzonu (muristeron); w obecności muristeronu zachodzi aktywacja transkrypcji genu X; RXR — receptor retinoidu X; VpEcR — zmodyfikowany receptor ekdyzonu (objaśnienia w tekście); P — dowolny promotor; Pmin — promotor minimalny; EcRE — sekwencja rozpoznawana przez VpEcR.

W pierwszych eksperymentach wykorzystywano niezmodyfikowany EcR oraz USP. Po dodaniu muristeronu A otrzymano 3-krotną indukcję ekspresji β -galaktozydazy. W celu zwiększenia poziomu indukcji wprowadzono liczne zmiany. Wymieniono domenę aktywującą transkrypcję na C-terminalną część VP 16. Następnie zamieniono gen kodujący USP na RXR. Do obszaru regulatorowego poprzedzającego gen reporterowy dodano sekwencje wiążące czynnik transkrypcyjny Sp1. Ostatecznie, podwyższono indukcję po podaniu muristeronu A, z 3 razy do 20 tysięcy. Dodatkową zmianą zapobiegającą wiązaniu się do EcRE innych czynników transkrypcyjnych było zmienienie tej sekwencji tak, by była ona rozpoznawana tylko przez domenę wiążącą DNA pochodzącą z receptora ekdyzonu zawierającą trzy zmutowane aminokwasy. Ustalono, że w linii komórkowej (CV-1), do której wprowadzono te trzy elementy, 100-krotna indukcja osiągnięta jest po 3 godzinach, 1000-krotna po 8 godzinach, natomiast maksymalna 20 000-krotna po 20 godzinach od podania hormonu do pożywki.

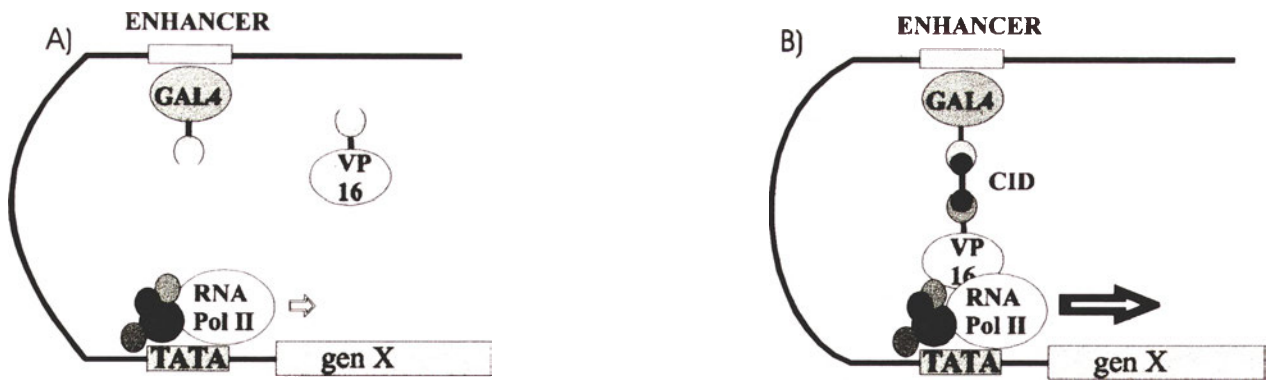
System ten testowano także *in vivo*. Wyprowadzono dwie linie zwierząt transgeniczných. Pierwsza z nich niosła transgeny kodujące *trán* aktywator oraz RXR pod kontrolą promotora specyficznego dla limfocytów T. Druga zawierała gen reporterowy pod kontrolą opisanych powyżej sekwencji regulatorowych. Zwierzęta pochodzące z obu linii skrzyżowano ze sobą uzyskując osobniki podwójnie transgeniczne, u których zachodziła aktywacja badanego genu zależna od podania muristeronu jak i specyficzna tkankowo.

System ten ma jednak swoje wady. Nadekspresja białka RXR prawdopodobnie nie pozostaje bez wpływu na część procesów komórkowych. Warto wspomnieć tylko fakt hamującego wpływu RXR na działanie tak powszechnego czynnika transkrypcyjnego jakim jest AP-1 [28]. Postulowane zaangażowanie AP-1

w procesy np. uczenia się, powstawania pamięci czy apoptozy powoduje, że do wyników otrzymanych przy użyciu powyższego systemu, a dotyczących tych właśnie procesów, trzeba będzie podchodzić ze szczególną ostrożnością.

III-2. RU486

RU486 jest antagonistą progesteronu. Stanowi on bardzo dobry i ciekawy przykład wykorzystania nietypowych hormonów sterydowych jako induktorów transkrypcji genów wprowadzonych do komórek ssaczych. Wykorzystano fakt, że mutant ludzkiego receptora progesteronu — hPRB891 — nie posiada zdolności wiązania progesteronu ani innych endogennych hormonów [29]. Jednak to pozbawione 42 aminokwasów w C-końcowej domenie białko jest w stanie wiązać właśnie RU486. Co dziwniejsze, mimo tego, iż RU486 jest antagonistą progesteronu to zmutowany receptor związany z tym ligandem ma zdolność aktywowania transkrypcji genów posiadających sekwencję, z którą może się wiązać. Wykorzystując domenową strukturę receptorów sterydowych, O'Malley i wsp. [30] skonstruowali białko o charakterze transaktywatora, zdolnego do aktywacji ekspresji genów po przyłączeniu RU486. Oprócz domeny wiążącej ligand w skład białka wchodził fragment drożdżowego czynnika transkrypcyjnego GAL4 (zawierający domeny odpowiedzialne za wiązanie się do DNA, dimeryzację oraz lokalizację jądrową), oraz domena aktywująca transkrypcję białka VP16. Dodatkowo skonstruowano plazmid złożony z genu reporterowego CAT poprzedzonego sekwencją TATA pochodzącą z promotora genu E1B adenowirusa oraz cztery powtórzenia sekwencji, do której wiąże się GAL4. DNA obu plazmidów wprowadzono jednocześnie do komórek CV-1 w hodowli *in vitro*. W efekcie podania do podłoża



Ryc. 6. Schemat wykorzystania syntetycznych ligandów dimerizacji (CID) do kontroli ekspresji genów wprowadzonych do komórki; A) niski poziom transkrypcji genu X gdy brak CID B) wydajna transkrypcja genu X po podaniu CID. Następuje połączenie domeny wiążącej DNA i aktywującej transkrypcję; GAL4 — domena wiążąca DNA z drożdżowego białka GAL4; VP16-C — terminalna domena białka VP16 wirusa opryszczki; RNAPolII — RNA polimeraza II; TATA — sekwencja TATA.

hodowlanego RU486 uzyskano 50-krotną indukcję aktywności CAT. Maksymalną aktywację osiągnęto po 8 godzinach od podania induktora. Sprawność tego systemu potwierdzono również *in vivo*. Trzeba podkreślić, że RU486 było w tych eksperymentach podawane w dawce nie powodującej ujawniania się jego efektu antagonistycznego względem progesteronu oraz glukokortykoidów i w 1000-krotnie niższej niż potrzeba do wywołania aborcji. Wiadomo jednak, że RU486 może wywierać wpływ na czynnik transkrypcyjny AP-1 [28], czego konsekwencje omawiano już poprzednio. Doświadczenia przeprowadzone przez O'Malleya i w sp. [30] nie dają odpowiedzi na pytanie, czy stosowane stężenie RU486 ma hamujący wpływ na aktywność AP-1.

IV. Chemiczne induktory dimerizacji — CIDs

Ostatnią część tego artykułu chciałbym poświęcić związkom nazwanym przez G. R. Crabtree i S. L. Schreiber'a chemicznymi induktorami dimerizacji — CIDs (ang. *chemical inducers of dimerization*) i ich wykorzystaniu do kontroli transkrypcji w komórkach ssaczy. CID jest związkiem syntetycznym, który po dodaniu do mieszaniny dwóch peptydów posiadających domeny wiążące go, spowoduje ich dimerizację (patrz Ryc. 6). Pozwala to na dobór idealnego induktora z punktu widzenia kontroli procesów przebiegających w komórce. Poszukiwany związek można skonstruować tak, aby był lipofilny, obojętny dla komórki, posiadał najkorzystniejszy okres półtrwania, itd. Pomysł wykorzystania CIDs do kontroli ekspresji genów na poziomie inicjacji transkrypcji podsunęły badania Schreiber'a i Crabtree nad kontrolą przez te syntetyczne ligandy procesu transdukcji sygnału w komórkach hodowanych *in vitro* [31]. Taki system kontroli opiera się na domenowej budowie białek, w tym i czynników transkrypcyjnych, oraz fakcie, iż aby nastąpiła aktywacja transkrypcji, domeny: wiążąca DNA i aktywująca transkrypcję nie muszą być związane ze sobą kowalencyjnie. Chemiczne induktory dimerizacji odpowiadają za związanie ze sobą obu koniecznych do aktywacji transkrypcji fragmentów

białka zawierających w swojej sekwencji motywy wiążące CID. Cały układ kontroli ekspresji genu lub genów wprowadzanych do komórki jest więc dosyć skomplikowany i składa się z czterech elementów (Ryc. 6). Pierwsze trzy to: 1) gen, który nas interesuje pod kontrolą odpowiedniej sekwencji promotorowej; oraz fragmenty DNA kodujące: 2) domenę wiążącą się z sekwencją promotorową oraz 3) domenę aktywującą transkrypcję, obydwa zawierające motyw umożliwiający im dimerizację przy współudziale CID. Ostatnim, czwartym, jest chemiczny induktor dimerizacji, bez którego nie może zachodzić ekspresja interesującego nas produktu.

Pierwszym wykorzystanym chemicznym induktorem dimerizacji był syntetyczny związek o nazwie FK1012 [31]. Jest to pochodna FK506 — związku, który jest stosowany w praktyce klinicznej jako środek immunosupresyjny. Po podaniu, FK506 przenika przez błonę komórkową i wiąże się z dużym powinowactwem z białkiem FKBP12. Powstały kompleks FKBP12-FK506 ma zdolność wiązania się z kalcyneuryną. Kalcyneuryna jest białkiem pośredniczącym np. w aktywacji ekspresji genu interleukiny drugiej (IL-2). Brak produkcji IL-2 w komórkach limfocytów, spowodowany wpływem kompleksu FK506-FKBP12, jest uznawany za przyczynę immunosupresji.

Spencer i w sp., w serii eksperymentów pokazali, że wytworzone w wyniku chemicznej syntezy dimery FK506 (FK1012), o różnym stopniu modyfikacji, po związaniu z kalcyneuryną nie wywierają wpływu na komórkę [31]. W tej samej pracy pokazano, że przy pomocy tego układu można bardzo dokładnie kontrolować przekazywanie sygnału od receptora błonowego do jądra komórkowego. W tej serii eksperymentów zsyntetyzowano również monomer zdolny do wiązania FKBP12 ale nie wpływający na kalcyneurynę tzw. FK506M.

FK1012 został wykorzystany do kontroli inicjacji transkrypcji genu wprowadzonego do komórek ssaczy [32]. Doświadczenie miało pokazać, czy obecność aktywatora transkrypcji jest konieczna tylko w czasie inicjacji tego procesu, czy także podczas jego

trwania. W tym celu do komórek linii Jurkat (pochodzących z limfocytów T) wprowadzono geny kodujące hybrydowe białka: domenę aktywującą transkrypcję pochodzącą z VP16 połączoną z fragmentem pochodzącym z FKBP12 oraz wiążący się z DNA fragment drożdżowego czynnika transkrypcyjnego GAL4 także zdolny do dimeryzacji za pośrednictwem FK1012. Dodatkowo wprowadzono gen reporterowy, którego promotor zawierał sekwencję rozpoznawaną przez GAL4. Po podaniu FK1012 do hodowli takich komórek uzyskano indukcję ekspresji genu reporterowego. Była ona zależna zarówno od stężenia induktora jak i od czasu jaki upłynął od podania. Stopień indukcji nie był tak wysoki jak w opisywanych wcześniej systemach ale charakteryzował się szybkim wzrostem. Interesująca w tym systemie jest możliwość bardzo szybkiego wyłączenia transkrypcji wprowadzonego genu. Jest to możliwość jakiej nie daje żaden inny ze znanych systemów. Gwałtowne zatrzymanie syntezy uzyskuje się poprzez dodanie do hodowli monomeru — FK506M w odpowiednim nadmiarze w stosunku do induktora. W opisywanym doświadczeniu spadek aktywności białka kodowanego przez gen reporterowy obserwowano już w 30 minut po podaniu monomeru.

Ostatnio ta sama grupa badaczy opisała inny CID wykorzystany do kontroli ekspresji genu reporterowego wprowadzonego do komórek w hodowli [33]. Jako chemiczny induktor dimeryzacji wykorzystano FKCsA — związek składający się z fragmentów pochodzących z FK506 i cyklosporyny A. Ta ostatnia jest wiązana przez cyklofilinę (CyP). Kompleks CsA-CyP działa na komórki podobnie jak opisany wcześniej FK506-FKBP12. Domena aktywująca transkrypcję była białkiem składającym się z fragmentów VP16 oraz CyP. Domena wiążąca DNA pochodną GAL4 oraz FKBP12. Geny kodujące obie powyższe fuzje oraz białko reporterowe wprowadzono do komórek. Indukcję syntezy właściwego produktu uzyskiwano tylko w przypadku podania FKCaA.

Opisany powyżej pomysł wykorzystuje się w badaniach procesów komórkowych coraz częściej. Powstają nowe rodzaje związków. Jednym z przykładów może być użycie kumermycyny jako induktora, fragmentu gyrazyB jako domeny wiążącej i novobiocyny jako monomeru blokującego transkrypcję [34]. Być może te związki da się również zastosować do kontroli ekspresji genów na poziomie transkrypcji. Niewykluczone także jest użycie CIDs w połączeniu z opisanymi wcześniej systemami. Nie ulega wątpliwości, że jest to przykład zupełnie nowego spojrzenia na problem regulowania ekspresji genów wprowadzonych do komórek ssaczyh.

V. Podsumowanie

W powyższym przeglądzie nowych sposobów kontroli ekspresji genów wprowadzanych do komórek

ssaczyh przedstawiono jedynie systemy oparte o kontrolę inicjacji transkrypcji. Pominięte zostały pomysły wykorzystujące potranslacyjne modyfikacje białek [4] a także te oparte o wykorzystanie różnego rodzaju rekombinaz [35-38]. Są to również rozwiązania bardzo ciekawe i oryginalne. Mogą być stosowane osobno lub w połączeniu z kontrolą na poziomie transkrypcji. Często też mogą w nich być wykorzystane induktory takie jak np. CIDs [4], ekdyzon [4] czy inne zmodyfikowane hormony sterydowe [39]. Zastrzeżenia do ich wykorzystywania są bardzo podobne do tych omawianych w powyższej pracy. Nie mniej szereg prac, w których zaczęto badać już udział konkretnych genów w sytuacjach mniej lub bardziej fizjologicznych pokazuje, że zwiększa się zainteresowanie ich zastosowaniem. Daleka jeszcze droga do wykorzystywania ich w medycynie. W dniu dzisiejszym jednak, opisane powyżej, zaawansowane systemy stanowią nowe i obiecujące narzędzie do dokładniejszego badania roli poszczególnych genów zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

Artykuł otrzymano 14 sierpnia 1997 r.
Zaakceptowano do druku 8 grudnia 1997 r.

Piśmiennictwo

- Balbas P, Bolivar F (1990) *Methods Enzymol* **185**: 14-37
- Romanos A, Scorer CA, Clare JJ (1992) *Yeast* **8**: 423-488
- Kriegler M (1990) *Methods Enzymol* **185**: 512-527
- Spencer DM (1996) *Trends Genet* **12**, **5**: 181-187
- Gossen M, Bonin AL, Bujard H (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 471-475
- Gossen M, Bujard H (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5547-5551
- Figge J, Wright Ch, Collin CJ, Roberts TM, Livingston DM (1988) *Cell* **52**: 713-722
- Hu MC-T, Davidson N (1987) *Cell* **48**: 555-566
- Deuschele U, Hipskind RA, Bujard H (1990) *Science* **248**: 480-483
- Labow M, Baim SB, Shenk T, Levine AJ (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 3343-3356
- Gatz C, Froberg C, Wendenburg R (1992) *Plant J* **2**: 397-404
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H (1995) *Science* **268**: 1766-1769
- Furth PA, Onge LSt, Böger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9302-9306
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer Ch, Lübbert H, Bujard H (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10933-10938
- Dhawan J, Rando TA, Elson SL, Bujard H, Blau HM (1995) *Somatic Cell Mol Genet* **21**: 233-240
- Baron U, Freundlieb S, Gossen M, Bujard H (1995) *Nucleic Acid Res* **23**: 3605-3606
- Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N, Schatz DG (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6522-6526
- Hofmann A, Nolan GP, Blau H (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5185-5190
- Gill G, Ptashne M (1988) *Nature (Lond)* **334**: 721-724
- Hennighausen L, Wall RJ, Tillmann U, Li M, Furth P (1995) *J Cell Biochem* **59**: 463-472
- Ewal D, Li M, Efart S, Auer G, Wall J, Furth P, Hennighausen L (1996) *Science* **273**: 1384-1386
- Eldredge ER, Chiao PJ, Lu KP (1995) *Methods Enzymol* **254**: 481-491
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang I, Haw-

- kins RD, Kandel ER (1996) *Science* **274**: 1678-1683
24. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 1669-1679
25. No D, Yao T-P, Evans RM (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3346-3351
26. Yao T-P, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) *Cell* **71**: 63-72
27. Christopherson KS, Mark MR, Bajaj V, Godowski PJ (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6314-6318
28. Chen J-Y, Penco S, Ostrowski J, Balaguer P, Pons M, Starrett JE, Reczek P, Chambon P, Gronemeyer H (1995) *EMBO J* **14**: 1187-1197
29. Vegeto E, Allan G, Schrader WT, Tsai M-J, McDonnell DP, O'Malley BW (1992) *Cell* **69**: 703-713
30. Wang Y, O'Malley Jr. BW, Tsai SY, O'Malley BW (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8180-84
31. Spencer DM, Wandless TJ, Schreiber SL, Crabtree GR (1993) *Nature (Lond)* **262**: 1019-1024
32. Ho SN, Biggar SR, Spencer DM, Schreiber SL, Crabtree GR (1996) *Nature (Lond)* **382**: 822-826
33. Belshaw PJ, Ho SN, Crabtree GR, Schreiber SL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4604-4607
34. Farrar MA, Alberola-Ila J, Perimutter RM (1996) *Nature (Lond)* **383**: 178-181
35. Kühn R, Schwenk F, Auget M, Rajewsky K (1995) *Science* **269**: 1427-1429
36. O'Gorman S, Fox DT, Wahl GM (1991) *Science* **251**: 1351-1355
37. Wang Y, Krushel LA, Edelman GM (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3932-3936
38. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6991-6995

Regulacja ekspresji genu DMD człowieka. Przykład wielokrotnego wykorzystania informacji genetycznej

Regulation of human DMD gene expression. An example of multiple utilization of genetic information

DOBRAWA NAPIERAŁA¹,
RYSZARD SŁOMSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Produkty ekspresji genu DMD
 - II-1. Dystrofiny o masie 427 kDa
 - II-2. Krótkie formy dystrofiny
 - II-3. Inne produkty ekspresji genu DMD
- III. Struktura promotorów genu DMD
- IV. Powstawanie mRNA dystrofiny
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Products of DMD gene expression
 - II-1. 427 kDa dystrophins
 - II-2. Short forms of dystrophin
 - II-3. Other products of DMD gene expression
- III. Structure of DMD gene promoters
- IV. Production of dystrophin mRNA
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: BMD — dystrofia mięśniowa Beckera; DMD — dystrofia mięśniowa Duchenne'a; Dp — krótkie formy dystrofiny; kDa — tysiąc Daltonów; kz — tysiąc zasad; Mpz — milion par zasad; pz — pary zasad; promotory: C, CNS, G, L, M, P, R, S — promotory: mózgu, centralnego układu nerwowego, komórek glejowych, limfoblastów, mięśni, komórek Purkinje'go, siatkówki, komórek Schwanna; UTR — region nie ulegający translacji; XLDCM — sprzężona z chromosomem X kardiomiopatia rozstrzeniowa.

I. Wstęp

Największym poznanym genem człowieka jest położony na chromosomie Xp21 gen DMD. Nazwa pochodzi od warunkowanej przez mutacje tego genu dystrofii mięśniowej Duchenne'a. Gen DMD obejmuje fragment genomu o wielkości 2,5 Mpz, co stanowi 1% chromosomu X i prawie 0,1% genomu człowieka. Część kodująca, w porównaniu z rozmiarem całego genu, jest bardzo mała i koduje mRNA o wielkości 14 kz. Gen ten złożony jest z 79 eksonów o średniej wielkości 200 pz. Sekwencje niekodujące stanowią zatem aż 99,4% genu, przy przeciętnej wielkości intronu 35 kpz. Największe introny przekraczają nawet 200 kpz [1]. Dla przykładu, pełna wielkość innych, uważanych za olbrzymie, genów człowieka, jak np. gen

¹ Mgr, ² prof. dr hab., Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, Katedra Biochemii i Biotechnologii AR, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Laboratorium Genetyki Molekularnej, ul. Szeherazady 100, 60-195 Poznań

CFTR warunkujący mukowiscydozę lub gen FVIII kodujący czynnik VIII krzepnięcia krwi, zblizona jest do 200 kpz. Od 1986 roku, kiedy Koenig i wsp. [2] zlokalizowali gen DMD w locus Xp21, analizą jego struktury i funkcji zainteresowało się wiele grup badawczych, dostarczając nowych danych o budowie i ekspresji. Informacje o strukturze genu zostały przedstawione na łamach „Postępów biochemii” w artykule J. Kwiatkowskiej i R. Słomskiego „Gen DMD — największy gen człowieka” [3].

Już w 1987 roku grupa badaczy pod kierunkiem Hoffmana wykryła białkowy produkt genu — dystrofinę [4]. Białko to występuje po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej mięśni i niektórych neuronów [5]. Porównanie dystrofiny człowieka i kilku gatunków zwierząt wykazało, że jest to białko konserwatywne ewolucyjnie. Dystrofina człowieka ma masę 427 kDa i zbudowana jest z 3685 aminokwasów tworzących cztery strukturalne domeny [6, 7]. Część N-terminalna zawierająca 240 aminokwasów tworzy domenę wiążącą aktyne. Długa, elastyczna domena centralna zbudowana jest z 24 homologicznych powtórzeń zawierających średnio 109 aminokwasów. Każde powtórzenie tworzy potrójną helisę dzięki trzem częściom α -helikalnym i dwóm regionom zwiastowym bogatym w proliny. Zarówno budowa jak i funkcja tych dwóch domen dystrofiny podobna jest do α -aktyliny i β -spektryn, które są białkami strukturalnymi występującymi we wszystkich typach komórek. Trzecia domena tworzy charakterystyczny motyw składający się z 150 aminokwasów, z których znaczną część stanowią proliny. Podobny motyw obecny jest w kalmodulinie, α -aktylinie i β -spektrynach, gdzie odpowiedzialny jest za wiązanie jonów wapnia. Najbardziej konserwatywną domenę dystrofiny tworzy 420 aminokwasów końca karboksylowego. Region ten nie wykazuje homologii do innych białek cytoszkieletu poza utrofiną. Badania dystrofiny w mięśniach wykazały, że domena karboksylowa łączy się z dużym kompleksem białek w sarkolemie [8].

Gen DMD wykryto w wyniku poszukiwań molekularnego podłoża dystrofii mięśniowej Duchenne’a (DMD) i jej allelicznej postaci — dystrofii mięśniowej Beckera (BMD) [2]. Dystrofia mięśniowa Duchenne’a jest jedną z najczęstszych chorób genetycznych sprzężonych z chromosomem X i dziedziczy się w sposób recesywny. DMD występuje z częstością 1 na 3000 noworodków płci męskiej, natomiast BMD około dziesięciokrotnie rzadziej. Choroba ta charakteryzuje się postępującym zanikiem mięśni, a u 30% chorych występuje ponadto upośledzenie umysłowe [9]. Mutacje genu DMD powodują brak dystrofiny w mięśniach osób cierpiących na letalną postać choroby (DMD), natomiast w łagodnej postaci choroby (BMD) dystrofina występuje w mniejszej ilości lub w formie zmienionej. Najczęstszymi mutacjami prowadzącymi do DMD/BMD są duże delecje obejmujące kilka lub nawet kilkanaście eksonów [10]. Analiza mutacji

wywołujących dystrofię mięśniową Duchenne’a jest podstawą rutynowej diagnostyki molekularnej, jednak w dalszym ciągu nie opracowano skutecznych metod leczenia. Podejmowane są próby terapii genowej, jednakże poważnym problemem jest niezwykła wielkość genu DMD [11].

II. Produkty ekspresji genu DMD

II-1. Dystrofiny o masie 427 kDa

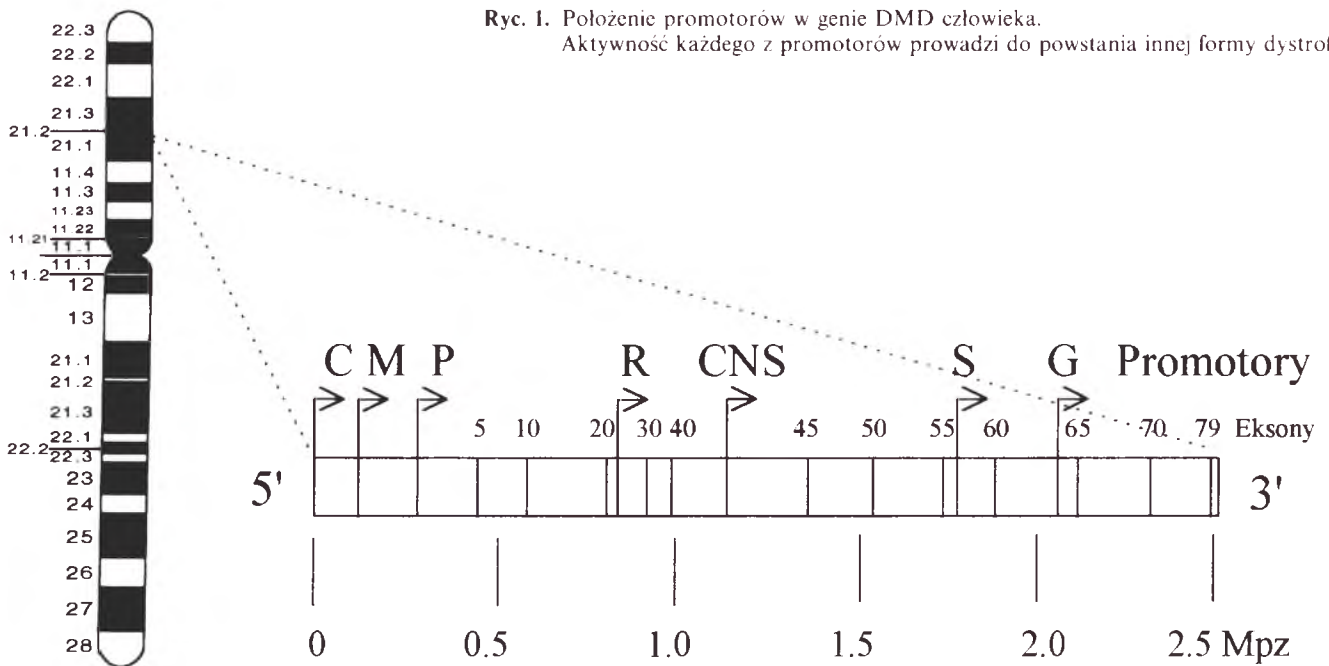
Pierwsze badania występowania dystrofiny w różnych tkankach sugerowały, że ekspresja genu DMD osiąga znaczący poziom tylko w niektórych typach komórek układu nerwowego oraz mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym i w mniejszym stopniu w mięśniach gładkich [5, 12]. Nudel i wsp. jako pierwsi zauważyli, że aminoterminalna część dystrofiny w mięśniach i tkance mózgowej różni się sekwencją [13]. Jedenaście aminokwasów na końcu aminowym dystrofiny mięśni (dystrofina M) zastąpionych jest w dystrofii mózgu (dystrofina C) trzema innymi aminokwasami. Ta część białka kodowana jest przez alternatywne pierwsze eksony, a transkrypcją dystrofiny M i C kierują odrębne promotory. Promotor C położony jest w odległości 90 kpz przed promotorem M i około 400 kpz przed drugim eksonem [14]. Transkrypt zawierający specyficzny dla dystrofiny C pierwszy ekson występuje wyłącznie w korze mózgowej oraz hipokampie i wykazuje aż 99% zgodności sekwencji u człowieka i szczura, podczas gdy homologia pierwszego eksonu dystrofiny M sięga tylko 80%. Dalsze badania zaowocowały odkryciem następnych promotorów, których aktywność w różnych tkankach prowadzi do powstania jeszcze innych izoform dystrofiny (Ryc. 1).

Kolejna izoforma dystrofiny o masie 427 kDa wykryta została w komórkach Purkiniego — stąd jej nazwa dystrofina P, chociaż występuje także w mięśniach i korze mózgowej. Promotor P, który kieruje transkrypcją dystrofiny P, oraz specyficzny dla tej formy dystrofiny pierwszy ekson, położone są w środkowej części olbrzymiego, składającego się z 280 kpz intronu pierwszego [15]. Aktywność promotorów M, C i P prowadzi do powstania „pełnej długości” transkryptów o wielkości 14 kz, które różnią się jedynie krótką sekwencją na 5’ końcu. Swoisty dla poszczególnych dystrofin pierwszy ekson łączy się ze wspólnym eksonem drugim z zachowaniem ramki odczytu, zatem dystrofiny M, C i P różnią się jedynie krótką sekwencją końca aminowego.

Nishio i wsp. [16] przedstawili wyniki doświadczeń sugerujące występowanie około 500 kpz przed promotorem M jeszcze jednego promotora (promotor L), kierującego transkrypcją izoformy dystrofiny o masie 427 kDa. Obecność tej izoformy wykazano w hodowlach limfoblastów, jednak nic nie wiadomo o jej

Ryc. 1. Położenie promotorów w genie DMD człowieka.

Aktywność każdego z promotorów prowadzi do powstania innej formy dystrofiny.



Chromosom X

występowaniu w innych komórkach. W przeciwieństwie do innych form o pełnej długości, specyficzna część sekwencji transkryptu dystrofiny L łączy się dopiero z trzecim eksonem. Inny pierwszy ekson, występujący w blisko połowie transkryptów pochodzących z limfocytów krwi obwodowej, zaobserwowali również Roberts i wsp. [17]. Ekson ten leży jednak w intronie pierwszym genu DMD i transkrybowany jest pod kontrolą promotora M, ale nie wiadomo czy w limfocytach aktywny jest dodatkowy promotor. Przyjmuje się że mRNA dystrofiny obecny w tych komórkach powstaje dzięki nieuprawnionej transkrypcji, czyli bardzo słabej ekspresji genu (1 na 10000 limfocytów) w komórkach, w których normalnie nie występuje białkowy produkt genu.

II-2. Krótkie formy dystrofiny

Analizy typu Western blot z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw centralnej oraz C-terminalnej części dystrofiny doprowadziły do odkrycia kolejnych białek powstających w wyniku ekspresji genu DMD (Tab. 1). Białka te nazywane są apodystrofinami lub oznaczane Dp (utworzone od ang. *dystrophin product*) i masą cząsteczkową. Apodystrofiny powstają w wyniku aktywacji promotorów położonych w różnych intronach genu DMD, a ich wspólnymi cechami jest brak ważnej dla funkcji dystrofiny domeny N-terminalnej oraz obecność regionu wymaganego do wiązania z kompleksem glikoprotein błonowych [18].

Badania obecności i ilości apodystrofin w różnych tkankach pozwoliły stwierdzić, że najbardziej powszechnym produktem genu DMD jest apodystrofina 1 (Dp71). Obecności Dp71 nie wykazano w mięśniach szkieletowych, lecz udokumentowano jej występowanie w mózgu i innych tkankach poza mięśniami. Ilości

tej izoformy w komórkach glejowych, wątrobie i żołądku porównywalne są z ilością dystrofiny M w mięśniach szkieletowych [19, 20]. Dp71 powstaje w wyniku translacji jedynie 6% części kodującej genu DMD. Promotor formy Dp71 — promotor G (ang. *glial* lub *general*), znajduje się w intronie 62 czyli w odległości 2 Mpz za promotorami M, C i P. Promotor G kieruje powstawaniem mRNA w wielkości 4,8 kz. Jego unikalna sekwencja 5' zawiera 123-nukleotydowy region nie ulegający translacji (5' UTR) oraz 7 nowych kodonów. Alternatywny pierwszy ekson Dp71 w wyniku składania mRNA łączy się z eksonem 63 [20-22]. Badania wykazały, że Dp71 jest w rzeczywistości rodziną izoform białek powstających w wyniku alternatywnego składania końca 3' transkryptu generowanego przez promotor G. W niektórych izoformach zachowany jest „mięśniowy” koniec karboksylowy, w innych, w wyniku usunięcia 32-nukleotydowego przedostatniego eksonu, zmienia się charakter domeny C-terminalnej z hydrofilowego na hydrofobowy [19, 23, 24].

Promotor G kieruje również syntezą bardzo krótkiego transkryptu (2,2 kz mRNA), z którego powstaje białko o masie 40 kDa — apodystrofina 3 [25]. Apodystrofiny 1 i 3 mają identyczną sekwencję N-terminalną oraz wykazują takie samo rozmieszczenie w tkankach, jednak apodystrofina 1 występuje w znacznie większych ilościach. Natomiast pozycja kodonu stop oraz sekwencja 3' UTR apodystrofiny 3 jest taka sama jak w skróconej dystrofinie płodowej, opisaną przez Feenera i wsp. [24].

Kolejne promotory zlokalizowano w intronach: 29 - promotor R (ang. *retinal*), 44 - promotor CNS (ang. *central nervous system*) oraz 55 - promotor S (komórki Schwanna). Promotor S został odkryty przez Berra i wsp. [26], którzy wykazali jego aktywność wyłącznie w komórkach nerwów obwodowych i w ho-

Tabela 1.

Białka kodowane przez gen DMD i ich występowanie w różnych typach komórek

Białko	Masa	Promotor	Występowanie
dystrofina M	427 kDa	M	mięśnie szkieletowe, gładkie, mięsień sercowy
dystrofina C	427 kDa	C	kora mózgowa, hipokamp
dystrofina P	427 kDa	P	komórki Purkiniego, mięśnie, kora mózgowa
dystrofina L (?)	427 kDa	L	limfoblasty
dystrofina G, Dp71, apodystrofina 1	71 kDa	G	większość tkanek oprócz mięśni
apodystrofina 3	40 kDa	G	większość tkanek oprócz mięśni
dystrofina S, Dp116, apodystrofina 2	116 kDa	S	nerwy obwodowe, komórki Schwanna
dystrofina R, Dp260	260 kDa	R	siatkówka
dystrofina CNS, Dp140	140 kDa	CNS	centralny układ nerwowy

dowlach komórek Schwanna. Pod kontrolą promotora S powstaje transkrypt o wielkości 5,2 kb, a białkowym produktem jest dystrofina S o masie 116 kDa (Dp 116, apodystrofina 2) [26, 27]. Wydaje się, że ekwiwalentem Dp116 jest w centralnym układzie nerwowym izoforma o masie 140 kDa (Dp140) powstająca pod kontrolą promotora CNS [28]. Transkrypt Dp140 składa się z 7,5 kb oraz zawiera specyficzną 109-nukleotydomową sekwencję transkrybowaną z regionu w intronie 44. Charakterystyczne jest, że cały pierwszy ekson Dp140 koduje region nie ulegający translacji, a inicjujący kodon metioninowy znajduje się dopiero w eksonie 51.

Czwartą, krótką formę dystrofiny, która występuje głównie w siatkówce, zidentyfikowali i scharakteryzowali S o u z a i w s p. [29]. Izoforma oznaczona jako Dp260, lub nazwana dystrofiną R, ulega ekspresji z promotora R, a pierwszy ekson jej transkryptu koduje specyficzny koniec aminowy złożony z 13 aminokwasów o charakterze hydrofilowym.

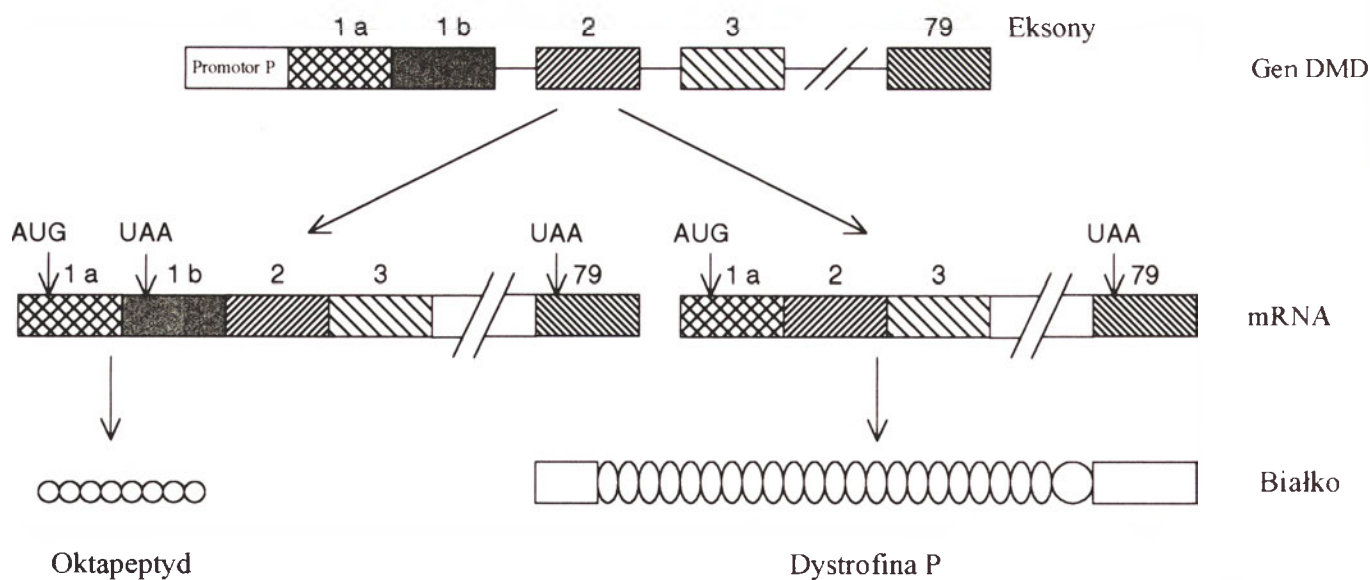
W wyniku alternatywnego składania eksonów kodujących część C-terminalną dystrofiny pojawia się kilkanaście dodatkowych izoform tego białka. Ich występowanie w różnych tkankach jest ściśle regulowane w trakcie rozwoju i nie zależy od rodzaju promotora, który je generuje [23]. Obecność większości tych form charakterystyczna jest wyłącznie dla rozwoju postnatalnego, podczas gdy w tkankach embrionalnych dominuje forma powstała bez udziału przedostatniego eksonu. W trakcie rozwoju mięśni, układu nerwowego i innych tkanek pojawiają się kolejne izoformy dystrofiny, które mają zmienioną polarność, a co za tym idzie, różnią się zdolnością do interakcji z glikoproteinami błony komórkowej. Możliwe, że wymiana izoform jest zdeterminowana przez różną w trakcie rozwoju ekspresję białek błonowych

związanych z dystrofiną. Wiadomo, że alternatywne składanie genów białek kurczliwych mięśni jest zjawiskiem bardzo powszechnym. Przyjmuje się, że jest to sposób umożliwiający regulację funkcji elementów kurczliwych w odpowiedzi na fizjologiczne różnice zarówno w obrębie, jak i pomiędzy poszczególnymi grupami mięśni.

II-3. Inne produkty ekspresji genu DMD

Gen DMD jest nie tylko największym, ale również najbardziej złożonym genem człowieka, zawierającym liczne promotory. Nie jest wykluczone, że w tym genie występują jeszcze inne, poza przedstawionymi, promotory — na przykład w olbrzymich intronach, które swoimi rozmiarami dorównują największym genom, dlatego też lista izoform dystrofiny nie jest jeszcze zamknięta. Możliwe jest również powstawanie na matrycy genu DMD transkryptów, które nie zawierają sekwencji występujących w mRNA dystrofiny. Znalezienie takich transkryptów jest utrudnione, ponieważ jako sondy molekularne stosowane są fragmenty cDNA dystrofiny oraz przeciwciała dla epitopów dystrofiny mięśni. Natomiast wykryto produkt genu DMD, który nie jest dystrofiną, a przynajmniej trudno go za taki uznać.

Jak wykazali Holder i w s p. transkrypt powstający pod kontrolą promotora P może ulegać na końcu 5' alternatywnemu składaniu [30]. Charakterystyczny dla tego transkryptu ekson pierwszy zawiera w części 3' zgodny z ramką odczytu sygnał terminacji translacji. W czasie dojrzewania transkryptu fragment z kodonem terminującym w eksonie pierwszym może zostać usunięty. W tym przypadku translacja zakończy się po utworzeniu dystrofiny P, natomiast zachowanie tego fragmentu w transkrypcie



Ryc. 2 Alternatywne składanie transkryptu genu DMD powstającego pod kontrolą promotora P. W wyniku pierwszego wariantu alternatywnego składania powstaje dystrofina P o masie 427 kDa, drugi wariant generuje oktapeptyd.

powoduje przerwanie translacji po utworzeniu oktapeptydu (Ryc. 2).

Ekspresja N-terminalnych peptydów została opisana również w przypadku innych genów. Przykładem jest gen receptora β -adrenergicznego, w którym N-terminalny peptyd reguluje ekspresję poprzez inhibicję translacji [31]. Nie jest pewne, czy oktapeptyd powstający pod kontrolą promotora P jest niezależnym regulatorem ekspresji, jednak udowodniono, że jego obecność w komórce uniemożliwia translację pełnej długości dystrofiny.

III. Struktura promotorów genu DMD

Jednym z głównych problemów biologii molekularnej jest zrozumienie mechanizmów, dzięki którym określone geny ulegają ekspresji w określonej fazie cyklu komórkowego, specyficznej dla tkanek oraz w odpowiedzi na działanie induktorów zewnątrzkomórkowych. Dlatego też ważne jest poznanie struktury promotorów oraz innych czynników cis- i trans-aktywujących zaangażowanych w generowanie izoform dystrofiny w różnych tkankach czy w czasie ontogenezy.

W mięśniach szkieletowych, gładkich i mięśniu sercowym powstawaniem dystrofiny kieruje promotor M [32]. Jego aktywność jest specyficznie stymulowana w trakcie różnicowania mioblastów w miotuby, powodując gwałtowny wzrost ilości dystrofiny. Analiza sekwencyjna 150 nukleotydów „minimalnego promotora” mięśniowego wykazała, że pod względem budowy przypomina on promotory innych genów specyficznych dla mięśni [33, 34]. Najbliżej miejsca startu transkrypcji położona jest sekwencja TATA. Dalej zlokalizowane są charakterystyczne dla promotorów mięśniowo-specyficznych elementy CARG [ang. CC(A+T-rich)6GG]. Są to sekwencje bogate w pary A+T ograniczone od strony 5' przez kilka nuk-

leotydów cytozynowych, a od strony 3'-guaninowych. Pomiędzy kasetą TATA a CARG znajduje się region bogaty w pary GC, jednak najprawdopodobniej nie jest on niezbędny dla ekspresji dystrofiny mięśniowej. Elementem promotora M jest również sekwencja wiążąca czynnik MEF-1 (ang. *myocyte-specific enhancer-binding nuclear factor*), a także kasetta „E” oddziaływująca z białkami o strukturze heliks-pętla-heliks. Takim białkiem jest między innymi czynnik transkrypcyjny myoD1 odpowiedzialny za różnicowanie się mięśni. Wydaje się jednak, że ani motyw wiążący czynnik MEF-1, ani kasetta „E” nie są niezbędne do ekspresji genu DMD w mięśniach. Sekwencja konsensusowa CARG jest jedynym poznanym elementem promotora M istotnym dla transkrypcji mięśniowej izoformy dystrofiny [35]. Wydaje się, że ekspresja genu DMD w mięśniach jest, przynajmniej częściowo, regulowana przez mechanizmy typowe dla ekspresji innych, specyficznych dla mięśni genów.

Motywy podobne do CARG występują także w promotorach P i C [36]. Budowa promotora P nie jest jeszcze dokładnie poznana, ale wiadomo, że oprócz motywów podobnych do CARG zawiera również kasetę „E”. Sekwencja regionu promotorowego aktywnego w neuronach kory mózgowej i hipokampu nie ma typowego silnego motywu TATA, chociaż około 26 pozycji przed miejscem rozpoczęcia transkrypcji znajduje się region bogaty w A+T. Cechą charakterystyczną regionu 5' UTR transkryptu powstającego pod kontrolą promotora C jest nietypowa obecność aż 9 kodonów AUG, z których tylko jeden jest zgodny z ramką odczytu sekwencji kodującej genu DMD.

Kasetta TATA nie występuje w promotorze G, który kieruje powstawaniem białka Dp71 — jedyne lub głównego produktu genu DMD w wielu komórkach niemięśniowych. Oprócz kasety TATA, promotor G nie posiada również innych, występujących powszechnie w promotorach eukariotycznych sekwencji

zgodnych takich jak np. kasetę CAAT, a bogaty jest w pary GC (81 z pierwszych 100 pz) i zawiera 3 miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego SP1 [37]. Te cechy struktury promotora G są typowe dla promotorów genów warunkujących podstawowe funkcje komórki (ang. *housekeeping genes*), takich jak geny histonów, białek cytoszkieletu czy podstawowych enzymów metabolizmu.

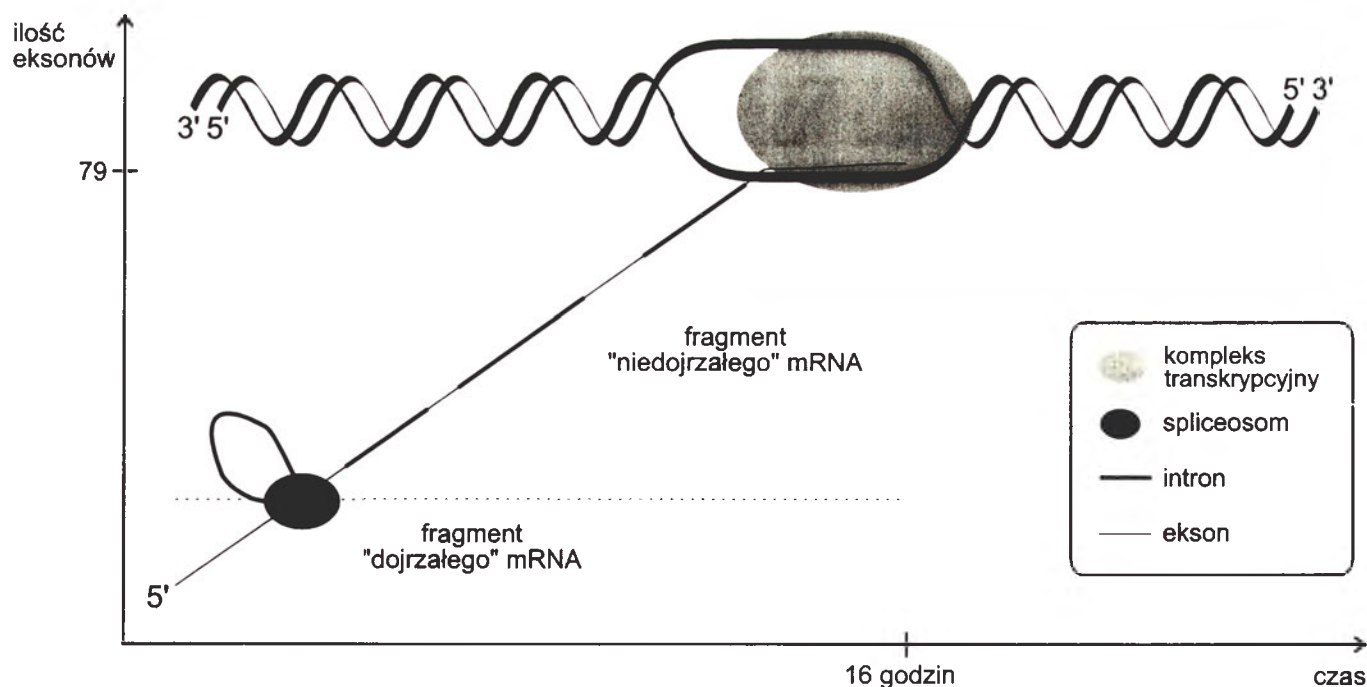
Promotory, których struktura została poznana, różnią się zarówno budową, jak i aktywnością tkankowo-specyficzną. Jednak uwagę zwraca występowanie kaset podobnych do CAAT oraz innych elementów charakterystycznych dla promotorów mięśniowo-specyficznym w promotorach nie zaangażowanych w powstawanie dystrofiny mięśni. Może to odgrywać istotną rolę w zmniejszaniu strat spowodowanych mutacjami w obrębie promotora M. Przykładem jest sprzężona z chromosomem X kardiomiopatia rozstrzeniowa (XLDCM), wywołwana przez mutacje w promotorze M genu DMD. W mięśniach szkieletowych chorych na XLDCM brakuje M dystrofiny, natomiast zastępuje ją forma P. Z nieznanych przyczyn promotor P nie jest w stanie kierować transkrypcją w mięśniu sercowym, co prowadzi do jego degeneracji.

Jak dotąd niewiele wiadomo o sekwencjach wzmacniających transkrypcję genu DMD (ang. *enhancer*). Istnieje szereg pośrednich przesłanek wskazujących na istnienie w obrębie dużych intronów położonych przy eksonie 1 dodatkowych, specyficznych dla mięśni sekwencji wzmacniających. Z fragmentu intronu 1 o wielkości 5 kpz wyodrębniono sekwencję spełniającą warunki sekwencji wzmacniającej [40]. Sekwencja ta działa niezależnie od położenia i orientacji oraz jest specyficzna dla mięśni (jest aktywna zarówno w niedojrzałych miofibrach jak i w dojrzałych mięs-

niach szkieletowych, ale nie w fibroblastach). Z pewnością nie jest to jedyna sekwencja wzmacniająca transkrypcję genu DMD w mięśniach, gdyż wzrost poziomu transkrypcji *in vitro* zachodzący tylko przy jej udziale jest kilkakrotnie niższy od obserwowanego w prawidłowych mięśniach.

IV. Powstawanie mRNA dystrofiny

Nie tylko regulacja ekspresji genu DMD, lecz również sam proces jego transkrypcji są bardzo złożone. Niezwykła wielkość genu oraz liczba eksonów sugerują, że mogą tu występować inne mechanizmy powstawania i dojrzewania mRNA aniżeli występujące w mniejszych genach. Wielu informacji o transkrypcji i składaniu mRNA dystrofiny dostarczyły doświadczenia polegające na określeniu czasu i poziomu akumulacji transkryptów genu DMD w różnicujących się komórkach miogennych [41, 42]. W tych komórkach aktywny jest promotor specyficzny dla mięśni. Porównując czas, w jakim w transkryptach zaczynały pojawiać się sekwencje z czterech różnych miejsc genu, ustalili, że do transkrypcji pierwszych 1770 kpz genu DMD polimeraza RNA II potrzebuje 12 godzin. Przyjęli zatem, że czas wymagany do transkrypcji całego genu wynosi około 16 godzin. Wynika z tego, że szybkość wydłużania transkryptu genu DMD, tak jak innych genów, wynosi około 40 nukleotydów na sekundę, a więc jego transkrypcja zachodzi w typowy sposób. Wydajność tego procesu jednak wyraźnie maleje w kierunku 3' genu, szczególnie w przedziale od 1500 do 2200 kpz. W regionie tym często dochodzi do odłączenia lub zablokowania polimerazy. Przyczyną odłączenia lub zablokowania mogą być promotory położone w tej części genu. Ponieważ promotory



Ryc. 3. Kotretranskrypcyjne składanie mRNA dystrofiny.

Transkrypcja całego genu DMD trwa 16 godzin, wycinanie intronów zaczyna się zanim powstanie pełnej wielkości mRNA.

w intronie 55 i 62 są bardzo słabo aktywne w mięśniach, mogą zawierać sekwencje wiążące represory transkrypcji lub inne czynniki utrudniające polimerazie RNA II transkrypcję tego fragmentu.

Dodatkowe badania wykazały, że wycinanie intronów z pre-mRNA dystrofiny rozpoczyna się zanim jeszcze transkrypcja zostanie zakończona (Ryc. 3). Zjawisko to znane było już u bezkręgowców. Jest to jednak pierwszy przykład kotranskrypcyjnego składania mRNA u kręgowców. Kotranskrypcyjne składanie mRNA wydaje się być skutecznym sposobem zapewniającym precyzyjne łączenie 79 eksonów położonych w dużej fizycznej odległości.

V. Uwagi końcowe

Występowanie izoform białek w wielu tkankach oraz na różnych etapach różnicowania komórkowego, tkankowego i funkcjonalnego jest zjawiskiem powszechnym. Olbrzymia różnorodność izoform powstaje w wyniku alternatywnego składania mRNA, które umożliwia modyfikację struktury białka wraz ze zmianami jakościowymi zachodzącymi w komórce. Izofornie białka mogą być też produktami ekspresji odrębnych genów o podobnej budowie, ale różniących się rodzajem promotora, a więc zdolnych do ekspresji w różnych tkankach. Występowanie w jednym genie kilku promotorów umożliwia wielokrotne wykorzystanie informacji genetycznej, która jest tak modyfikowana, iż powstaje białko zmienione jedynie w części N-terminalnej. Wykorzystanie kilku promotorów oraz wariantów alternatywnego składania zostało opisane dla wielu genów, jednak transkrypcja genu DMD oraz składanie mRNA dystrofiny wydaje się być procesem dużo bardziej złożonym niż w przypadku jakiegokolwiek innego znanego białka.

Złożona struktura genu DMD uniemożliwia jego ekspresję we wczesnej ontogenezie, kiedy komórki dzielą się w czasie krótszym niż wymagany do transkrypcji całego genu. Wiadomo jednak, iż część genu ulega ekspresji już w szybko dzielących się embrionalnych komórkach macierzystych [43]. W tym stadium rozwoju pojawia się tylko mRNA Dp71, który transkrybowany jest ze stosunkowo niedużej części genu DMD. Dopiero później, podczas różnicowania się wyspecjalizowanych typów komórek, zaktywowane zostają promotory położone ponad 2000 kpz przed promotorem G, umożliwiając powstawanie dystrofiny mięśni i mózgu.

Można przyjąć, iż podobne mechanizmy miały miejsce w trakcie ewolucji genu DMD. Pierwotnym, najstarszym produktem u niższych organizmów mogło być białko podobne do Dp71, powstające z genu o typowej wielkości. Później ewolucja tego genu mogła przebiegać w kierunku uzyskiwania nowych eksonów i promotorów, aż osiągnął swoją obecną wielkość i zdolność do kodowania wielu białek o różnej komór-

kowej specyficzności i biologicznych funkcjach.

Artykuł otrzymano 1 września 1997 r.
Zaakceptowano do druku 8 grudnia 1997 r.

Piśmiennictwo

1. Van Ommen GJB, Bertelson C, Ginjaar HB, Den Dunnen JT, Bakker E, Chelly J, Matton M, Van Essen AJ, Bartley J, Kunkel LM, Pearson PL (1987) *Genomics* 1: 329-336
2. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987) *Cell* 50: 509-517
3. Kwiatkowska J, Słomski R (1992) *Post Biochem* 38: 49-55
4. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) *Cell* 51: 919-928
5. Lidov HG W, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM (1990) *Nature (Lond)* 348: 725-729
6. Ahn HA, Kunkel LM (1993) *Nature Genet* 3: 283-291
7. Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8307-8313
8. Ahn HA, Kunkel LM (1995) *J Cell Biol* 128: 363-371
9. Hausmanowa-Petrusewicz I (1993) W: Wydawnictwo Naukowe PWN, Graffstein A (red) *Choroby mięśni*. Warszawa, str. 189-206
10. Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Smith B, Burghes AHM, Tompson MW (1989) *Am J Hum Genet* 45: 507-520
11. Kumar-Singh R, Chamberlain JS (1996) *Hum Mol Genet* 5: 913-921
12. Chelly J, Kaplan JC, Pascal M, Gaytron S, Kahn A (1988) *Nature* 333: 858-860
13. Nudel U, Zuk D, Einat P, Zeelon F, Levy Z, Neuman S, Yaffe D (1989) *Nature (Lond)* 337: 76-78
14. Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1276-1280
15. Górecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ (1992) *Hum Mol Genet* 1: 505-510
16. Nishio H, Takeshima Y, Narita N, Yanagawa H, Suzuki Y, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M (1994) *J Clin Invest* 94: 1037-1042
17. Roberts RG, Bentley DR, Bobrow M (1993) *Hum Mut* 2: 293-299
18. Blake DJ, Tinsley J, Davies KE (1994) *Trends in Cell Biol* 4: 19-23
19. Lederfein D, Yaffe D, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5346-5350
20. Hugnot JP, Gilgenkrantz H, Vincent N, Chafey P, Morris GE, Monaco AP, Berwald-Netter Y, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Chelly J (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7506-7510
21. Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U (1990) *Biochem J* 272: 557-560
22. Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, Dickson G, Edwards YH, Davies KE (1992) *Hum Mol Genet* 1: 103-109
23. Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 1725-1731
24. Feener CA, Koenig M, Kunkel LM (1989) *Nature (Lond)* 338: 509-511
25. Tinsley J, Blake DJ, Davies KE (1993) *Hum Mol Genet* 2: 521-524
26. Byers TJ, Lidov HG W, Kunkel LM (1993) *Nature Genet* 4: 77-81
27. Schofield JN, Blake DJ, Simmons C, Morris GE, Tinsley JM, Davies KE, Edwards YH (1994) *Hum Mol Genet* 3: 1309-1316
28. Lidov HW, Selig S, Kunkel LM (1995) *Hum Mol Genet* 4: 329-335
29. Souza VND, Thi Man N, Morris GE, Karges W,

- Pillers A.M., Ray P.N. (1995) *Hum Mol Genet* **4**: 837-842
30. Holder E., Masato M., Bies R.D. (1996) *Hum Genet* **97**: 232-239
31. Parola A., Koblika B. (1994) *J Biol Chem* **269**: 4497-4505
32. Chelly J., Hamard G., Koulakoff A., Kaplan J.C., Kahn A. (1990) *Nature (Lond)* **344**: 64-65
33. Gilgenkrantz H., Hugnot J.P., Lambert M., Chafey P.A., Kaplan J.C., Kahn A. (1992) *J Biol Chem* **15**: 10823-10830
34. Klamut H.J., Gangopadhyay S.B., Worton R.G., Ray P.N. (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 193-205
35. Minty A., Kedes L. (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 2125-2136
36. Makover A., Zuk D., Breakstone J., Yaffe D., Nudel U. (1991) *Neuromuscul Disord* **1**: 39-45
37. Lederfein D., Yaffe D., Nudel U. (1993) *Hum Mol Genet* **2**: 1883-1888
38. Milasin J., Muntoni F., Severini G.M., Bartoloni L., Vatta M., Krajcinovic M., Mateddu A., Angelini C., Camerini F., Falasch A., Mestroni L., Giacca M. and The Heart Muscle Disease Study Group (1996) *Hum Mol Genet* **5**: 73-79
39. Muntoni F., Antonietta M., Ganau A., Dubowitz V. (1995) *Am J Hum Genet* **56**: 151-157
40. Klamut H.J., Bosnoyan-Colins L.O., Worton R.G., Ray P.N., Davies H.L. (1996) *Hum Mol Genet* **5**: 1599-1606
41. Tennyson C.T., Klamut H.J., Worton R.G. (1995) *Nature Genet* **9**: 184-190
42. Tennyson C.N., Shi Q., Worton G.W. (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 3059-3064
43. Rapaport D., Fuchs O., Nudel U., Yaffe D. (1992) *J Biol Chem* **267**: 21289-21292

Wykorzystanie strategii antysensowych oligonukleotydów w badaniach ekspozycji i lokalizacji rRNA na powierzchni podjednostek rybosomalnych

Utilizing of antisense oligonucleotide strategy in study of exposing and localization of rRNA on surface ribosomal subunits

ANDRZEJ SOBKIEWICZ¹,
TOMASZ TWARDOWSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Ogólny zarys procesu elongacji łańcucha peptydowego na rybosomie
- III. Dostępność rRNA w strukturze rybosomów prokariotycznych
- IV. Dostępność rRNA w strukturze rybosomów eukariotycznych
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- i. Introduction
- ii. General outline of peptide chain elongation cycle on the ribosome
- iii. Exposing of rRNA in the structure of prokariotic ribosome
- iv. Exposing of rRNA in the structure of eucariotic ribosome
- v. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: tRNA — transferowy RNA; rRNA — rybosomalny RNA; mRNA — matrycowy RNA; 70S — rybosomy prokariotyczne o stałej sedymentacji 70S; 80S — rybosomy eukariotyczne o stałej sedymentacji 80S; AA-tRNA — amino-acylo-tRNA; P-tRNA — peptydylo-tRNA; Phe-tRNA^{Phe} — fenyloalanylo-tRNA; AcPhe-tRNA — acetylofenyloalanylo-tRNA; EF-Tu i EF-G — prokariotyczne faktory elongacyjne; EF-1 i EF-2 — eukariotyczne faktory elongacyjne; GTP — guanozynotrifosforan; GDP — guanozynodifosforan; poly(Phe) — polifenylalanina; E_{post} — miejsce E na rybosomie w stanie potranslokacyjnym; A_{pre} — miejsce A na rybosomie w stanie pretranslokacyjnym; P_{post} — miejsce P na rybosomie w stanie

potranslokacyjnym; P_{pre} — miejsce P na rybosomie w stanie pretranslokacyjnym.

I. Wstęp

Rybosom jest kompleksem rybonukleoproteinowym o średnicy ok. 25 nm, na którym zachodzi ostatni etap ekspresji informacji genetycznej zakodowanej w genach. Podczas transkrypcji informacja zawarta w sekwencji nukleotydowej DNA zostaje przepisana na komplementarną do niej sekwencję nukleotydową matrycowego RNA (mRNA). W procesie translacji zachodzącym na rybosomie informacja zawarta w łańcuchu mRNA jest tłumaczona na sekwencję aminokwasową białka. Rybosomy organizmów prokarioty-

¹ Mgr, ² prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: twardow@rose.pozan.edu.pl

Tabela 1.

Skład rybosomów

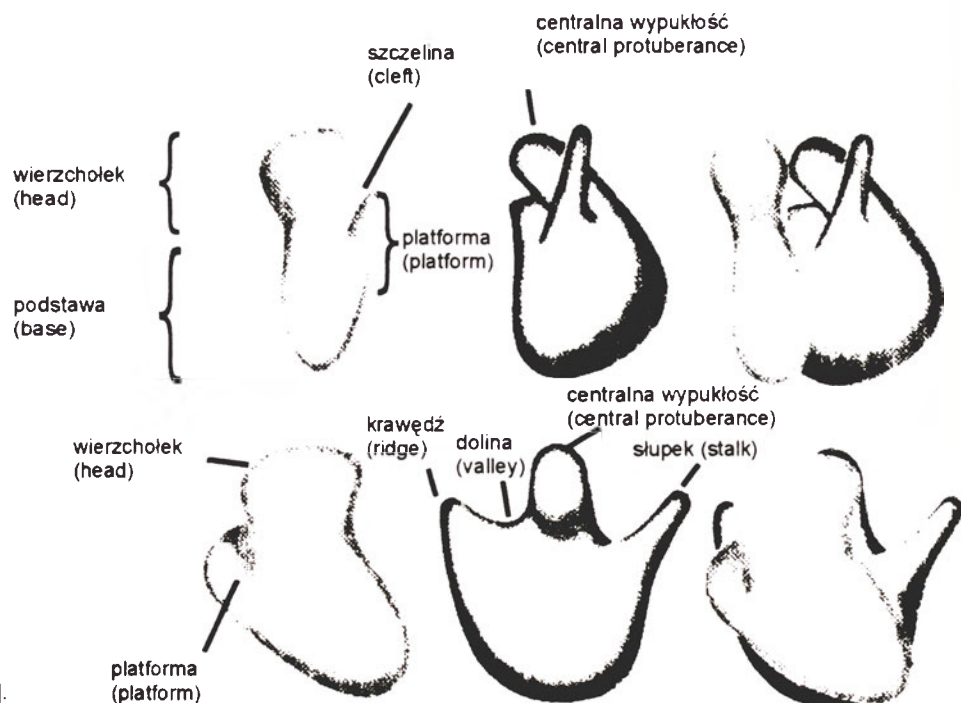
Prokariota			Eukariota		
Rodzaj składnika	Masa cząsteczkowa	Liczba nukleotydów	Rodzaj składnika	Masa cząsteczkowa	Liczba nukleotydów
Rybosom 70S	$2,6 \times 10^6$		Rybosom 80S	$\sim 4,5 \times 10^6$	
Podjednostka 30S rRNA 16S 21 białek (S1—S21)	$0,9 \times 10^6$ $0,55 \times 10^6$	~ 1550	Podjednostka 40S rRNA 18S ok. 32 białka	$\sim 1,5 \times 10^6$ $0,7 \times 10^6$	~ 1900
Podjednostka 50S rRNA 23S rRNA 34 białka (L1—L34)	$1,7 \times 10^6$ $1,1 \times 10^6$ $4,0 \times 10^6$	~ 3200 120	Podjednostka 60S rRNA 28S rRNA 5,8S rRNA 5S ok. 40 białek	$\sim 3,0 \times 10^6$ $\sim 1,7 \times 10^6$ $5,0 \times 10^4$ $4,0 \times 10^4$	~ 4500 158 120

cznych mają stałą sedymentacji 70S, natomiast te znajdujące się w cytoplazmie komórek eukariotycznych są większe — mają stałą sedymentacji 80S. Rybosom składa się z dwóch podjednostek (por. Tab. 1), połączonych ze sobą w sposób odwracalny. Każda z nich zbudowana jest z RNA (rRNA) oraz z białek. Ponad połowę masy rybosomu stanowi RNA. Mniejsza podjednostka bakteryjna 30S składa się z jednej cząsteczki rRNA o stałej sedymentacji 16S oraz 21 różnych białek (podjednostka 40S składa się z jednego rRNA o stałej sedymentacji 18S i ok. 32 białek). Podjednostka 50S zbudowana jest z dwóch cząsteczek rRNA, 23S i 5S oraz z 34 białek (w skład podjednostki 60S wchodzi trzy cząsteczki rRNA 5S, 5,8S, 28S i ok. 40 białek). W tabeli 1 zestawiono białka i kwasy nukleinowe wchodzące w skład rybosomów.

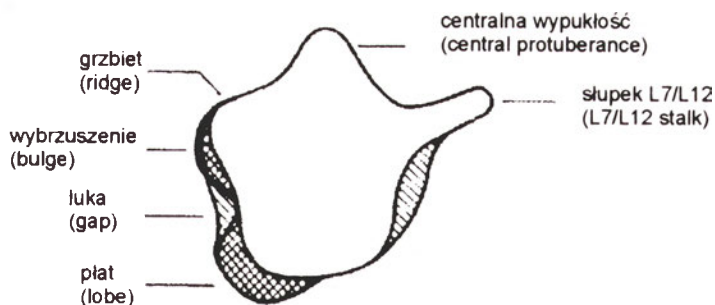
Do 1974 r. rRNA był uważany za szkielet dla białek rybosomalnych [1]. Od tego czasu wzrastała liczba doniesień świadczących o tym, że rRNA jest odpowiedzialna także za funkcje rybosomalne [2, 3].

Funkcjonalnie ważne fragmenty rybosomalnych kwasów nukleinowych są najczęściej zachowawcze, jednoniciowe i eksponowane na powierzchni podjednostki. W pracy tej przedstawiamy wyniki badań, w których wykorzystuje się strategię antysensowych oligonukleotydów w analizie ekspozycji, funkcji i lokalizacji fragmentów rRNA na powierzchni podjednostek rybosomalnych.

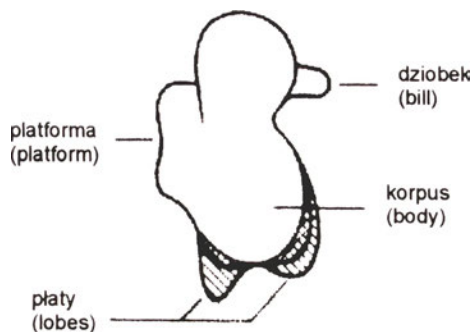
Obecnie istnieje zgodność badaczy na temat ogólnej struktury i morfologii rybosomu *E. coli*. Model pokazany na rycinie 1 jest powszechnie akceptowany [4]. Mała podjednostka 30S składa się z dwóch nierównych części: wierzchołka (ang. *head*), który stanowi 1/3 całości i podstawy (ang. *base*), (2/3 podjednostki). Duża podjednostka, podobnie jak mała, jest asymetryczna. Składa się ona z centralnej wypukłości (ang. *central protuberance*) i dwóch nierównych odstających części, nachylonych do centralnej wypukłości pod kątem ok. 50°. Jedną z nich stanowi tzw. „słupek” (ang. *stalk*) składający się z kompleksu białek L7/L12.

Ryc. 1. Morfologia rybosomu z *E. coli* [4].

a)



b)



Ryc. 2. Porównanie kształtu (a) dużej i (b) małej eukariotycznej podjednostki rybosomalnej z podjednostkami rybosomalnymi bakterii siarkowych, eubakteryjnymi i archebakteryjnymi [42].

⊗ Cechy podjednostek rybosomalnych bakterii siarkowych nieobecne w podjednostkach eubakteryjnych i archebakteryjnych

⊠ Cechy podjednostek eukariotycznych nieobecne w podjednostkach archebakteryjnych i eubakteryjnych.

Za pomocą mikroskopu elektronowego określono morfologię rybosomów eukariotycznych [42]. Kształt i opis podstawowych elementów struktury eukariotycznych podjednostek rybosomalnych w porównaniu z wyglądem podjednostek eubakteryjnych, archebakteryjnych i bakterii siarkowych przedstawiono na rycinie 2.

II. Ogólny zarys procesu elongacji łańcucha peptydowego na rybosomie

Efektywność i precyzja cyklu biosyntezy białka jest wynikiem prawidłowego współdziałania pomiędzy cząsteczkami różniącymi się nie tylko wielkością, ale i właściwościami fizykochemicznymi (kwasy nukleinowe różnego typu jak rRNA, mRNA, tRNA oraz białka: rybosomalne i czynniki elongacyjne, jak również związki niskocząsteczkowe: aminokwasy, nukleotydy, jony nieorganiczne). Na rybosomie, w trakcie elongacji łańcucha peptydowego mają miejsce zasadnicze procesy: (1) rozpoznanie mRNA — tRNA poprzez oddziaływanie kodon-anty kodon, (2) tworzenie wiązania peptydowego, (3) przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu. Siła parowania trzech zasad jest bardzo mała i dlatego bez skomplikowanej struktury rybosomu dokładność odczytu matrycy byłaby bardzo niska. Można spekulować, że dokładność odczytu zwiększyłaby się poprzez parowanie większej liczby zasad, ale spowodowałoby to jednocześnie zmniejszenie szybkości odczytu. Rozwiązanie problemu szybkości i dokładności odczytu na rybosomie *in vivo* nie jest w pełni wyjaśnione, jest natomiast przedmiotem licznych prac eksperymentalnych jak i spekulacji [5, 6, 40 i prace tam cytowane].

Ponad trzydzieści lat temu Watson i Crick zaproponowali mechanizm biosyntezy peptydu na rybosomie postulujący istnienie dwóch miejsc: A — do

którego przyłącza się kolejny AA-tRNA oraz P — w którym zlokalizowany jest P-tRNA [6].

Zgodnie z tym modelem przyjmujemy, że związanie kolejnego AA-tRNA uwalnia deacylowany tRNA, natomiast na rybosomie stale znajduje się peptydylotRNA. W tym modelu nie jest zdefiniowana w sposób jednoznaczny liczba tRNA obecnych jednocześnie na rybosomie.

Obecnie dyskutowane są modele, w których postuluje się większą liczbę miejsc aktywnych na rybosomie i bardziej złożone mechanizmy translacji, w celu wyjaśnienia precyzji i szybkości biosyntezy białka.

Zgodnie z allosterycznym trójmiejscowym modelem cyklu elongacyjnego (przedstawionym schematycznie na rycinie 3) na rybosomie znajdują się zawsze dwie cząsteczki tRNA [5]:

1) w stanie pretranslokacyjnym

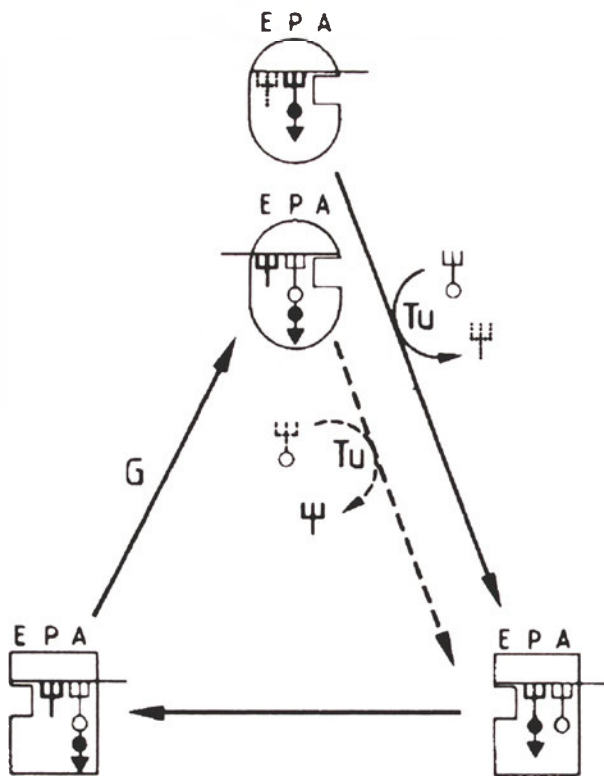
■ tRNA nosący aminokwas (AA-tRNA) w funkcjonalnym miejscu A i tRNA z tworzonym łańcuchem peptydowym (P-tRNA) w miejscu P.

2) w stanie potranslokacyjnym

■ P-tRNA w miejscu P i deacylowany (wolny) tRNA w miejscu E.

Główną cechą modelu trójmiejscowego jest wzajemne allosteryczne połączenie pomiędzy miejscami A i E na rybosomie. Jeżeli miejsce A jest obsadzone przez AA-tRNA to miejsce E posiada obniżone powinowactwo do deacylowanego tRNA i odwrotnie deacylowany tRNA w miejscu E powoduje zmniejszone powinowactwo AA-tRNA do miejsca A. Zgodnie z podręcznikową definicją terminu allosterii zmiana struktury cząsteczki (w tym przypadku fragmentu rybosomu) powoduje zmianę powinowactwa do ligandu, czyli transferowanego RNA.

Stany pre- i potranslokacyjny rybosomu oddzielone są barierą energetyczną (ok. 90kJ/mol). Czynniki elongacyjne (w układzie prokariotycznym EF-Tu i EF-G,



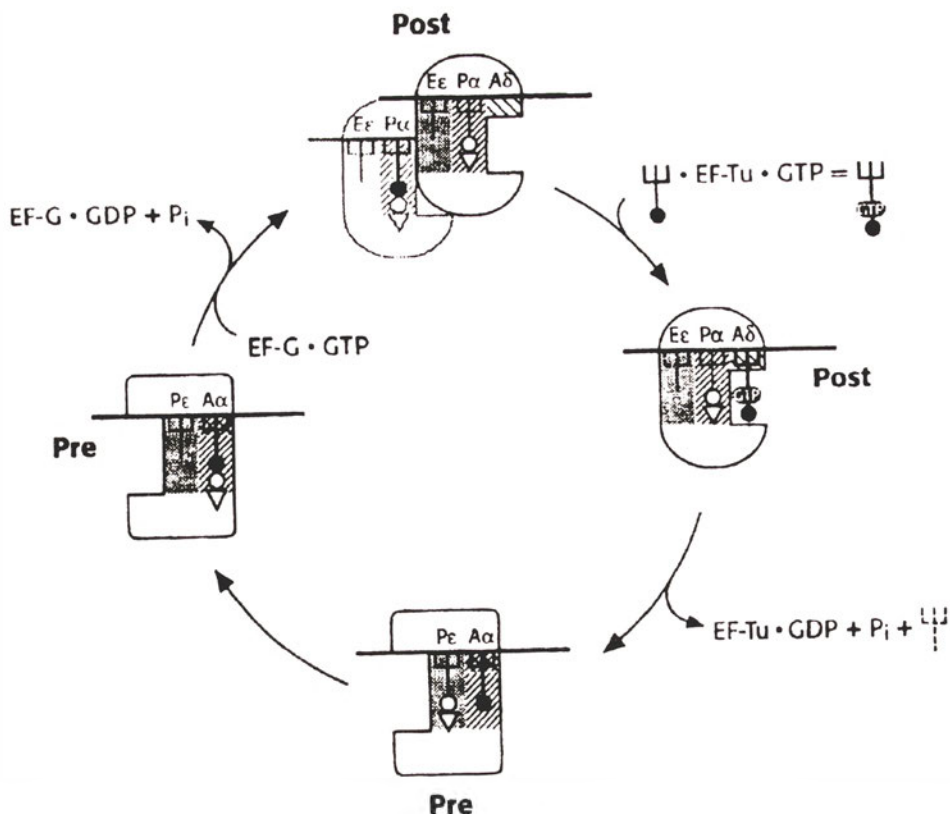
Ryc. 3. Allosteryczny trójmiejskowy model cyklu elongacyjnego biosyntezy białka

- deacylowany-tRNA
- aminoacylo-tRNA
- peptydylo-tRNA
- G, Tu faktory elongacyjne
- A miejsce A
- E miejsce E
- P miejsce P

a w eukariotycznym EF-1 α i EF-2) obniżając tę energię przyspieszają proces translacji. Czynniki spełniają też inną funkcję: określają kierunek reakcji. Czynniki elongacyjny EF-G (lub EF-2) przekształca stan pretranslokacyjny w potranslokacyjny, natomiast EF-Tu (lub EF-1 α) potranslokacyjny w pretranslokacyjny [5]. Czynniki elongacyjne są klasycznymi „białkami G” wiążącymi GTP, o właściwościach GTP-azowych. Konformacja białka G, do którego przyłączony jest GTP, pozwala mu przyłączyć się do innej makrocząsteczki lub większego kompleksu, katalizując reakcję w określonym kierunku. Po wykonaniu tej funkcji następuje hydroliza GTP do GDP i zmiana konformacji białka G, a w konsekwencji oddysocjuje od makrocząsteczki lub kompleksu. W przypadku czynników elongacyjnych kompleksem tym jest rybosom. Czynniki EF-G (lub EF-2), który przeprowadza rybosom w stan potranslokacyjny, charakteryzujący się wyższym powinowactwem do GTP niż do GDP. Dlatego po hydrolizie GTP do GDP i oddysocjowaniu kompleksu dwuskładnikowego EF-G*GDP (lub EF-2*GDP) od rybosomu, następuje spontaniczna zamiana GDP na GTP. Inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku EF-Tu. Kompleks dwuskładnikowy EF-Tu*GTP nie wiąże się do rybosomu. Czynniki EF-Tu dostarcza AA-tRNA do miejsca A na rybosomie. Analiza struktury kompleksu trójskładnikowego

wskazuje, że czynnik związany jest z AA-tRNA w pewnej odległości od miejsca oddziaływania z antykodemem. Na podstawie tej obserwacji można przypuszczać, że w procesie rozpoznania czynnik ten nie jest zaangażowany. O prawidłowym odczycie matrycy decyduje oddziaływanie kodonu (mRNA) z antykodemem (tRNA) poprzez parowanie pomiędzy zasadami kodonu i antykodonu (typu Watsona-Cricka). Po rozpoznaniu następuje związanie kompleksu z rybosomem, a następnie hydroliza GTP. W konsekwencji zachodzi oddysocjowanie kompleksu dwuskładnikowego EF-Tu*GDP, pozostawia rybosom w stanie pretranslokacyjnym, z AA-tRNA przyłączonym w miejscu A. W odróżnieniu od EF-G, powinowactwo zarówno GTP jak i GDP do EF-Tu jest duże. Spontaniczna zamiana tych nukleotydów nie jest zatem możliwa. Obniżenie powinowactwa tych nukleotydów do czynnika EF-Tu zależy od czynnika EF-Ts. Tworzy on z EF-Tu tetramer: EF-Tu(EF-Ts)₂EF-Tu, którego struktura krystaliczna została rozwiązana przez Kawashimę [7]. Sekwencja treonina-kwas asparaginowy-fenylalanina-walina występuje we wszystkich czynnikach EF-Ts. Jej funkcja polega na obniżaniu powinowactwa nukleotydów (GTP, GDP) do czynnika. Równowaga przesunięta jest w kierunku tworzenia kompleksu EF-Tu*GTP, będącego substratem dla kompleksu trójskładnikowego z AA-tRNA (AA-tRNA*EF-Tu*GTP), który bierze udział w kolejnym cyklu translacji.

W badaniach polegających na określeniu charakteru oddziaływań tRNA z rybosomem w miejscu A, P i E [8, 40, 41], uzyskano wyniki, które dają nowe światło na mechanizm cyklu elongacji biosyntezy białka. Wykonano syntezę cząsteczek tRNA zawierających statystycznie rozmieszczone siarkowane grupy fosforowe przy każdym nukleotydzie A, G, C i U. Z wykorzystaniem tak modyfikowanych tRNA prowadzono syntezę polifenylalaniny. Po otrzymaniu funkcjonalnych kompleksów rybosomalnych stanu pre- i potranslokacyjnego trawiono je jodem (I₂). Niechronione, siarkowane grupy fosforowe były przecinane. Zaobserwowano całkowicie odmienny charakter oddziaływań Ac-Phe-tRNA z rybosomem w miejscu A i deacylowanego tRNA w miejscu P. Stwierdzono, że tRNA w miejscu E (ang. *exit* — wyjście) w stanie potranslokacyjnym (E_{post}) oddziałuje z rybosomem w podobny sposób jak peptydylo-tRNA (P-tRNA) z miejscem P w stanie pretranslokacyjnym (P_{pre}). Natomiast P-tRNA zlokalizowany w miejscu P, w stanie potranslokacyjnym (P_{post}) oddziałuje podobnie jak aminoacylo-tRNA (AA-tRNA) z miejscem A w stanie pretranslokacyjnym (A_{pre}) [8]. Istnieją zatem dwie ruchome domeny. Domena rybosomu, z którą oddziałuje AA-tRNA w miejscu A w stanie pretranslokacyjnym została nazwana „domeną α ”. Domena rybosomu, z którą oddziałuje deacylowany tRNA w miejscu E w stanie potranslokacyjnym została nazwana „domeną ϵ ”. W regionie P w stanie pretrans-



Ryc. 4. Model α — ϵ cyklu elongacji procesu biosyntezy białka [40, 41]

- aminoacylo tRNA
- deacylowany tRNA
- peptydylo tRNA
- EF-G, EF-Tu—prokariotyczne faktory elongacyjne
- P_i — reszta fosforanowa
- GTP — guanozynotrzyfosforan
- GDP — guanozynodwufosforan
- Post — stan potranslokacyjny
- Pre — stan pretranslokacyjny

lokacyjnym znajduje się domena ϵ , natomiast w stanie potranslokacyjnym domena α . Miejsca A, P i E są raczej regionami, w których w zależności od stanu translokacyjnego pojawiają się domeny α i ϵ . Do programowanych rybosomów mogą przyłączyć się maksymalnie trzy cząsteczki tRNA [9]. Zatem na rybosomie znajdują się trzy miejsca wiązania tRNA: dwa o wysokim powinowactwie (α i ϵ , odpowiednio w regionie P i E) oraz trzecie o niskim („miejsce δ ” w regionie A). Miejsce δ w regionie A może być nazwane centrum rozpoznania (ang. *decoding centre*). Na rybosomie w stanie potranslokacyjnym następuje w nim odczyt matrycy, czyli oddziaływanie kodonu (mRNA) z antykodonem (rRNA). Schemat ten przedstawiony jest w sposób ideowy na rycinie 4 [wg Nierhauusa (32, 33)].

III. Dostępność rRNA w strukturze rybosomów prokariotycznych

Właściwości katalityczne cząsteczek RNA zostały zaobserwowane po raz pierwszy w 1982 r. przez Cecha i w s.p. którzy wykazali, że intron genu 26S rRNA *Tetrahymena thermophila* samodzielnie wycina się z pre-rRNA po przyjęciu aktywnej konformacji [10]. W 1983 r. wykazano, że aktywnym, katalitycznym składnikiem RNazy P jest RNA [11]. W następnych latach wiedza na temat katalitycznej aktywności RNA szybko się zwiększała. Dziś znanych jest już kilka odrębnych klas enzymów rybonukleinowych — rybozymów. Domeny katalityczne większości tych RNA tworzą strukturę przypominającą główkę młotka (ang. *hammerhead ribozyme*). Od kilku lat uważa się, że

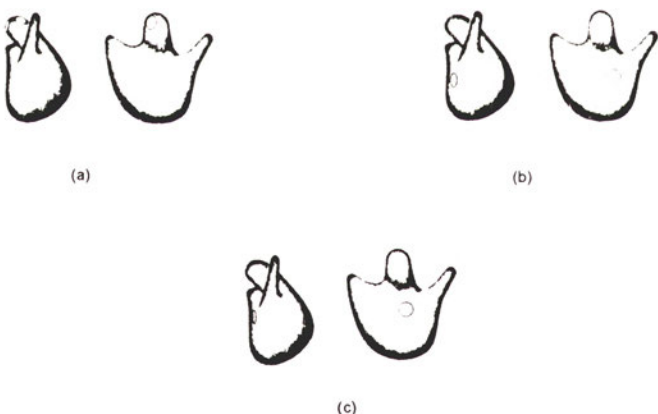
właściwości katalityczne mogą mieć także cząsteczki RNA wchodzące w skład rybosomów.

Wzrastające zainteresowanie rybosomalnymi kwasami rybonukleinowymi zaowocowało zsekwencjonowaniem ponad 6000 rRNA klasy 16/18S [12], ok. 430 klasy 26/28S rRNA [13] i ok. 1660 klasy 5S [43]. Na podstawie wyników przeprowadzonej analizy komputerowej tych sekwencji wskazuje się, że pewne fragmenty są zachowawcze. Można sądzić, że sekwencje te są szczególnie ważne, najprawdopodobniej mają istotne znaczenie funkcjonalne. Najczęściej stanowią one część centrum aktywnego na rybosomie lub bezpośrednio oddziałują z innymi ligandami biorącymi udział w biosyntezie białka. Te elementy strukturalne są nie tylko zachowawcze, ale także jednocicowe i eksponowane na powierzchni podjednostki [14]. Można przypuszczać, że rybosomy, które posiadają mutacje w obrębie tych fragmentów nie są zdolne do prowadzenia biosyntezy białka. Dostępność tych funkcjonalnie ważnych fragmentów rRNA w strukturze rybosomu była badana m.in. przez W.E. Hilla i w s.p. za pomocą antysensowych oligonukleotydów [15]. Strategia antysensowa polega na oddziaływaniu ze sobą dwóch komplementarnych, przeciwbieżnych nici kwasu nukleinowego: nici kodującej jakąś informację lub — bardziej ogólne — „nici funkcjonalnej” oraz krótkiego fragmentu syntetycznego, o długości 6-30 nukleotydów, komplementarnej do fragmentu strukturalnego o szczególnym znaczeniu, np. w regionie inicjatorowym mRNA. Ten krótki oligonukleotyd określony jako antysensowy DNA (aDNA) hybrydując do nici funkcjonalnej, blokuje funkcjonowanie długiej cząsteczki kwasu nukleinowego powodując

zatrzymanie jakiegoś procesu, np. translacji.

Do swych badań grupa Hilla wykorzystała oligonukleotydy składające się w większości z sześciu nukleotydów, gdyż krótsze sondy nie tworzyły trwałych dupleksów, natomiast dłuższe nie oddziaływały specyficznie z rRNA.

Funkcjonalne i eksponowane w strukturze rybosomu fragmenty rRNA są prawdopodobnie narażone na działanie RNaz. Muszą być zatem w jakiś sposób chronione przed ich działaniem poprzez oddziaływanie z białkiem lub fragmentem rRNA. Średnica większości molekuł RNaz wynosi ok. 2,5 nm. Być może rybosomalny RNA jest w ograniczonym stopniu eksponowany na powierzchni podjednostki, tak aby umożliwić oddziaływanie z ligandami biorącymi udział w biosyntezie (tRNA, mRNA), a jednocześnie uniemożliwić kontakt z RNazami. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych przez Hilla i w s.p. wskazują na słusność takiej koncepcji. Na powierzchni podjednostek rybosomalnych dostępne dla antysensowych oligonukleotydów są bowiem tylko bardzo krótkie fragmenty rRNA. Ich wielkość wynosi od 5 do 10 nukleotydów. Według tych badaczy fragment 1542-1537 dużego rybosomalnego RNA (L-rRNA) rybosomu prokariotycznego jest w całości dostępny dla oligonukleotydów. Region ten zawiera sekwencję anty-Shine-Dalegarno. Do pewnego stopnia dostępny jest także region zawierający zasady 1492-1507 L-rRNA. Należy zaznaczyć, że poziom hybrydyzacji zależy od



Ryc. 5. Lokalizacja wybranych fragmentów rRNA na powierzchni dużej jednostki rybosomalnej 50S (podjednostkę przedstawiono w dwóch rzutach obróconych względem siebie o 90°)

a) ○ — lokalizacja nukleotydów A39 i U40 5S rRNA; ○ — końca 3' 5S rRNA.

b) ○ — lokalizacja domeny α-sarcyny.

c) ○ — lokalizacja regionu transferazy peptydylowej.

Zaobserwowano stosunkowo wysoki poziom hybrydyzacji oligonukleotydów komplementarnych do fragmentu 801-811 w 23S rRNA. Odcinek trójnukleotydowy od 807 do 809 tego fragmentu najprawdopodobniej oddziałuje z końcem 3' tRNA [16]. Wykazano za pomocą techniki wiązania krzyżowego, że fragment rRNA znajduje się w bliskim sąsiedztwie centralnej domeny V 23S rRNA. Stanowi ona region transferazy peptydylowej, czyli centrum katalitycznego odpowiedzialnego za syntezę wiązania peptydowego. Lokalizacja tego fragmentu rRNA w strukturze rybosomu przedstawiona jest na rycinie 5 (wg prac zespołu Brimacombe, [17]).

sposobu otrzymania podjednostek; oznacza to, że mają one różne konformacje. Najprawdopodobniej wspomniany region bierze udział w oddziaływaniu rybosomu z kompleksem faktora inicjatorowego IF-3 z mRNA. Region 1393-1407 L-rRNA, to tzw. *decoding region* — region dekodujący, jest najdłuższym konserwatywnym, jednoniciowym regionem 16 S rRNA. Wyniki hybrydyzacji wskazują, że tylko fragment 1398-1403 jest dostępny dla oligonukleotydów. Komplex mRNA-Phe-tRNA^{Phe} współzawodniczy ze wspomnianymi oligonukleotydami o wiązanie do tego fragmentu rRNA. [17, 20]

Domena alfa sarcyny to bardzo specyficzny i charakterystyczny element strukturalny rybosomu. Jest to zachowawczy fragment 23S rRNA od nukleotydu 2654 do 2667, znajdujący się w domenie V dużej cząsteczki kwasu rybosomalnego. Fragment ten jest dostępny dla toksyny α-sarcyny, która przecina 23S rRNA za guanozyną w pozycji 2661 [G2661] [18]. Możliwa jest hybrydyzacja oligonukleotydów różnej długości o sekwencji komplementarnej do tej domeny, co powoduje jej osłonięcie przed atakiem hydrolytycznym tej rybonukleazy. Natomiast nie zaobserwowano inhibicji aktywności rybosomów po hybrydyzacji tych oligonukleotydów, co autorzy interpretują zmianami konformacyjnymi tej domeny w czasie cyklu elongacji biosyntezy białka [19].

5S rRNA jest najmniejszym kwasem rRNA rybosomu. Znajduje się w centralnej wypukłości dużej podjednostki rybosomalnej. Za pomocą mikroskopii elektronowej połączonej z metodami immunologicznymi zlokalizowano nukleotydy A₃₉ i U₄₀ tego kwasu na powierzchni centralnej wypukłości po stronie podjednostki 30S [21], natomiast jego koniec 3' po cytoplazmatycznej stronie podjednostki [22] (por. Ryc. 5). Z danych literaturowych wynika, że w strukturze rybosomu 70S pewne nukleotydy 5S rRNA są dostępne dla chemicznej modyfikacji. W przeprowadzonych przez nas eksperymentach uzyskaliśmy wyniki, które wskazują, że w układzie prokariotycznym jeśli ma miejsce hipotetyczne oddziaływanie pętli TΨCG cząsteczki tRNA z fragmentem CGGA pętli „C” cząsteczki 5S rRNA — to nie jest ono zasadnicze dla procesu translacji [23-25 i dane własne].

Hybrydyzacja DNA w połączeniu z mikroskopią elektronową jest użyteczną metodą lokalizacji fragmentów rRNA [27, 28, 31, 32]. Syntetyczne oligonukleotydy z przyłączoną biotyną hybrydują do komplementarnych fragmentów rRNA, a następnie mogą być zlokalizowane za pomocą mikroskopii elektronowej. Zlokalizowano w ten sposób fragmenty stanowiące rybosomalne miejsce P. (por. Ryc. 6).

IV. Dostępność rRNA w strukturze rybosomów eukariotycznych

W odróżnieniu od danych dla rybosomów prokariotycznych informacje dotyczące struktury i funkcji



Fragment 518-533



Fragment 1492-1505



Fragment 787-803



Fragment 1392-1407



Fragment 686-703



Fragment 714-733



Fragment 1534-1542

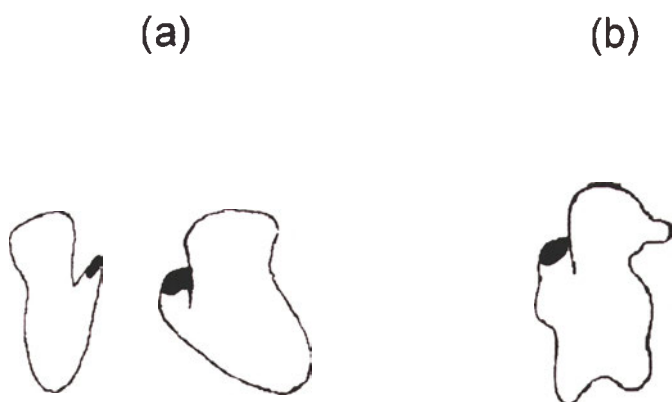
Ryc. 6. Lokalizacja fragmentów 16S rRNA (zaciemnione elementy) w strukturze małej podjednostki rybosomów z *E. coli*.

Na rysunku przedstawiono dwa rzuty małej podjednostki w celu zobrazowania przestrzennej lokalizacji fragmentów 16S rRNA.

rybosomalnych kwasów nukleinowych rybosomów eukariotycznych są znacznie bardziej ograniczone i mniej jednoznaczne. W tabeli 1 podano, że w skład rybosomów eukariotycznych wchodzi cztery kwasy rybonukleinowe 5S rRNA, 5,8S rRNA, 18S rRNA i 26-28S rRNA. Wykorzystując strategię antysensowych oligonukleotydów wskazano, że zachowawczy fragment 18S rRNA *S. cerevisiae* odpowiadający fragmentowi 1392-1407 16S rRNA z *E. coli* został zlokalizowany w tym samym obszarze na powierzchni małej podjednostki rybosomalnej co wspomniany fragment

16S rRNA z *E. coli*, tzn. na wysokości „karku”, obok „szczeliny” tejże podjednostki (Ryc. 7) [27]. Zachowawczość struktury i lokalizacji tego fragmentu rybosomalnego kwasu nukleinowego małej podjednostki sugeruje jego funkcjonalne znaczenie w strukturze rybosomu.

Jeśli chodzi o 5,8S rRNA to wykazano, że pewne jego fragmenty mogą być eksponowane na powierzchni podjednostki i być może są zaangażowane w procesie biosyntezy białka. Wykazano także, że oligonukleotyd o sekwencji komplementarnej do fragmentu



Ryc. 7. a) Lokalizacja 3' końca 16S rRNA (zaciemniony obszar) w strukturze małej podjednostki rybosomów *E. coli*; b) Lokalizacja 3' końca 18S rRNA (zaciemniony obszar) w strukturze małej podjednostki rybosomów z zarodków pszenicy [33].

103-114 5,8S rRNA z zarodków pszenicy hamuje biosyntezę białka do poziomu około 55%, co wskazuje, że w trakcie biosyntezy białka ten fragment rRNA jest eksponowany na powierzchni podjednostki [34].

Zarówno w układzie prokariotycznym, jak i eukariotycznym translokacja katalizowana przez czynnik elongacyjny EF-2 jest hamowana przez toksynę α -sarcyny, która przecina specyficznie 28S rRNA *Xenopus* za guaninę w pozycji 3733 [G3733]. Biosyntezę białka hamują również oligonukleotydy o sekwencji komplementarnej do domeny α -sarcyny (tzn. do fragmentu 3719-3744 w 28S rRNA u *Xenopus* (eukariota). Najwyższy efekt inhibitorowy wykazuje oligonukleotyd całkowicie zakrywający pętlę tej domeny [35].

Tabela 2.

Poziom hybrydyzacji a-DNA komplementarnych do domeny α -sarcyny

Fragmety 28S rRNA w strukturze domeny α -sarcyny, do których hybrydyzowano a-DNA	Hybrydyzacja %
3024—3039	47
3024—3038	37
3024—3037	15

Efekt inhibitorowy oligonukleotydów komplementarnych do domeny α -sarcyny wykazaliśmy również w naszych pracach przeprowadzonych z rybosomami

Tabela 3.

Poziom hybrydyzacji a-DNA komplementarnych do pętli „C” 5S rRNA i ich wpływ na aktywność rybosomów

Fragmety 5S rRNA do których hybrydyzowano a-DNA	Hybrydyzacja (%)	Inhibicja wiązania Phe-tRNA do rybosomu (%)	Inhibicja syntezy poly(Phe) (%)
37—46	30	30	60
38—46	37	39	68
37—45	42	44	75
38—45	60	50	88

z łubinu żółtego (*Lupinus luteus*). Spośród kilkudziesięciu testowanych przez nas oligonukleotydów (10-16 mery) komplementarnych do domeny α -sarcyny w strukturze rybosomów z łubinu, najwyższy poziom hybrydyzacji wykazywały sondy komplementarne do końca 3' tej domeny. Poziom inibicji procesu wiązania Phe-tRNA do rybosomu był proporcjonalny do poziomu hybrydyzacji tych oligonukleotydów [36, 37].

Spośród kilku oligonukleotydów (8-10 mery) o sekwencji komplementarnej do różnych jednoniciowych fragmentów 5S rRNA najwyższy poziom hybrydyzacji do rRNA w strukturze rybosomów z łubinu żółtego (*Lupinus luteus*), a w konsekwencji najwyższą inibicję procesu wiązania Phe-tRNA do rybosomu i polimeryzacji poly[Phe] wykazywały sondy komplementarne do pętli „C” tej cząsteczki. Najwyższą wartość hybrydyzacji obserwowaliśmy w przypadku 8-meru (60% hybrydyzacji), a najmniejszą w przypadku 10-meru (30% hybrydyzacji) [38] (por. Tab. 3).

W stanie pre- i potranslokacyjnym rybosomu — dwóch zasadniczych formach konformacyjnych rybosomu w trakcie biosyntezy łańcucha polipeptydowego — dostępność pętli „C” 5S rRNA jest zróżnicowana. Wykonaliśmy enzymatyczną konwersję rybosomu (stosując oczyszczone czynniki EF-1 i EF-2) do stanu pre- i potranslokacyjnego. Poziom hybrydyzacji oligonukleotydu komplementarnego do pętli „C” 5S rRNA w strukturze rybosomu w stanie pre- i potranslokacyjnym wynosił odpowiednio 73 i 17%. 5-krotna różnica świadczy o bardzo znacznej zmianie konformacji tego fragmentu struktury 5S rRNA w trakcie procesu biosyntezy białka [39].

V. Uwagi końcowe

Jedyną znaną funkcją rybosomów wszystkich żywych organizmów jest biosynteza białka. Na rybosomach dochodzi do rozpoznania mRNA-tRNA poprzez oddziaływanie kodon-antykodon, utworzenia kolejnego wiązania peptydowego, przesunięcia tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu. Ten skomplikowany, wieloetapowy proces jest koordynowany i katalizowany przez złożoną strukturę rybosomu składającą się z białek i kwasów nukleinowych. Oba komponenty są funkcjonalne i aktywne. Wspólne cechy rybosomów

znajdują swe odbicie w podobieństwie strukturalnej organizacji rybosomów. Wszystkie rybosomy składają się z dwóch nierównych podjednostek (Ryc. 1 i 2), które są niezbędne dla przeprowadzenia biosyntezy białka. Różnorodność związana ze źródłem pochodzenia rybosomów nie ma znaczenia dla funkcji tej organelli komórkowej.

Strategia antysensowych oligonukleotydów jest skutecznym narzędziem w celu określenia lokalizacji dostępności i funkcji rRNA w strukturze rybosomów. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskujemy, że zachowawcze fragmenty rRNA są najczęściej eksponowane na powierzchni podjednostek; znajdują się one w funkcjonalnie ważnych obszarach rybosomu — zazwyczaj w szczelinie pomiędzy podjednostkami, a zatem w obszarze, gdzie przebiegają wspomniane etapy biosyntezy białka. Porównanie lokalizacji zachowawczych fragmentów w strukturze rybosomów różnych gatunków wskazuje, że odpowiadające sobie domeny znajdują się w tych samych lub zbliżonych obszarach podjednostek rybosomalnych.

Artykuł otrzymano 6 czerwca 1997 r.

Zaakceptowano do druku 5 stycznia 1998 r.

Piśmiennictwo

- Fellner P (1974) W: Nomura N, Tissieres A, Lengyel P. (red) Ribosomes. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. str. 169-191
- Noller H F, Woese C R (1981) *Science* **212**: 403-411
- Brimacombe R, Döring T, Greuer B, Jünke N, Mitchell P, Müller F, Osswald M, Rinke-Appel J (1993) W: Nierhaus K H, et. al (red) *Stade The Translational Apparatus*. Plenum Press, New York, str. 433-444
- Lake J A (1976) *J Mol Biol* **105**: 131-159
- Nierhaus K H (1990) *Biochemistry* **29**: 4997-5008
- Watson J D (1964) *Bull Soc Chem Biol* **46**: 1399-1425
- Kawashima T, Berthet-Colominas C, Wulff M, Cusack S, Leberman R (1996) *Nature (Lond)* **379**: 511-518
- Dabrowski M, Spahn C M T, Nierhaus K H (1995) *EMBO* **14**, **19**: 4872-4882
- Rheinberger H-J, Sternbach H, Nierhaus K H (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 5310-5314
- Kruger K, Grabowski P J, Zaug A J, Sand J, Gottschling D E, Cech T R (1982) *Cell* **31**: 147-157
- Gerrier-Takada C, Gardiner K J, Marsh T L, Pace N R, Altman S (1983) *Cell* **35**: 849-857
- Van de Peer Y, Jansen J, De Rijk P, De Wachter R (1997) *NAR* **25**: 111-116
- De Rijk P, Van de Peer Y, Wachter R (1997) *NAR* **25**: 117-122
- Woese C R (1980) W: Chambliss G, Chambliss G, Craven G R, Davies J, Davis K, Nomura M (red) Ribosomes. Structure, Function, and Genetics. University Park Press, Baltimore, str. 357-737
- Hill W E, Weller J, Gluick T, Merryman C, Marconi R T, Tassanakajohn A, Tapprich W E (1990) W: Hill W E, Moore P B, Dahlberg A, Schlessinger D, R A, Warber J R (red.) Ribosome structure and function. American Society for Microbiology Washington DC str 253-261
- Barta A, Steiner G, Brosius J, Noller H F, Kuechler E (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3607-3611
- Stiege W, Glotz C, Brimacombe R (1983) *NAR* **11**: 1687-1706
- Endo Y, Wool I G (1982) *J Biol Chem* **257**: 9054-9060
- Meyer H A, Triana-Alonso F, Spahn C M, Twardowski T, Sobkiewicz A, Nierhaus K H (1996) *NAR* **24**: 3996-4002
- Cooperman B S, Weitzmann C J, Fernandes C L (1990) W: Hill, W. E., et al. The Ribosome: Structure, Function, and Evolution, American Society of Microbiology, Washington, str 491
- Evstafieva A G, Shatsky I N, Bogdanov A A, Vasiliev V D (1985) *FEBS Lett* **185**: 57-62
- Shatsky I N, Evstafieva A G, Bogdanov A A, Vasiliev V D (1980) *FEBS Lett* **121**: 97-100
- Delihans N, Dunn J, Erdmann V A (1975) *FEBS Lett* **58**: 76
- Horne J R, Erdmann V A (1972) *Mol Gen Genet* **119**: 337
- Lorenz S, Hartmann R K, Piel N, Ulbrich N, Erdmann V A (1987) *Eur J Biochem* **163**: 239-246
- Pace B, Matthews E A, Johnson K D, Cator C R, Pace N R (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 36-40
- Oakes M I, Clark M W, Henderson E, Lake J A (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 275-279
- Oakes M I, Scheinman A, Rivera M, Soufer D, Shankweiler G, Lake J A (1987) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **52**: 675-685
- Scheinman A, Shankweiler G W, Lake J A (1988) *Abstr Cold Spring Harbor Laboratory Symp Ribosome Synthesis*, str 157
- Oakes M I, Lake J A (1990) *J Mol Biol* **211**: 897-906
- Moazed D, Noller H F (1986) *Cell* **47**: 985-994
- Langer J, Lake J A (1986) *J Mol Biol* **187**: 617-621
- Montesano L, Glitz D G (1988) *J Biol Chem* **263**: 4932-4938
- Walker K, Elela S A, Nazar R N (1990) *J Biol Chem* **265**: 2428-2430
- Saxena S K, Ackerman E J (1990) *J Biol Chem* **265**: 3263-3269
- Grzywacz-Bohun E, Twardowski T (1992) *Acta Biochim Polon* **39**: 65-73
- Bohun E, Twardowski T (1994) *J Plant Physiol* **143**: 659-669
- Shaikhin S, Sobkiewicz A, Barciszewski J, Twardowski T (1994) *Acta Biochim Polon* **41**: 57-62
- Sobkiewicz A, Książczak-Kus L, Twardowski T (1996) *J Plant Physiol* **149**: 311-316
- Nierhaus K H (1996) *Nature (Lond)* **379**: 491-492
- Nierhaus K H, Beyer D, Dabrowski M, Schafer M A, Spahn C M T, Bittner J U, Burkhardt N, Diehdrieh G, Junemann R, Kamp D, Voss H, Stührmann H B (1995) *Biochem Cell Biol* **73**: 1001-1021
- Lake A J, E Henderson, M Oakes, M W Clark (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3786-3790
- Korczyńska-Nalaskowska M, Szymański M, Barciszewski J (1992) *Struktura rybosomalnych 5S RNA Eukaryota*, IChB PAN Poznań

Praca finansowana z grantu KBN nr 6 P04B 024 10

WARUNKI PRENUMERATY „POSTĘPÓW BIOCHEMII” W ROKU 1998

Prenumerata roczna	30 zł
Dla członków PTBioch	15 zł
Dla instytucji	60 zł

Małe proteoglikany śródmiąższowe — genetyczne różnice i podobieństwa

Small interstitial proteoglycans — genetic differences and similarities

RAFAŁ BOBIŃSKI¹,
KRYSTYNA OLCZYK²,
EWA KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa białek rdzeniowych
- III. Proteoglikany keratanowe
 - III-1. Lumikan
 - III-2. Fibromodulina
- IV. Proteoglikany chondroityno/dermatanowe
 - IV-1. Dekoryna
 - IV-2. Biglikan
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Core protein structure
- III. Keratan proteoglycans
 - III-1. Lumican
 - III-2. Fibromodulin
- IV. Chondroitin/dermatan proteoglycans
 - IV-1. Decorin
 - IV-2. Biglican
- V. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: PG — proteoglikany; GAG — glikoaminoglikany; MPŚ — małe proteoglikany śródmiąższowe; LM — lumikan; FM — fibromodulina; DE — dekoryna; BI — biglikan; AP1 (ang. *activator protein 1*) — białko aktywatorowe 1; AP2 (ang. *activator protein 2*) — białko aktywatorowe 2; AP3 (ang. *activator protein 3*) — białko aktywatorowe 3; NF- κ B (ang. *nuclear factor of kappa chain B cells*) — czynnik transkrypcyjny łańcuchów kappa limfocytów B; TNF- α (ang. *tumor necrosis factor*) — czynnik martwicy nowotworów; Spl — czynnik transkrypcyjny; IL6 — interleukina 6; TGF- β (ang. *transforming growth factor*) — transformujący czynnik wzrostowy; pz — pary zasad; kpz — tysiąc par zasad.

I. Wstęp

Proteoglikany (PG) są heterogenną grupą glikoprotein, zbudowanych z białka rdzeniowego, do którego przyłączony jest łańcuch lub łańcuchy glikoaminoglikanowe. Glikoaminoglikany (GAG), są — z kolei — liniowymi, nierozgałęzionymi heteropolisacharydami, zbudowanymi z powtarzających się disacharydowych jednostek, złożonych z N-acetylowanej heksozami, związanej wiązaniem glikozydowym z kwasem heksuronowym bądź galaktozą [1, 2]. Obydwa składowe odgrywają ważną rolę w oddziaływaniach tych makromolekuł z otaczającymi je cząsteczkami. Jest to związane z silnie anionowym charakterem glikoaminoglikanów [3], oraz bardzo zróżnicowaną budową

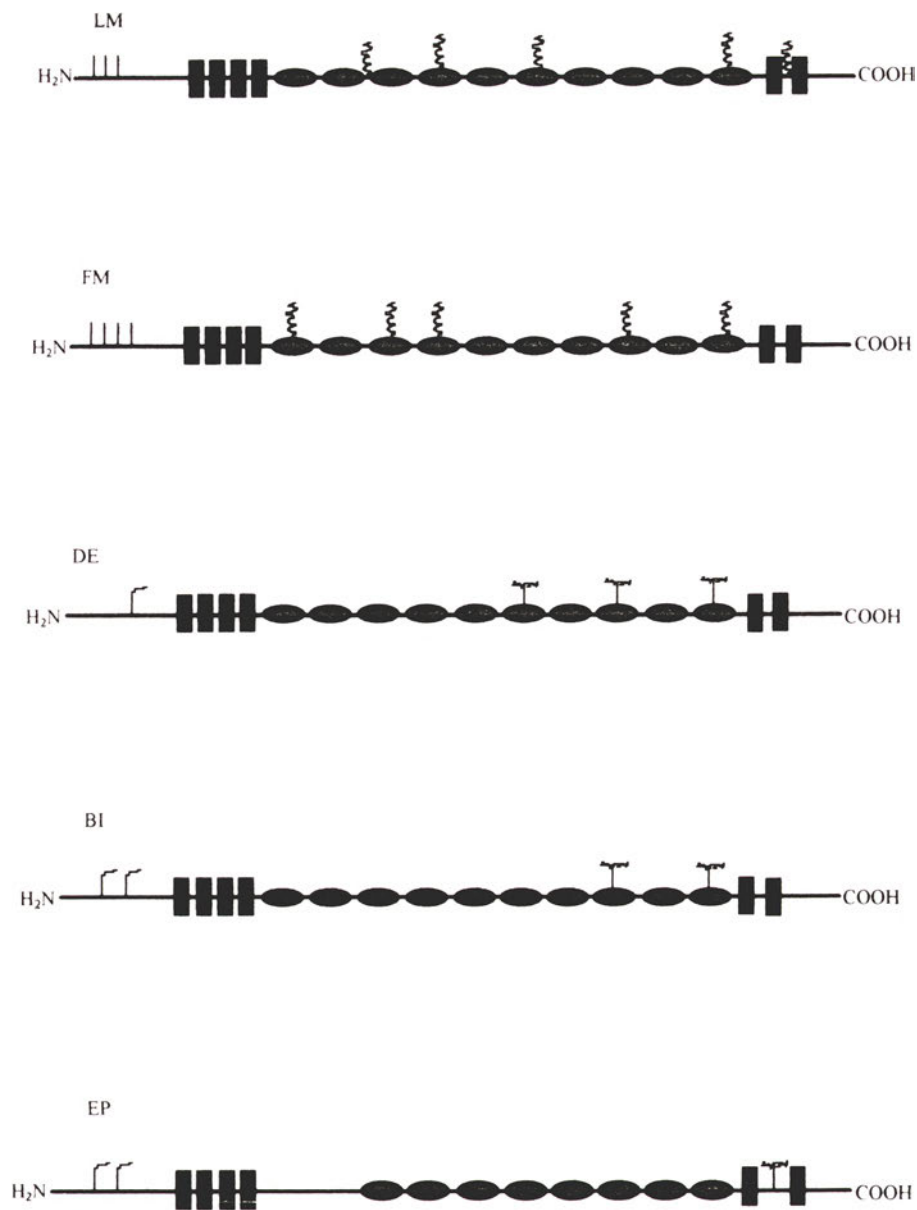
białek rdzeniowych [3, 4]. Dzięki swoim właściwościom, proteoglikany wpływają na organizację macierzy pozakomórkowej. Biorą udział we wzajemnym oddziaływaniu komórek [4-6], a także oddziałują z czynnikami wzrostowymi, regulując tym samym szereg procesów biochemicznych [7-10]. Proteoglikany produkowane są przez wszystkie komórki zwierzęce, z których są albo wydzielane do przestrzeni pozakomórkowej [11-15] albo stanowią integralny element błony komórkowej (tzw. proteoglikany transmembranowe) [16-26].

Małe proteoglikany śródmiąższowe (MPŚ) określane także jako małe proteoglikany bogatoleucylowe, są — mimo genetycznych różnic, blisko spokrewnione strukturalnie [3, 27, 28]. W skład tej grupy wchodzi pięć proteoglikanów: dekoryna, biglikan, fibromodulina, lumikan oraz — najslabiej poznany i scharakteryzowany — epifikan [3]. Związki te podzielono na dwie podgrupy, zależnie od rodzaju przyłączonego łańcucha glikoaminoglikanowego. Do pierwszej z nich należą PG keratanowe, do drugiej, chondroityno/dermatanowe [3].

II. Budowa białek rdzeniowych

Pomimo niewielkich różnic, które będą opisane w kolejnych rozdziałach, białko rdzeniowe MPŚ zbudowane jest bardzo podobnie (Ryc. 1). W jego skład wchodzi 10 regionów bogatych w leucynę [3, 28, 29, 30], z których każdy zawiera 11 aminokwasową sekwencję o dużej konserwatywności rozmieszczenia

¹ Mgr, ² prof., Katedrą i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, ³ mgr, Samodzielna Pracownia Mikrobiologii, Szpital Górniczy, 41-200 Sosnowiec



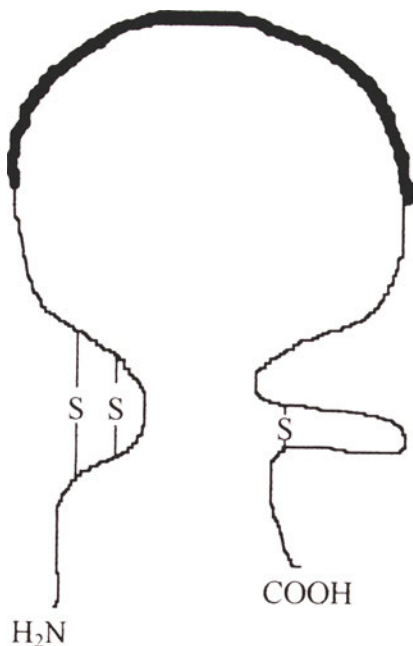
Ryc. 1. Budowa małych proteoglikanów śródmiąższowych. Na rysunku widoczne są obszary bogatoleucylo-
we oraz bogatocysteilowe, a także
miejsca przyłączenia łańcuchów
glikoaminoglikanowych i łań-
cuchów oligosacharydowych.

● - Domena bogatoleucylo-
wa
■ - Domena bogatocysteilowa
┌ - Łańcuch chondroitynu/
dermatano-siarczanowy

T - Łańcuch oligosacharydowy
| - Siarczanowana tyrozyna
~ - Łańcuch keratano-siarczanowy

reszt leucyny. Uszeregowanie reszt aminokwasowych przybiera następującą postać: LXXLXLXXNXL, gdzie L określa leucynę, N jest asparaginą, natomiast X — jest dowolnym aminokwasem [29]. Całość, czyli dziesięć w/w regionów tworzy domenę centralną, która otoczona jest z obu stron obszarami obfitującymi w cysteinę. W sumie jest sześć obszarów bogatocysteilowych, z których cztery znajdują się na końcu aminowym, natomiast dwa na końcu karboksylowym białka rdzeniowego (Ryc. 1). Każdy obszar N-końcowego regionu zbudowany jest z kilkunastu reszt aminokwasowych o następującej sekwencji: $CX_{2-3}CX_{6-8}C$, gdzie C jest cysteiną a X dowolnym aminokwasem, zaś obszary C-końcowego regionu białka rdzeniowego o konserwatywnie rozmieszczonych

resztach cysteiny, składają się z liczącej około 35 aminokwasów sekwencji: $FCX_{15-16}LX_2NX_{12-13}C$, gdzie C jest cysteiną, F — fenyloalaniną, natomiast X — dowolnym aminokwasem [3]. Reszty cysteilowe połączone są ze sobą mostkiem dwusiarczkowym, tworząc charakterystyczną pętlę [3, 31]. Kolejną, wspólną cechą MPŚ jest ułożenie przestrzenne białka rdzeniowego, przypominające kształtem podkowę (Ryc. 2) [3, 34]. Cecha ta wynika z występowania hydrofobowej domeny centralnej, która charakteryzuje się naprzemiennym ułożeniem struktury α -helikalnej i tzw. struktury dywanowej (β -sheet) [3, 32-34]. Od zamieszczonego powyżej opisu struktury białek rdzeniowych odbiega nieco epifikan, którego domena centralna zbudowana jest nie z dziesięciu, lecz z ośmiu



Ryc. 2. Dwuwymiarowy schemat struktury białka rdzeniowego małych proteoglikanów śródmiąższowych. Literą „S” oznaczono mostki dwusiarczkowe. Pogrubioną linią zaznaczono centralną, bogatoleucylową część białka rdzeniowego.

powtórzeń bogatoleucylowych (Ryc. 1). Brak w literaturze informacji na temat struktury genu kodującego białko rdzeniowe dla epifikanu, uniemożliwił bliższą charakterystykę tego proteoglikanu w niniejszej publikacji.

III. Proteoglikany keratanowe

III-1. Lumikan (LM)

Najodpowiedniejszym materiałem do badań nad strukturą i funkcją lumikanu (LM) jest rogówka oka, ponieważ ten PG jest jednym z głównych składników wymienionej tkanki [29, 35, 36, 38]. Lumikan reguluje przezroczystość rogówki, wpływając na średnicę włókien kolagenowych i na odległości pomiędzy nimi [29]. Badania wskazują, iż część białkowa lumikanu hamuje powiększanie się średnicy włókien kolagenowych, natomiast hydrofilowe łańcuchy GAG, ściągając wodę do przestrzeni międzywłókienkowej, przyczyniają się do zachowania odległości między tymi strukturami [29]. Łańcuchy GAG lumikanu mogą istnieć w formie niesiarczanowanej, jednak w miarę dojrzewania molekuly, polilaktozoaminowe łańcuchy boczne domeny centralnej ulegają siarczanowaniu i przekształcają się w łańcuchy keratano-siarczanowe [28]. Stopień siarczanowania łańcuchów glikanowych zależy także od tkanki, w której się on znajduje. Zasadniczo, lumikan istnieje w dwóch formach, uwzględniających jego umiejscowienie. Pierwsza z wymienionych form jest formą bogatosiarczanowaną i znajduje się w rogówce, natomiast druga, ubogosiarczanowana, występuje w pozostałych tkankach [30].

Domena centralna białka rdzeniowego LM posiada cztery reszty asparaginy wiążące łańcuchy siarczanu

keratanu (KS) wiązaniem N-glikozydowym, w pozycji 91, 130, 164, 257 białka rdzeniowego [35]. Piąty łańcuch KS wiązany jest przez asparaginę poza obszarem centralnym, w pozycji 320 [35]. Charakterystyczną cechą bieguna aminowego jest obecność ujemnie naładowanej strefy, bogatej w reszty siarczanowanej tyrozyny, dzięki którym LM może oddziaływać z dodatnio naładowanymi cząsteczkami macierzy pozakomórkowej oraz białkami powierzchniowymi komórek (Ryc. 1) [3].

Stosując technikę hybrydyzacji *in situ*, z wykorzystaniem znakowanej fluorescencyjnie sondy molekularnej, ustalono dokładnie położenie genu kodującego białko rdzeniowe ludzkiego lumikanu. Gen ten znajduje się w długim ramieniu chromosomu 12, (locus 12q 21.3-q22) [29, 37]. Zbudowany jest on z 7500 par zasad i należy do najmniejszych genów kodujących białko rdzeniowe małych proteoglikanów śródmiąższowych [29] (Tab. 1 i Ryc. 3). Jego budowa jest stosunkowo prosta, składa się on bowiem z 3 eksonów i 2 intronów. Sekwencje niekodujące zajmują aż 5700 pz, z czego pierwszy intron posiada 2200 pz, a drugi 3500 pz. Pierwszy intron rozdziela eksony I i II, dzieląc także sekwencję dojrzałego mRNA pomiędzy 59 a 60 pz. Natomiast, między 942 a 943 zasadą kodującej nici leży drugi, większy intron [28]. Część kodująca rozmieszczona jest na trzech eksonach, z których pierwszy, licząc od końca 5' mRNA posiada 59 nukleotydów, natomiast dwa następne zbudowane są kolejno z 882 i 786 pz. Sekwencja pierwszego eksonu nie ulega translacji, drugiego w większości jest kodująca, z wyjątkiem pierwszych 21 pz na jego końcu 5'. Miejsce połączenia pierwszych dwóch eksonów leży więc poza obszarem kodującym [28]. Ostatni ekson niesie dalszą część informacji o białku rdzeniowym, która zaczynała się na eksonie sąsiednim. Po wycięciu intronów, mRNA składa się z 1792 pz. Na jego końcu 5' leży 80 nukleotydowa sekwencja niekodująca. Z kolei, dalsze 1014 pz zajmuje otwarta ramka odczytu, która koduje 338 aminokwasów. Niekodujący koniec 3' mRNA zbudowany jest z 618 pz, które zakończone są 18 nukleotydową sekwencją poli A. Punkt połączenia między II i III eksonem znajduje się w części kodującej, dzieląc otwartą ramkę odczytu w miejscu kodonu lizyny (AAG). Pierwszy nukleotyd tego kodonu leży na drugim eksonie, natomiast dwa pozostałe — na trzecim. Rozdział sekwencji kodującej następuje więc pomiędzy pierwszym a drugim nukleotydem, co stanowi pierwszą fazę kodonu [28, 29].

III-2. Fibromodulina (FM)

Początkowo nazywano ten proteoglikan białkiem macierzy 59 kDa (59 kDa matrix protein) [3]. Obecnie określane jest on w literaturze mianem fibromoduliny (FM) [31]. Podobnie jak lumikan, FM jest proteoglikanem keratanowym, rozpowszechnionym w tkance łącznej [39]. Razem z dekoryną i lumikanem, reguluje

Tabela 1.

Charakterystyka sekwencji intronowych i eksonowych oraz faz kodonów w genach kodujących białka rdzeniowe dla małych proteoglikanów śródmiąższowych. LM — lumikan, FM — fibromodulina, DE — dekoryna, BI — biglikan

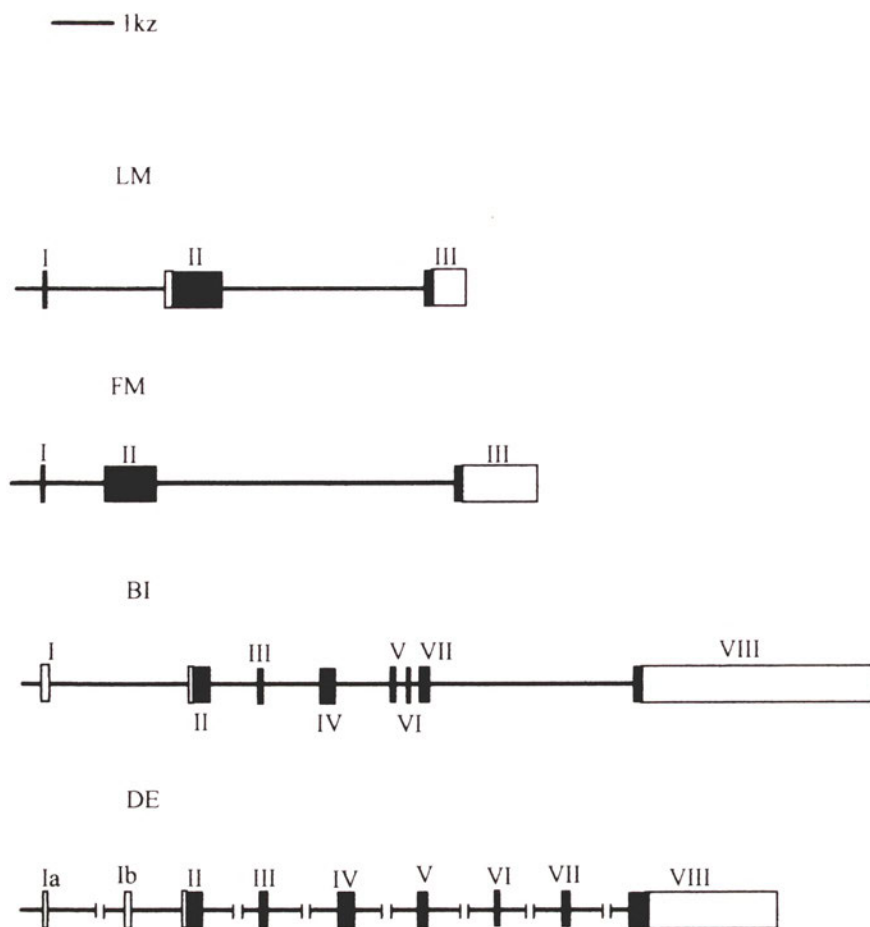
Gen	Wielkość eksonu (pz)		Wielkość intronu (pz)		Faza kodonu	Miejsce łączenia na nici białkowej
LM	I	59	1	2200	—	—
	II	882	2	3500	0	—
	III	786	3	—	—	—
FM	I	52	1	1500	—	—
	II	983	2	5000	I	314-Liz
	III	1500	3	—	—	—
DE	Ia	78	1	> 13200	—	—
	Ib	80	2	800	—	—
	II	244	3	> 5700	I	41-Gli
	III	113	4	> 2700	0	78-His/Ala
	IV	214	5	~ 1200	I	150-Glu
	V	114	6	> 3200	I	188-Gli
	VI	94	7	1300	II	219-Liz
	VII	139	8	5400	0	265-Gln/Wal
BI	I	138	1	~ 1200	—	—
	II	238	2	367	I	—
	III	113	3	511	0	—
	IV	214	4	450	I	—
	V	111	5	190	I	—
	VI	94	6	122	II	—
	VII	139	7	~ 1510	0	—
	VIII	2210	—	—	—	—

on fibrylogenezę kolagenu typu I i II, poprzez hamowanie wzrostu włókien kolagenowych. We wspomnianym procesie uczestniczy zarówno część białkowa jak i glikanowa FM [40]. Dotychczas dobrze scharakteryzowano sekwencję FM człowieka, wołu, myszy i kury [28, 41-43]. Różnice w sekwencji aminokwasowej FM pomiędzy gatunkiem ludzkim a pozostałymi, wymienionymi gatunkami zwierząt są stosunkowo niewielkie. We wszystkich przypadkach podobieństwo sekwencji waha się w granicach 80-90% [28, 39, 41-43].

Białko rdzeniowe FM, o masie 42 kDa, jest największym z białek w grupie MPŚ. Z uwagi na występowanie obszaru bogatego w reszty siarczanowanej tyrozyny, oraz przyłączanie łańcuchów KS, białko to upodabnia się do białka rdzeniowego lumikanu [44].

Różnice pomiędzy obydwoimi wymienionymi PG dotyczą w zasadzie tylko wielkości ich cząsteczek oraz rozmieszczenia łańcuchów glikoaminoglikanowych (Ryc. 1) [28, 44]. Do reszt asparaginy białka rdzeniowego fibromoduliny przyłączone są w pozycji 109, 147, 182, 272 domeny centralnej oraz poza nią w pozycji 307 łańcuchy GAG przez wiązanie N-glikozydowe [31, 35].

Gen kodujący białko rdzeniowe FM zbudowany jest z 8500 pz i znajduje się na długim ramieniu chromosomu 1 (locus 1q32) [44, 45]. W skład genu wchodzi — licząc od końca 5' DNA dwa introny, zawierające odpowiednio — 1500 pz, i 5000 pz, oraz trzy eksony, z których pierwszy posiada 52 pz, kolejny 983 pz natomiast trzeci — 1500 pz (Tab. 1) [46]. Pierwotny transkrypt, po wycięciu intronów, zmniejsza się do



Ryc. 3. Budowa genów kodujących białka rdzeniowe dla małych proteoglikanów śródmięzgowych. Pola czarne wskazują eksony; linie — introny, pola białe — regiony 5' i 3' nie podlegające translacji. Wielkości poszczególnych genów są proporcjonalne do zamieszczonej skali. Ze względu na dużą wielkość intronów, w genie kodującym białko rdzeniowe dekoryny, sekwencje te zaznaczono przerwą.

wielkości 2500 pz, z których 1128 pz stanowi otwartą ramkę odczytu, kodującą 376 aminokwasów. Na pierwszym eksonie zapisana jest sekwencja niekodująca, natomiast dwa pozostałe dzielą między siebie informację o białku rdzeniowym [46]. Pierwsza zasada kodonu inicjującego ATG znajduje się na piątym miejscu w sekwencji drugiego eksonu, licząc od końca 5' mRNA. Ekson drugi koduje 326 aminokwasów, z których pierwszych 18 stanowi peptyd sygnałowy. Z kolei, ekson III obejmuje 50 aminokwasów C-końcowego fragmentu białka rdzeniowego FM oraz nie ulegającą translacji sekwencję na końcu 3' mRNA [46]. W przypadku FM — jak wcześniej wspomniano — pierwszy nukleotyd kodonu inicjującego jest zarazem czwartym nukleotydem drugiego eksonu, natomiast w lumikanie — ta odległość wzrasta do 21 pz. Odległość pomiędzy końcem 3' drugiego intronu a kodonem terminującym, w genie kodującym białko rdzeniowe FM, wynosi 150 pz. Ten sam odcinek w lumikanie jest równy 152 pz. Intron II dzieli ekson II i III pomiędzy oddzielnymi kodonami (faza 0 kodonu). W przypadku lumikanu ten podział następuje w obrębie jednego kodonu, z którego pierwszy nukleotyd leży na eksonie II, dwa pozostałe na eksonie III (faza I kodonu) [46].

IV. Proteoglikany chondroityno/dermatanowe

IV-1. Dekoryna (DE)

Dekoryna, wcześniej nazywana DSPG II lub PG 40,

jest najbardziej rozpowszechnioną i najlepiej poznaną cząsteczką spośród MPŚ. Odgrywa ważną rolę w oddziaływaniach z białkami macierzy oraz czynnikami wzrostowymi [32, 47, 48]. Jest jednym z najważniejszych regulatorów tworzenia macierzy pozakomórkowej. Oddziałuje z fibronektyną i trombospondyną oraz wpływa na migrację i proliferację komórek [32]. Wspólnie z lumikanem i fibromoduliną hamuje proces powiększania średnicy włókien kolagenowych typu I i II, między innymi poprzez wpływ na biosyntezę kolagenazy [32, 40, 49, 50]. Udowodniono, iż obecność dekoryny w tkance działa inhibicyjnie na TGF- β , hamując tym samym proces włóknienia [47]. Z kolei, sama ekspresja genu dekoryny może być hamowana na poziomie transkrypcji przez TNF- α , który łączy się z regionem promotora [32]. Zawartość tego proteoglikanu obniża się w skórze narażonej na dłuższą ekspozycję słoneczną [51], natomiast wzrasta pod wpływem hormonu wzrostu [52]. Białko rdzeniowe dekoryny, o masie 36 kDa, składa się z 359 reszt aminokwasowych. Do białka tego przyłączony jest tylko jeden łańcuch chondroityno- lub dermatanosiarczanowy w obszarze N-końcowym omawianej makrocząsteczki [3]. W obrębie domeny centralnej białka rdzeniowego wiązane są także łańcuchy oligosacharydowe. Przyłączają się one poprzez asparaginę przy 6, 8 i 10 powtórzeniu bogatoleucylowym (Ryc. 1). N-koniec białka rdzeniowego zawiera krótką, 16 aminokwasową sekwencję sygnałową, która przyłącza się do szorstkiego retikulum endoplazmatycznego oraz

14 aminokwasowy propeptyd. Delecje w obrębie drugiej z wymienionych części białka rdzeniowego odpowiedzialne są za skracanie łańcuchów GAG w dekorynie [53].

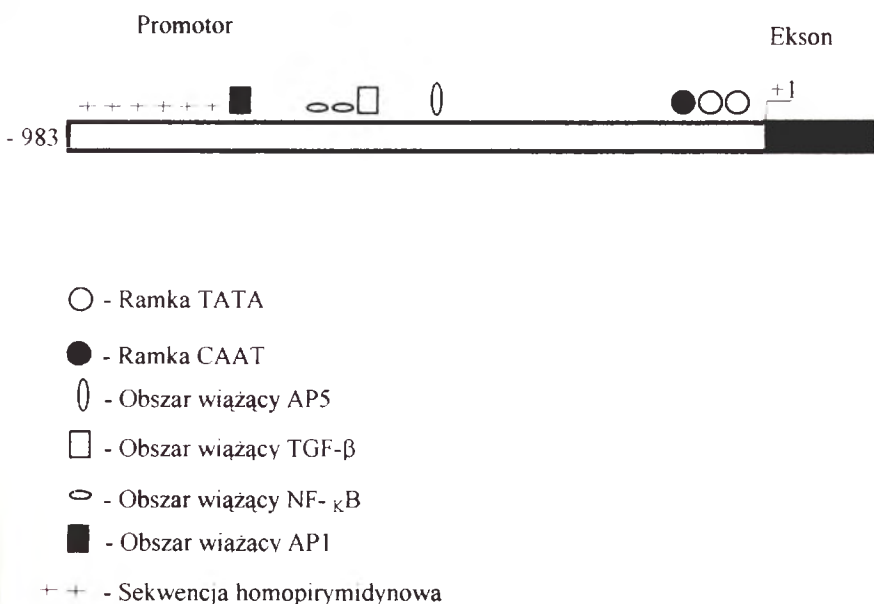
Gen kodujący białko rdzeniowe dekoryny, w porównaniu z genem lumikanu i fibromoduliny, ma znaczne rozmiary. Gen ten zlokalizowany jest w chromosomie 12, (locus 12q 21.3) i zbudowany z 38 kpz. W jego skład wchodzi osiem intronów i tyle samo eksonów (Ryc. 3). Szczegółową charakterystykę odcinków kodujących i niekodujących, stref łączenia oraz faz kodonów zawiera tabela 1. Dojrzały mRNA, gotowy do transkrypcji, zbudowany jest z 2361 pz, z czego 1077 pz stanowi otwartą ramkę odczytu [54-56]. Ekson Ia i Ib oraz częściowo II, niosą sekwencje niekodujące. Na pozostałej części II eksonu zapisana jest domena N końcowa. Domenę C końcową koduje ekson VIII, który w dalszej części niesie sekwencję niekodującą. Bogatolecucylowy obszar centralny białka rdzeniowego kodowany jest na eksonach III-VII [3]. Na szczególną uwagę zasługuje budowa końca 5' mRNA, która znacznie się różni od budowy mRNA dla pozostałych proteoglikanów omawianej grupy. Na wspomnianym końcu znajdują się dwa eksony (Ia i Ib), niosące sekwencję niekodującą [55, 56]. Pierwszy z nich, określony jako Ia, składa się z 78 pz, z czego 23 pz są identyczne z sekwencją kodującą białko rdzeniowe, która znajduje się pomiędzy 26 a 48 pz, licząc od miejsca startu transkrypcji. Region przylegający do eksonu od końca 5' (tzw. promotor Ia) posiada (licząc od końca 5') dwie ramki GC o aktywności cis, do których przyłączają się czynniki transkrypcyjne Sp1, oraz dwa, następujące po sobie, obszary o identycznej sekwencji, po 51 pz każdy [55, 56]. Wykazano, iż region ten nie ma właściwości promotora, a jedynie może mieć wpływ na częstość zachodzenia procesu transkrypcji [55-58]. Ekson Ib zbudowany jest z 80 pz i oddzielony od swojego poprzednika znacznych rozmiarów intronem, o długości 13200 pz. Koniec 5' eksonu ograniczony jest sekwencją promotora Ib,

składającą się z około 900 pz. Mutacje w tym obszarze mogą znacznie obniżyć wydajność transkrypcji lub całkowicie ją zahamować, gdy proces ten będzie dotyczył pierwszych 140 nukleotydów końca 3' promotora (Ryc. 4). We wspomnianej strefie znajdują się dwie ramki TATA, w pozycji -50 i -60 pz, oraz jedna CAAT, w pozycji -95 pz. Dystalnie do tego regionu znajdują się sekwencje rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne AP1 i AP5. Obszary te znajdują się w pozycjach odpowiednio -525 pz oraz -813 pz. Pomiędzy nimi znajduje się jeden motyw TGF- β (poz. -685 pz). Kilkanaście nukleotydów dalej leżą dwie sekwencje NF- κ B, rozpoznawane przez interleukinę 1, która z kolei — jest „wzmocniaczem” transkrypcji. Na końcu 5' promotora Ib znajduje się strefa homopirymidynowa CT (nić kodująca) oraz homopurynowa AG (nić niekodująca). Ich zadaniem jest tworzenie i stabilizacja struktury drugorzędowej DNA [56, 59], oraz wiązanie czynników transkrypcyjnych [56, 60, 61].

IV-2. Biglikan (BI)

Jako jedyny przedstawiciel rodziny MPŚ, biglikan może istnieć w formie proteoglikanu transmembranowego [62]. Poza tym, podobnie jak lumikan, fibromodulina i dekoryna, biglikan oddziałuje z kolagenem, szczególnie typu I, II, a ponadto VI [63]. Wspólnie z dekoryną, regulując fibrylogenezę kolagenu macierzy w jądrach wpływają na tworzenie się mikroarchitektury tego organu [64]. Ponadto biglikan wiąże się z fibronektyną i TGF- β , hamując odpowiednio adhezję i transformację komórek. Biglikan występuje w chrząstce [65, 66], skórze [66, 67], jądrach [64], kościach [67, 68], a także w bliznowcu (bliźnie przerostowej) [69].

Budowa białka rdzeniowego biglikanu wykazuje duże podobieństwo do dekoryny [3, 70]. Główne różnice dotyczą miejsca i ilości przyłączonych łańcuchów glikoaminoglikanowych i oligosacharydowych (Ryc. 1). Na N-końcu białka rdzeniowego znaj-



Ryc. 4. Obszar promotora Ib genu kodującego białko rdzeniowe dekoryny.

dują się 1-2 łańcuchy chondroityno- lub dermatano-siarczanowe, natomiast w obrębie domeny centralnej — biglikan wiąże dwa łańcuchy oligosacharydowe. Przyłączenie tych ostatnich następuje przez asparaginę, przy 8 i 10 powtórzeniu bogatoleucylowym [3]. Część białka rdzeniowego ma masę 38 kDa i zbudowana jest z 368 reszt aminokwasowych [70, 71], natomiast po przyłączeniu reszt cukrowych jej masa wzrasta do ok. 42 kDa [71]. N-koniec białka rdzeniowego biglikanu zawiera 16 aminokwasowy peptyd sygnałowy oraz zbudowany z 14 reszt aminokwasowych propeptyd [72].

Gen kodujący białko rdzeniowe biglikanu znajduje się na chromosomie X, (locus Xq28) [73]. Zbudowany jest on z 8800 pz z czego 1200 pz wchodzi w region promotora transkrypcji, pozostałe 7600 pz przypada na naprzemiennie ułożone sekwencje kodujące i niekodujące [74, 75]. Gen biglikanu zbudowany jest z 8 eksonów i 7 intronów, co wskazuje na bliskie jego pokrewieństwo z genem dekoryny (Ryc. 3). Podobieństwo to potwierdza dokładna analiza omawianych struktur. Zarówno w biglikanie jak i w dekorynie, eksony III, IV, VI, VII mają jednakową ilość zasad, zaś pozostałe wykazują niewielkie wahania w liczbie nukleotydów (Tab. 1) [55, 56, 74]. Matrycowy RNA składa się z 3252 pz, z czego 1104 pz stanowi otwartą ramkę odczytu. Pierwszy ekson nie zawiera sekwencji kodującej. Struktura białka zapisana jest na eksonach II-VII. Ekson drugi koduje peptyd sygnałowy, propeptyd, sekwencję przyłączającą łańcuchy GAG oraz dwa pierwsze regiony bogatocysteilowe [74, 75]. Eksony III-VII zawierają informację o domenie centralnej, natomiast struktura dwóch ostatnich obszarów bogatocysteilowych i C-końca zapisana jest na eksonie VII, który w większej części nie jest kodujący [74]. Region promotora transkrypcji zbudowany jest z 1218 pz. Doświadczalnie stwierdzono, że jeśli sekwencja ta ulegnie skróceniu do wartości poniżej -500 pz, wówczas promotor traci aktywność i transkrypcja ustaje [75]. W obrębie promotora rozmieszczonych jest około 30 miejsc cis-aktywnych, wśród których brakuje sekwencji CAAT i TATA. Charakterystyczną cechą genu biglikanu jest duża zawartość sekwencji GC, skupionych w dwóch powtórzeniach na końcu 3' promotora [75]. Pierwsza z nich zajmuje pozycję między -1 pz a -164 pz, druga od -204 do -256 pz, zaś procentowa zawartość par GC sięga odpowiednio 73% i 87% [74, 75]. W regionie promotora znajduje się aż 11 sekwencji rozpoznawanych przez czynnik transkrypcyjny Sp1, pięć — rozpoznawanych przez AP2, oraz po jednej sekwencji, rozpoznawanej przez IL6 i NF1. W dystalnej strefie promotora istnieje szereg miejsc wiążących dla substancji wzmacniających lub hamujących proces transkrypcji takich jak: TGF- β , NF- κ B, AP1, AP3, IL6, TNF- α [75]. Analiza końca 5' DNA dekoryny i biglikanu wykazała istotne różnice w długości i budowie tej strefy. Dekoryna posiada dwa promotory oddzielone znacznych rozmiarów intro-

nem [55, 56], z kolei promotor biglikanu nie posiada sekwencji CAAT i TATA [74-76].

V. Podsumowanie

Małe proteoglikany śródmiąższowe dzielimy na dwie grupy, gdzie do pierwszej należą proteoglikany keratanowe czyli lumikan i fibromodulina, zaś do drugiej — proteoglikany chondroityno/dermatanowe czyli dekoryna i biglikan. Podstawą podziału omawianych PG jest zarówno rodzaj przyłączonego łańcucha GAG jak i budowa oraz wielkość genów kodujących białka rdzeniowe MPS. Fibromodulina i lumikan mają bardzo zbliżoną wielkość i prawie identyczną budowę genu. Podobnie jest w drugiej grupie proteoglikanów, gdzie struktura DNA dekoryny i biglikanu jest także bardzo zbliżona, nawet do tego stopnia, iż niektóre eksony mają identyczną ilość zasad. Niewielkie różnice dotyczą budowy końców 5' DNA oraz wielkości genów dla tych proteoglikanów, bowiem gen biglikanu wyraźnie ustępuje wielkością genowi dekoryny, głównie z powodu krótszych sekwencji intronowych.

Artykuł otrzymano 30 czerwca 1997 r.

Zaakceptowano do druku 8 stycznia 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Scott JE (1988) *Biochem J* **252**: 313-325
2. Głowacki A, Koźma EM, Olezyk K, Kucharz EJ (1995) *Post Biochem* **41**: 139-148
3. Iozzo RV, Murdoch AD (1996) *FASEB J* **10**: 598-614
4. Hardingham TE, Fosang AJ (1992) *FASEB J* **6**: 861-870
5. Umbreit JN (1996) *Anticancer Res* **16**: 3013-3050
6. Esko JD (1991) *Current Opinion in Cell Biol* **3**: 805-816
7. Netfield JJ, Huber-Bruning O, Bylsma JWJ (1994) W: Jolles P (red) *Proteoglycans* Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, str 215-242
8. Mulhlauser J, Marziani D, Morroni M, Vukovic M, Crescimanno C, Castellucci M (1996) *Cell Tiss Res* **285**: 101-107
9. Kimura F, Suzu S, Nakamura Y, Wakimoto N, Kanatani Y, Yanai Y, Nagata N, Motoyoshi K (1994) *J Biol Chem* **269**: 19751-19756
10. Gressner AM (1996) *Hepato-Gastroenterol* **43**: 92-103
11. Li H, Schwartz NB (1995) *J Mol Evol* **41**: 878-885
12. Chandrasekaran L, Tanzer ML (1992) *Biochem J* **288**: 903-910
13. Grover J, Roughley PJ (1993) *Biochem J* **291**: 361-367
14. Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD (1994) *Biochem J* **302**: 625-639
15. Dodge GR, Boesler EW, Jimenez SA (1995) *Lab Invest* **73**: 649-657
16. Kato M, Saunders S, Nguyen H, Bernfield M (1995) *Molec Biol Cell* **6**: 559-576
17. Liebersbach BF, Sanderson RD (1994) *J Biol Chem* **269**: 20013-20019
18. Spring J, Goldberg OA, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Bernfield M (1994) *Genomics* **21**: 597-601
19. Baciuc PC, Goetinck PF (1995) *Molec Biol Cell* **6**: 1503-1513
20. Numa F, Hirabayashi K, Tsunaga N, Kato H, O'Rourke K, Shao H, Stechmann-Lebakken C, Varani J, Rapraeger A, Dixit VM (1995) *Cancer Res* **55**: 4676-4680

21. Mali M, Andtfolk H, Miettinen M, Jalkanen M (1994) *J Biol Chem* **269**: 27795-27798
22. Salmivirta M, Mali M, Heino J, Hermonen J, Jalkanen M (1994) *Exp Cell Res* **215**: 180-188
23. Carey DJ, Stahl RC, Tucker B, Bendt KA, Cizmeci-Smith G (1994) *Exp Cell Res* **214**: 12-21
24. Bernfield M, Hinkes MT, Gallo RL (1993) *Development* (Suppl) 205-212
25. Takagi A, Kojima T, Tsuzuki S, Katsumi A, Yamazaki T, Sugiura I, Hamaguchi M, Saito H (1996) *J Biochem* **119**: 979-984
26. Kim CW, Goldberger OA, Gallo, Bernfield M (1994) *Molec Biol Cell* **5**: 797-805
27. Scholzen T, Solursh M, Suzuki S, Reiters R, Morgan JL, Buchberg AM, Siracusa LD, Iozzo RV (1994) *J Biol Chem* **269**: 28270-28281
28. Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 21942-21949
29. Chakravarti S, Stallings RL, SundarRaj N, Cournet PK, Hassel JR (1995) *Genomics* **27**: 481-488
30. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Havelone ND, Stech ME, Justice MJ, Liu CY, Kao WWY, Conrad GW (1995) *Invest Ophthalmol Visual Sci* **36**: 2296-2303
31. Plaas AHK, Neame PJ, Nivens CM, Reiss L (1990) *J Biol Chem* **265**: 20634-20640
32. Mauviel A, Santra M, Chen YQ, Uitto J, Iozzo RV (1995) *J Biol Chem* **270**: 11692-11700
33. Oldberg A, Antonsson P, Moses J, Fransson IA (1996) *FEBS Lett* **386**: 29-32
34. Scott JE, Cummings Ch (1995) *Biochem Soc Trans* **23**: 515S
35. Blochberger TC, Vergnes JP, Hempel J, Hassel JR (1992) *J Biol Chem* **267**: 347-352
36. Blochberger TC, Cournet PK, Hassel JR (1992) *Jm Biol Chem* **267**: 20613-20619
37. Chakravarti S, Magnuson T (1995) *Mamm Gen* **6**: 367-368
38. Rada JA, Fini ME, Hassell JR (1996) *Invest Ophthalmol Visual Sci* **37**: 2060-2067
39. Plaas AHK, Wong-Palms S (1993) *J Biol Chem* **268**: 26634-26644
40. Antonsson P, Heinegard D, Oldberg A (1991) *J Biol Chem* **266**: 16859-16861
41. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Rouslahti E (1994) *Biochem J* **302**: 527-534
42. Sztrolovics R, Chen XN, Grover J, Roughley PJ, Korenberg JR (1994) *Genomics* **23**: 715-717
43. Sztrolovics R, Rimon DL, Rodriguez E, Roughley PJ (1994) *Matrix Biol* **14**: 307-312
44. Nurminskaya MV, Birk DE (1996) *Biochem J* **317**: 785-789
45. Collins A, Keats BJ, Dracopoli N, Shields DC, Morton NE (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4598-4602
46. Antonsson P, Heinegard D, Oldberg A (1993) *Biochim Biophys Acta* **1174**: 204-20
47. Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA (1996) *Nat Med* **2**: 418-423
48. De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV (1996) *J Biol Chem* **271**: 18961-18965
49. Superti-Furga A, Raghunath M, Willems PJ (1992) *J Med Genet* **29**: 875-878
50. Huttenlocher A, Werb Z, Tremble P, Huhtala P, Rosenberg L, Damsky CH (1996) *Matrix Biol* **15**: 239-250
51. Bernstein EF, Fisher LW, Li K, LeBaron RG, Tan EML, Uitto J (1995) *Lab Invest* **72**: 662-669
52. Zhang CZ, Li H, Bartold PM, Young WG, Waters MJ (1995) *J Dent Res* **74**: 1636-1643
53. Ramamurthy P, Hocking AM, McQuillan DJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 19578-19584
54. Fisher LW, Termine JD, Young MF (1989) *J Biol Chem* **264**: 4571-4576
55. Danielson KG, Fazzio A, Cohen I, Cannizzaro LA, Eichstetter I, Iozzo RV (1993) *Genomics* **15**: 146-160
56. Vetter U, Vogel W, Young MF, Fisher LW (1993) *Genomics* **15**: 161-168
57. Santra M, Danielson KG, Iozzo RV (1994) *J Biol Chem* **269**: 579-587
58. Breibart RE, Andreadis A, Nadal-Ginard B (1987) *Annu Rev Biochem* **56**: 467-495
59. Htun H, Dahlberg JE (1989) *Science* **243**: 1571-1576
60. Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ, Hogan ME (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8227-8231
61. Young MF, Findlay DM, Dominguez P, Burbelo PD, McQuillan C, Kopp JB, Gehron Robey P, Termine JD (1989) *J Biol Chem* **264**: 450-456
62. Bianco P, Riminucci M, Fisher LW (1993) W: Scott JE (red) *Dermatan sulphate proteoglycans. Chemistry, biology, chemical pathology*. Portland Press, London and Chapel Hill, str 193-205
63. Schonherr E, Withsch-Prehm P, Harrach B, Robenek H, Rauterberg J, Kresse H (1995) *J Biol Chem* **270**: 2776-2783
64. Ungerfrozen H, Ergun S, Krull NB, Holstein AF (1995) *Biol Reprod* **52**: 1095-1105
65. Liu J, Laue TM, Choi HU, Tang LH, Rosenberg L (1994) *J Biol Chem* **269**: 28366-28373
66. Visser NA, Vankampen GPJ, Dekoning MHMT, Vanderkorst JK (1994) *Int J Tiss React* **16**: 195-203
67. Neame PJ, Choi HU, Rosenberg LC (1989) *J Biol Chem* **264**: 8653-8661
68. Kimoto S, Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV (1994) *Endocrinology* **135**: 2423-2431
69. Hunzelmann N, Anders S, Sollberg S, Schonherr E, Krieg T (1996) *Br J Dermatol* **135**: 394-399
70. Torok MA, Evans SAS, Marcum JA (1993) *Biochim Biophys Acta* **1173**: 81-84
71. Roughley PJ, White RJ, Mort JS (1996) *Biochem J* **318**: 779-784
72. Hocking AM, Strungell RA, Ramamurthy P, McQuillan DJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 19571-19577
73. Traupe H, Van Den Ouweland AMW, Van Oost BA, Vogel W, Vetter U, Warren ST, Rocchi M, Darlison MG, Ropers HH (1992) *Genomics* **13**: 481-483
74. Fisher LW, Heegaard AM, Vetter U, Vogel W, Just W, Termine JD, Young MF (1991) *J Biol Chem* **266**: 14371-14377
75. Ungefrozen H, Krull NB (1996) *J Biol Chem* **271**: 15787-15795
76. Wegrowski Y, Pillarisetti J, Danielson KG, Suzuki S, Iozzo RV (1995) *Genomics* **30**: 8-17

Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin

Biochemical and molecular basis of plant-microbe symbiotic interactions

ANNA JAKUBOWSKA¹,
STANISŁAW KOWALCZYK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wymiana sygnałów pomiędzy bakterią i rośliną
II-1. Flawonoidy — roślinne związki sygnałowe
II-2. Czynniki Nod — bakteryjne cząsteczki sygnałowe
- III. Bakteryjne geny brodawkowania
- IV. Synteza czynników Nod
IV-1. Oddziaływania flawonoidy — białko Nod D
IV-2. Białko Nod D jako aktywator transkrypcji genów *nod*
IV-3. Synteza lipochitynowego szkieletu czynników Nod
IV-4. Modyfikacje łańcucha głównego czynników Nod
- V. Transport czynników Nod
- VI. Odpowiedzi rośliny na czynniki Nod
VI-1. Wczesne geny nodulinowe
VI-2. Późne geny nodulinowe
- VII. Uwagi końcowe

I. Wstęp

Klasycznym przykładem oddziaływań symbiotycznych zachodzących w przyrodzie jest współzycie roślin wyższych z bakteriami zdolnymi do wiązania azotu atmosferycznego. Rośliny wchodzące w symbiozę należą wyłącznie do rodziny motylkowatych (*Leguminosae*) z jedynym, jak do tej pory, znanym wyjątkiem, rodzajem *Parasponia* z rodziny wiązowatych (*Ulmaceae*) [Trinick, cyt. za 20]. Symbiotyczne bakterie należą do czterech rodzajów bakterii glebowych: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* i *Sinorhizobium*. Chociaż są one odległe filogenetycznie [1], to ze względu na ich specyficzną zdolność do symbiozy z roślinami motylkowatymi zalicza się je do wspólnej grupy nazywanej rizobiami [2].

Rizobia indukują tworzenie nowych organów roślinnych, tzw. brodawek korzeniowych, a czasem pędowych, np. u wodnych roślin motylkowatych z rodzaju *Sesbania* [3]. Brodawka o określonej morfologii i anatomii, charakteryzująca się wyspecjalizowanym meta-

Contents:

- I. Introduction
- II. Plant-microbe signal exchange
II-1. Flavonoids — plant signals
II-2. Nod factors — bacterial signaling molecules
- III. Bacterial nodulation genes
- IV. Synthesis of Nod factors
IV-1. Flavonoids — Nod D protein interactions
IV-2. Nod D protein as the activator of *nod* genes transcription
IV-3. Synthesis of Nod factors lipo-chitin backbone
IV-4. Modifications of Nod factors lipo-chitin backbone
- V. Transport of Nod factors
- VI. Plant responses to Nod factors
VI-1. Early nodulin genes
VI-2. Late nodulin genes
- VII. Concluding remarks

bolizmem stanowi swoistą niszę ekologiczną, wewnątrz której istnieją warunki umożliwiające bakteryjnym symbiontom redukcję azotu atmosferycznego do amoniaku będącego źródłem azotu dla rośliny. Redukcja N_2 jest katalizowana przez nitrogenazę, enzym wrażliwy na tlen, występujący jedynie u prokariotów [4-6].

Oddziaływania pomiędzy roślinami motylkowatymi i rizobiami są specyficzne, ponieważ dany gatunek lub szczep rizobiów może indukować wytwarzanie brodawek tylko u określonych roślin. Jednakże stopień specyficzności nie jest jednakowy (Tab. 1) [2, 7-9]. Niektóre rizobia mogą indukować powstawanie brodawek u roślin jednego lub kilku gatunków, np. *R. meliloti* infekuje tylko lucernę, *R. leguminosarum* bv *viciae* wykę i groch, ale blisko z nim spokrewnione *R. leguminosarum* bv *trifolii* wyłącznie koniczynę. Z kolei inne bakterie wykazują dużo szerszy zakres brodawkowania, np. *Rhizobium* sp. NGR 234 może infekować około 70 różnych gatunków roślin, w tym także rośliny z rodzaju *Parasponia* [2, 8].

Oddziaływania symbiotyczne rozpoczynają się od kolonizacji włóśników korzeniowych przez bakterie, które do komórek kory korzenia dostają się poprzez specyficzną strukturę, tzw. nić infekcyjną. Równoległe z infekcją następuje indukcja podziałów komórek kory

¹Dr, Zakład Biochemii, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; ²dr hab., prof. nadzw., Michigan State University, Department of Botany and Plant Pathology, East Lansing, MI 48824 USA

Tabela 1.

Specyficzność oddziaływań symbiotycznych

Rizobia	Roślina-gospodarz
<i>Rhizobium meliloti</i>	lucerna (<i>Medicago</i>)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
biovar <i>viciae</i>	groch (<i>Pisum</i>), wyka (<i>Viciae</i>)
biovar <i>trifolii</i>	koniczyna (<i>Trifolium</i>)
biovar <i>phaseoli</i>	fasola (<i>Phaseolus</i>)
<i>Rhizobium</i> sp. NGR 234	motylkowate ze strefy tropikalnej, <i>Parasponia</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	soja (<i>Glycine</i>)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	soja (<i>Glycine</i>)

pierwotnej korzenia, w wyniku czego powstaje brodawka pierwotna. Nić infekcyjna zawierająca bakterie rośnie w kierunku brodawki pierwotnej, gdzie bakterie zostają uwolnione do cytoplazmy i otoczone błoną peribakteroidową, PBM (ang. *peribacteroid membrane*) pochodzącą z roślinnej błony plazmatycznej. Brodawka pierwotna rozwija się w brodawkę funkcjonalną, a bakterie różnicują się do form symbiotycznych — bakteroidów, które mają zdolność redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku [10-13].

Symbioza jest ważnym zjawiskiem nie tylko z punktu widzenia ekonomicznego i ekologicznego. Organizmy symbiotyczne mogą stanowić materiał do badań nad mechanizmami kontrolującymi podziały komórek roślinnych i proces organogenezy pod wpływem specyficznych bodźców chemicznych. Wzajemna wymiana sygnałów jest podstawą rozpoznania komórkowego pomiędzy symbiontami i inicjuje symbiozę poprzez aktywację specyficznych genów bakterijskich i roślinnych, co prowadzi do wytworzenia funkcjonalnej brodawki. Intensywne badania prowadzone w ostatniej dekadzie przyczyniły się do znacznego postępu w poznaniu i zrozumieniu molekularnych podstaw specyficznych oddziaływań zachodzących w symbiozie. Wyniki tych badań, w różnym zakresie, można znaleźć w licznych opracowaniach przeglądowych [2, 7, 9, 11, 12, 14-24]. W polskim piśmiennictwie opublikowano na ten temat 3 artykuły w *Kosmosie* [25-27] i ostatnio w *Acta Biochimica Polonica* [28]. Prezentowana praca dotyczy badań wczesnych etapów symbiozy, m.in. identyfikacji związków sygnałowych i potwierdzenia ich udziału w ekspresji informacji genetycznej kontrolującej ten proces.

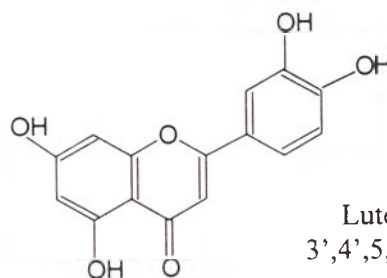
II. Wymiana sygnałów pomiędzy bakterią i rośliną

Symbiotyczne oddziaływania między rizobiami i motylkowatymi rozpoczynają się wtedy, gdy w wyniku chemotaksji bakterie kierują się w stronę powierzchni korzeni rośliny pod wpływem wydzielanych przez

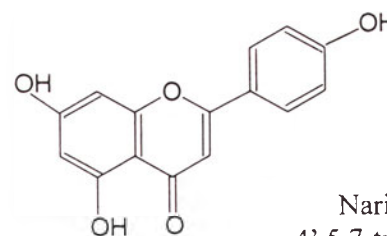
nie substancji chemicznych. W latach osiemdziesiątych ustalono, że związkami chemicznymi, które indukują ekspresję specyficznych bakterijskich genów *nod* (ang. *nodulation*) uczestniczących w symbiozie są flawonoidy [29-31]. Wkrótce okazało się, że w wyniku ekspresji tych genów syntetyzowane są bakterijskie związki sygnałowe, które z kolei umożliwiają roślinie rozpoznanie odpowiedniego mikrosymbionta [8, 16, 18, 32].

II-1. Flawonoidy — roślinne związki sygnałowe

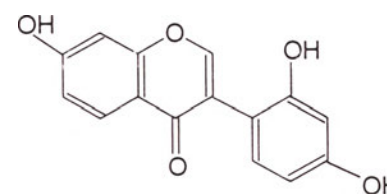
Flawonoidy należą do związków fenolowych, które są wtórnymi metabolitami syntetyzowanymi, akumulowanymi i wydzielanymi przez roślinę w czasie jej normalnego wzrostu i rozwoju. Jest to zróżnicowana pod względem struktury klasa związków chemicznych pełniących w roślinie rozmaite funkcje. W ostatnich latach odkryto, że niektóre z nich mogą funkcjonować jako sygnały chemiczne w różnego typu oddziaływaaniach roślin z mikroorganizmami [33-35]. Zagadnienie to zostało szerzej omówione w artykule opublikowanym w *Postęпах Biochemii* [36].



Luteolina
3',4',5,7-tetrahydroksyflawon



Naringenina
4',5,7-trihydroksyflawonon



Daidzeina
4',7-dihydroksyizoflawon

Ryc. 1. Flawonoidy indukujące ekspresję genów *nod*: luteolina (flawon) aktywuje geny *nod* u *R. meliloti*, naringenina (flawonon) u *R. leguminosarum* bv *viciae*, daidzeina (izoflawon) u *B. japonicum*.

Najwięcej flawonoidów jest syntetyzowanych i wydzielanych z korzeni podczas intensywnego wzrostu i rozwoju roślin motylkowatych. Wydzielają one różne flawonoidy, które są rozpoznawane przez rizobia, ale tylko określone związki mogą specyficznie indukować bakteryjne geny *nod*. Zdolność do aktywacji genów brodawkowania zależy od gatunku rośliny. Geny *nod* z *Rhizobium* ulegają aktywacji przez flawony i flawonony (luteolina, naringenina) wydzielane przez rośliny strefy umiarkowanej, takie jak koniczyna, lucerna, wyka, groch [31, 37], podczas gdy geny *nod* z *Bradyrhizobium* są aktywowane głównie przez izoflawony (daidzeina) wydzielane przez rośliny motylkowate strefy tropikalnej, np. soję [38] (Ryc. 1). Ponadto stwierdzono, że flawonoidy, które indukują ekspresję genów *nod* są wydzielane w obszarze występowania młodych, ale w pełni rozwiniętych włókników korzeniowych [31]. Wyniki innych badań wykazały, że dokładnie w tej samej strefie następuje infekcja korzenia przez bakterie [14].

II-2. Czynniki Nod — bakteryjne cząsteczki sygnałowe

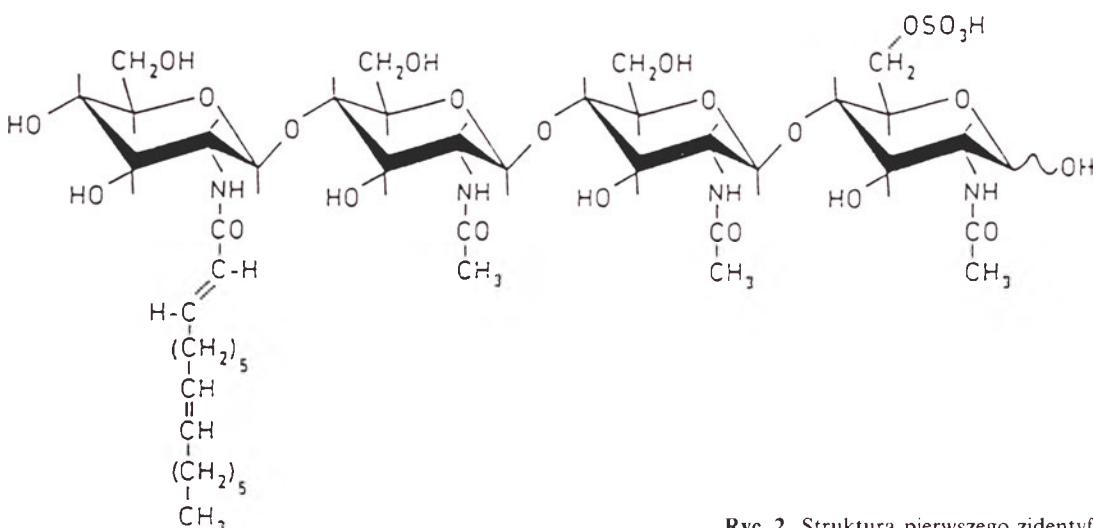
Sposób wniknięcia bakterii do komórek korzenia, a także charakterystyczny rozwój i struktura brodawki są specyficznie zależne od rośliny-gospodarza, co oznacza, że to roślina posiada informację genetyczną dla symbiotycznej infekcji i powstania brodawki. Rola bakterii polega na wywołaniu ekspresji tej informacji za pośrednictwem specyficznych związków sygnałowych nazywanych czynnikami Nod, NF (ang. *Nod factors*).

Czynniki Nod są oligosacharydami lipochitynowymi. Ich budowa chemiczna została ustalona dopiero na początku lat dziewięćdziesiątych. L e r o u g e i w s p. [39] po raz pierwszy wyizolowali, oczyścili i określili strukturę czynnika Nod z *Rhizobium meliloti*, który indukuje wytwarzanie brodawek u lucerny (Ryc. 2). Wkrótce potem ustalono budowę czynników Nod syntetyzowanych przez inne gatunki rizobiów: *R.*

species NGR 234 [40], *B. elcani* i *B. japonicum* [41, 42], *R. leguminosarum* bv *trifolii* i *R. leguminosarum* bv *viciae* [43, 44] *R. etli* [45] *R. tropici* i inne [2, 11, 44]. Wszystkie poznane do tej pory czynniki Nod mają podobną budowę chemiczną, której ogólny schemat przedstawiony jest na rycinie 3 [2, 9, 12, 21, 24, 46]. Szkielet główny tych związków składa się z 3-5 jednostek N-acetylo-D-glukozyaminy (GlcNAc) połączonych wiązaniami β -1,4 glikozydowymi. Koniec nieredukujący oligosacharydu chitynowego jest podstawiony w pozycji C-2 resztą kwasu tłuszczowego, zróżnicowaną pod względem długości łańcucha węglowego (C_{16} , C_{18} lub C_{20}) i ilości wiązań nienasyconych (2-4). Szkielet cukrowy, który jest wspólny dla wszystkich czynników Nod, zawiera dodatkowe podstawniki decydujące o specyficzności względem gospodarza. Wszystkie przebadane do tej pory gatunki i szczepy rizobiów syntetyzują czynniki Nod różniące się długością głównego szkieletu lipochitynowego, strukturą reszty kwasu tłuszczowego oraz rodzajem pozostałych podstawników.

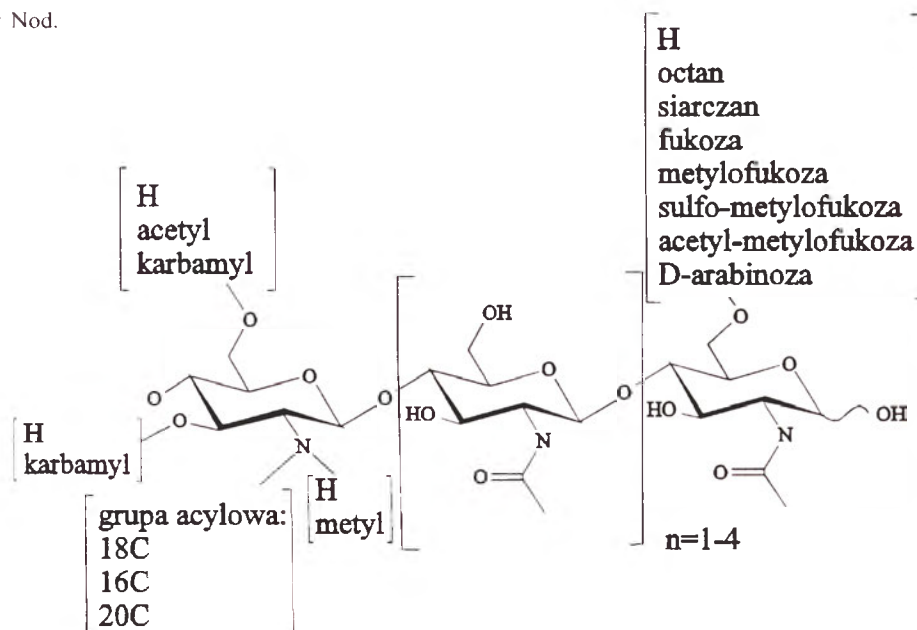
III. Bakteryjne geny brodawkowania

Geny rizobiów istotne dla infekcji i tworzenia brodawek oraz kontroli specyficzności względem gospodarza obejmują dwie grupy: geny brodawkowania (geny *nod*) oraz geny determinujące strukturę bakteryjnej ściany komórkowej, związane z syntezą egzopolisacharydów (geny *exo*), lipopolisacharydów (geny *lps*) oraz β -glukanów (geny *ndv*) [14]. Ekspresja genów *exo*, *lps* i *ndv* będąca odpowiedzią na sygnał roślinny jest niezbędna dla oddziaływań symbiotycznych, ale dokładne funkcje białek kodowanych przez te geny nie są poznane. Przypuszczalnie są one istotne nie tylko w najwcześniejszych etapach oddziaływań symbiotycznych, biorąc udział we wzajemnym rozpoznaniu obydwu symbiontów i efektywnym przyczepianiu się bakterii do powierzchni włókników korzeniowych, ale także w czasie tworzenia nici infekcyjnej, wchodząc w skład wypełniającej ją matriks zawierającej bakterie



Ryc. 2. Struktura pierwszego zidentyfikowanego czynnika Nod.

Ryc. 3. Schemat ogólnej struktury czynników Nod.



Koniec nieredukujący

Koniec redukujący

[47-50]. Mutacje w tych genach powodują tworzenie „pustych” brodawek, nie zawierających nici infekcyjnej ani bakterii, w których nie zachodzi wiązanie azotu [15].

Spośród wymienionych genów, tylko geny *nod* uczestniczą w syntezie bakteryjnych cząsteczek sygnałowych, czynników Nod. Wyróżnia się wśród nich geny wspólne, występujące u wszystkich rizobiów, *com nod* (ang. *common nodulation genes*) oraz geny *hsn nod* (ang. *host-specific nodulation genes*), obecne w różnych kombinacjach u różnych gatunków bakterii [2, 11, 17]. Do grupy genów *com nod* należą geny *nod A, B, C, D, I, J*, które odgrywają u symbiotycznych rizobiów pierwszorzędną rolę, ponieważ są odpowiedzialne za syntezę czynników Nod w ogóle. Ustalono, że są one w wysokim stopniu konserwatywne i biorą udział w syntezie lipochitynowego szkieletu głównego tych związków [14]. Mutacje w tej grupie genów powodują utratę zdolności syntezy NF, co prowadzi do zaniku zdolności zakażenia gospodarza roślinnego. Produkty genów *hsn nod* uczestniczą w modyfikacji obu końców szkieletu głównego determinując specyficzność bakteryjnych symbiontów względem rośliny. Mutacje wśród tych genów prowadzą do syntezy NF o zmienionej strukturze, czego następstwem jest obniżenie aktywności biologicznej lub zmiana gospodarza, ale nie utrata możliwości infekcji.

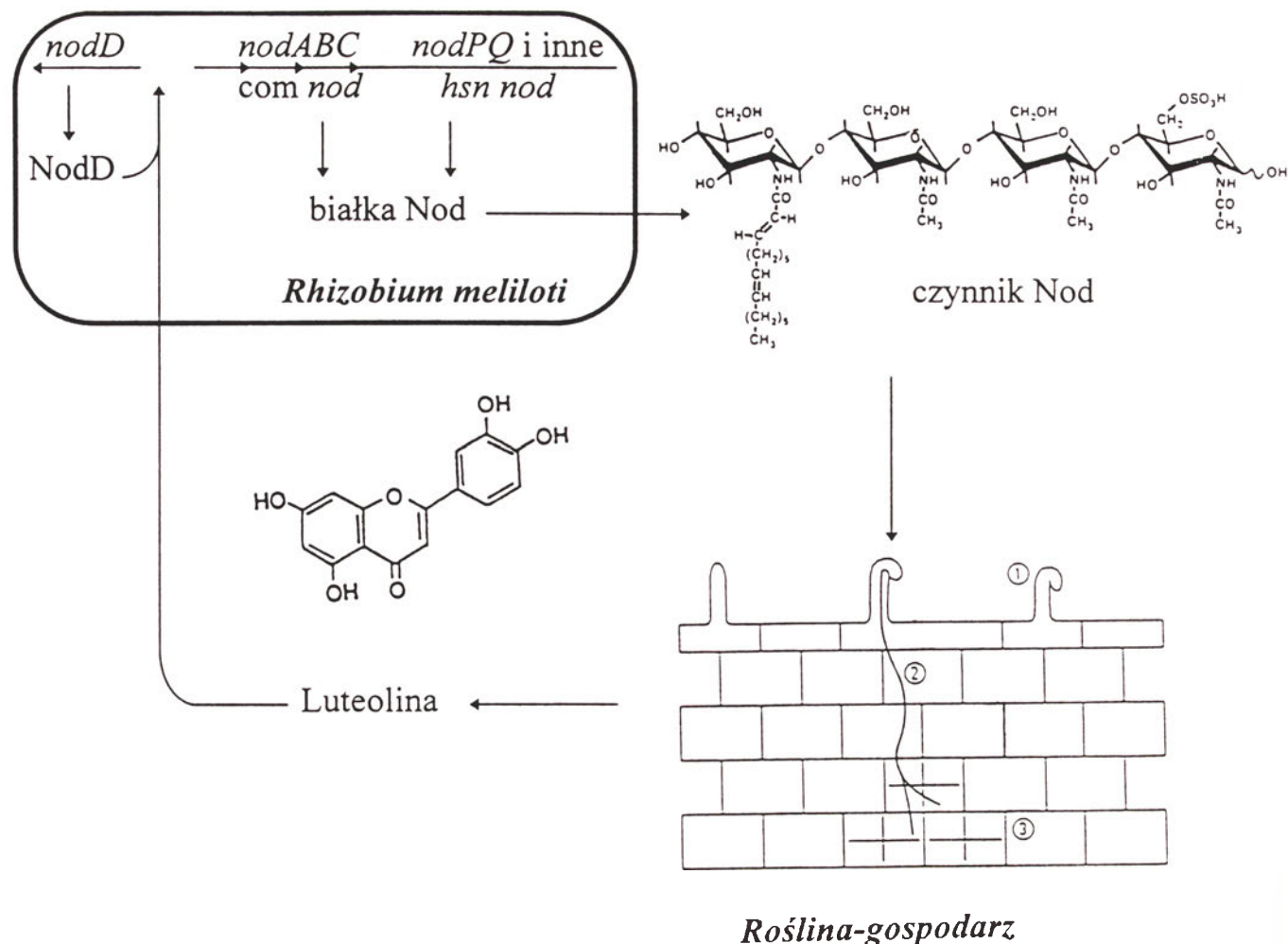
IV. Synteza czynników Nod

Rizobia syntetyzują czynniki Nod w wyniku ekspresji genów *nod* indukowanej wydzielanymi przez roślinę-gospodarza flawonoidami. W indukcji tej pośredniczy bakteryjne białko Nod D kodowane przez gen *nod D*, jedyny gen *nod* ulegający ekspresji konstytutywnej, zarówno u bakterii wolnożyjących jak

i współżyjących w symbiozie z roślinami motylkowatymi [15]. Białko Nod D ma zdolność bezpośredniego oddziaływania z flawonoidami i jest aktywatorem transkrypcji pozostałych genów *nod*, które kodują białka uczestniczące w syntezie oligosacharydu lipochitynowego (Ryc. 4) [7, 11, 51].

IV-1. Oddziaływania flawonoidy — białko Nod D

Regulatorowy gen *nod D* występuje u wszystkich rizobiów i jest niezbędny dla brodawkowania. Mutanty, które nie posiadają funkcjonalnego *nod D* nie mogą infekować swoich gospodarzy [14]. Tylko niektóre gatunki rizobiów, np. *R. leguminosarum* bv *viciae*, czy *R. leguminosarum* bv *trifolii* mają pojedynczy *nod D*. Większość mikrosymbiontów, jak *R. meliloti*, *R. species* NGR 234, czy *B. japonicum* mają 2-5 kopii tego genu [11]. Białka Nod D z różnych gatunków bakterii, mimo że wykazują wysoki stopień homologii, mogą oddziaływać tylko z określonym rodzajem flawonoidów, np. jeden z izoflawonów — daidzeina jest silnym aktywatorem genów *nod* u *B. japonicum*, ale nie aktywuje ich u *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv *viciae* ani u *R. leguminosarum* bv *trifolii* [7]. Ustalono, że wrażliwość rizobiów na roślinne sygnały pokrywa się ze stopniem specyficzności względem infekowanych roślin [7, 51]. Można w związku z tym przypuszczać, że dany gatunek rizobiów syntetyzuje właściwe sobie białko Nod D, które współdziała w aktywacji transkrypcji genów *nod* tylko z określonym flawonoidem, determinując tym samym specyficzność względem gospodarza. Uważa się, że specyficzność bakteryjnych symbiontów względem różnych aktywatorów może być, przynajmniej w niektórych przypadkach, rezultatem różnej zdolności wiązania, transportu i oddziaływań z białkami regulatorowymi [34]. Takie róż-



Ryc. 4. Wymiana związków sygnałowych między symbiontami i odpowiedzi rośliny na przykładzie oddziaływań *Rhizobium meliloti* i lucerny. Flawonoidy wydzielane przez korzenie rośliny-gospodarza za pośrednictwem białka Nod D aktywują bakteryjne geny *com nod* i *hsn nod*. Geny te kodują białka biorące udział w syntezie czynnika Nod, który indukuje odpowiedzi komórek roślinnych: 1) deformację włósników, 2) tworzenie nici infekcyjnej, 3) podziały komórkowe prowadzące do wytworzenia brodawki.

nicowanie zdolności flavonoidów do aktywacji genów *nod* jest przykładem znakomitej adaptacji, która pozwala na transkrypcję tych genów tylko w sytuacji, gdy istnieje szansa zakażenia potencjalnego gospodarza.

IV-2. Białko Nod D jako aktywator transkrypcji genów *nod*

Strukturalne geny *nod ABC*, które uczestniczą w syntezie głównego łańcucha czynników Nod są zorganizowane w operon i znajdują się na dużym plazmidzie symbiotycznym (pSym) u bakterii z rodzaju *Rhizobium* lub na chromosomie u *Azorhizobium* i *Bradyrhizobium* [6]. Białko Nod D po związaniu specyficznego flavonoidu ulega aktywacji i działa jako aktywator transkrypcji dla genów *nod* [32]. Mechanizm aktywacji jest podobny u wszystkich gatunków rizo- biów. Nod D o masie cząsteczkowej około 35 kDa składa się z dwóch funkcjonalnych domen: N-koń- cowej, konserwatywnej domeny wiążącej się z DNA oraz zmiennej domeny C-końcowej oddziałującej z fla- wonoidem i kontrolującej aktywację genów *nod* specy- ficznie względem gospodarza [11]. W badaniach im- munologicznych ustalono, że białko Nod D wiąże się

C-końcem z wewnętrzną błoną komórki bakteryjnej [53]. Uzyskane równoległe rezultaty innych doświad- czeń wskazywały, że również w błonie bakteryjnej akumulowane są flavonoidy [54]. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że flavonoidy wiążą się w błonie bakteryjnej do C-końcowej domeny Nod D, co przy- puszczalnie powoduje zmianę konformacji znajdującej się w cytoplazmie domeny N-końcowej umożliwiając związaną jej z DNA i uruchomienie transkrypcji genów *nod* [51].

Białko Nod D wykazuje znaczny stopień homologii z innymi prokariotycznymi białkami regulatorowymi należącymi do rodziny Lys R [55]. Wszystkie te białka posiadają w N-końcowej części charakterystyczny element strukturalny, „helisa-zwrot-helisa” (HTH — ang. *helix-turn-helix*). Fragment ten pośredniczy w przyłączeniu do DNA białek regulatorowych pełniących funkcje aktywatorów transkrypcji u proka- riontów. Tak charakterystyczna budowa białek regu- latorowych z rodziny Lys R sugeruje, że w regulowa- nych genach występują regiony zawierające specyficzną sekwencję wiążącą tego typu regulatory. Przebadanie różnych prokariotycznych regulatorów transkrypcji metodami genetyki molekularnej doprowadziło do

odkrycia wspólnej sekwencji w promotorach genów regulowanych przez białka typu Lys R [56]. Jest to krótka (50-60 par zasad) charakterystyczna sekwencja T-N₁₁-A, określana jako „motyw Lys R”. Większość operonów genów *nod* poprzedza wysoko konserwatywny region promotorowy określany jako *nod box*, w którym stwierdzono obecność charakterystycznego „motywu Lys R” wiążącego aktywator Nod D [56].

Niektóre bakterie posiadają dodatkowy mechanizm regulacji ekspresji genów *nod*. U *Bradyrhizobium japonicum* indukcja genów *nod* można zachodzić w nieobecności białka Nod D, ale z udziałem produktów genów *nodV* i *nodW* [57]. Analiza sekwencji aminokwasowej białek kodowanych przez te geny wskazuje na to, że mogą one należeć do rodziny dwuskładnikowych regulatorów białkowych [58].

IV-3. Synteza lipochitynowego szkieletu czynników Nod

Synteza szkieletu głównego czynników Nod jest katalizowana przez produkty genów *nodA*, *nodB* i *nodC*, które nie ulegają ekspresji w bakteriach wolnożyjących [59]. Jak wyżej wspomniano, transkrypcja tych genów jest aktywowana przez regulatorowe białko Nod D. Związkiem wyjściowym do syntezy oligosacharydu chitynowego jest N-acetylo-D-glukozaamina (GlcNAc). W pierwszym etapie syntezy powstaje oligomer chitynowy z udziałem białka Nod C, które jest homologiczne do syntazy chityny z drożdży [7, 60]. Ustalono, że reakcja ta wymaga wolnej N-acetylo-D-glukozaaminy, a wydłużanie oligosacharydu zachodzi w kierunku końca nieredukującego [2]. Nod C, podobnie jak syntaza chityny z drożdży, jest białkiem błonowym, ale w przeciwieństwie do niej nie syntetyzuje polimerów lecz tylko oligomery zawierające maksymalnie pięć jednostek N-acetyloglukozaaminowych [2]. Kolejnym etapem jest modyfikacja, która zachodzi z udziałem białka Nod B katalizującego odszczepienie reszty N-acetylowej na nieredukującym końcu oligosacharydu chitynowego [61]. Nod B jest białkiem cytosolowym homologicznym do pochodzącej z grzybów deacetylazy chitynowej, dla której substratem jest oligomer zbudowany przynajmniej z czterech reszt GlcNAc [2]. Jak wykazały badania prowadzone z użyciem Nod B oczyszczonego z *R. meliloti*, enzym ten jest specyficzny względem substratu ponieważ nie usuwa reszty N-acetylowej z monosacharydu acetyloglukozaaminowego [2]. Wolna grupa aminowa, która pozostaje na końcu nieredukującym po deacetylacji zostaje w następnym etapie podstawiona odpowiednią resztą kwasu tłuszczowego przenoszoną przez produkt genu *nodA*, transferazę N-acylową [62]. Nod A, podobnie jak Nod B, jest białkiem cytosolowym i wykazuje specyficzność zarówno względem oligosacharydu chitynowego jak również względem przenoszonej grupy acylowej [2].

IV-4. Modyfikacje łańcucha głównego czynników Nod

Utworzony w przedstawiony powyżej sposób szkielet lipochitynowy jest dalej modyfikowany przez produkty genów *hsn nod*. Białka kodowane przez te geny katalizują przyłączenie dodatkowych podstawników (Ryc. 3), które decydują o specyficzności względem gospodarza, a także wpływają na stabilność i aktywność biologiczną czynników Nod [63-66].

Koniec nieredukujący szkieletu cukrowego jest modyfikowany głównie w reakcji O-acetylowej. *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv *viciae* oraz *R. leguminosarum* bv *trifolii* syntetyzują czynniki Nod podstawione w tej części grupą O-acetylową w reakcji katalizowanej przez transferazę acetylową kodowaną przez gen *nodL*, która specyficznie przyłącza O-acetyl w pozycji C-6 [2]. Niektóre rośliny, np. *Leucaena* mogą wytwarzać brodawki tylko wtedy, gdy są zakażone bardzo specyficznym rodzajem NF zawierających na końcu nieredukującym resztę karbamyłową. Tego typu cząsteczki sygnałowe syntetyzuje np. *R. species* NGR 234 po aktywacji genu *nodU*. Ustalono, że mutanty *nodL*⁻ oraz *nodU*⁻ tracą zdolność infekcji swoich gospodarzy roślinnych [2].

Znacznie szerszy zakres modyfikacji występuje na końcu redukującym oligosacharydu lipochitynowego. W większości przypadków dodatkowe grupy są podstawione w pozycji C-6 w reakcjach siarczanowania, acetylowej i glikozylacji, kontrolowanych przez odpowiednie produkty genów *hsn nod*. Znaczenie tych podstawników dla specyficzności czynników Nod było wielokrotnie potwierdzone w doświadczeniach przeprowadzanych z udziałem mutantów bakteryjnych. Na przykład *R. meliloti* może indukować wytwarzanie brodawek korzeniowych u lucerny tylko wtedy, gdy syntetyzuje NF z resztą siarczanową w pozycji C-6 na końcu redukującym [63]. Ustalono, że synteza w pełni specyficznych cząsteczek zależy od ekspresji genów *nodPQ*, których produkty biorą udział w wytworzeniu „aktywnego” siarczanu oraz genu *nodH* kodującego białko homologiczne do sulfotransferazy [2, 11]. Jakkolwiek mutacje wśród tych trzech genów powodują, że bakteria syntetyzuje czynniki Nod bez reszty siarczanowej, czego następstwem jest utrata zdolności infekcji swojego gospodarza, tj. lucerny. Z kolei, jeśli geny te wprowadzi się np. do *R. leguminosarum* bv *viciae*, które specyficznie indukuje wytwarzanie brodawek u grochu, to taki symbiont może zakażać nowego gospodarza, w tym przypadku lucernę [2, 11].

V. Transport czynników Nod

Transport czynników Nod poza komórkę bakteryjną zachodzi najprawdopodobniej za pośrednictwem produktów genów *nodI* i *nodJ* należących do grupy genów wspólnych *com nod* [11, 59, 67-68]. Obecność tych genów stwierdzono u wszystkich przebadanych

rizobiów, co sugeruje ich wspólne funkcje. Ich rola w transporcie czynników Nod została potwierdzona w badaniach mutantów *nodI*⁻ lub *nodJ*⁻. Mutanty *R. leguminosarum* bv *trifolii* syntetyzują, ale nie wydzielają na zewnątrz czynników Nod, czego efektem jest niewielki stopień zakażenia rośliny-gospodarza [59]. Jednakże u innych gatunków, np. *R. leguminosarum* bv *viciae* mutacje tych genów tylko w niewielkim stopniu obniżają wydzielanie lipochitooligosacharydów, co sugeruje istnienie alternatywnego systemu transportu [2]. Ustalono, że białko Nod I jest mocno hydrofobowym, przypuszczalnie integralnym białkiem błonowym, spokrewnionym z dużą rodziną białek, które w swojej strukturze posiadają fragmenty wiążące ATP i uczestniczą w procesach transportowych [11].

Białka Nod I i Nod J wykazują duże podobieństwo do białek bakteryjnych biorących udział w sekrecji polisacharydów, co dodatkowo wskazuje na ich udział w transporcie czynników Nod [2, 59]. Jednak mechanizm, za pośrednictwem którego białka te uczestniczą w transporcie lipochitooligosacharydów poza komórkę bakteryjną nie jest poznany. Hipotetyczny model przedstawiony przez Carlsona i wsp. [59] zakłada transport zsyntetyzowanych NF przez błonę wewnętrzną do przestrzeni międzybłonowej z udziałem białek Nod I i Nod J, a następnie wydzielanie ich na powierzchnię komórki bakteryjnej przez niezidentyfikowane białko, być może analog specyficznego białka transportującego u *E. coli*.

Badania mechanizmów transportu czynników Nod przyczyniły się do powstania ciekawej sugestii dotyczącej dodatkowej roli reszty acylowej znajdującej się na nieredukującym końcu cukrowego szkieletu czynników Nod. Przypuszcza się, że oprócz roli jaką odgrywa ona w determinowaniu specyficzności względem rośliny-gospodarza, może ona być także istotna dla transportu czynników Nod, ponieważ umożliwia ich wiązanie się z błonami bakteryjnymi [59].

VI. Odpowiedzi rośliny na czynniki Nod

Schemat interakcji bakteria-roślina obejmujących wzajemną wymianę sygnałów oraz odpowiedzi komórek rośliny-gospodarza przedstawiony jest na rycinie 4. Pierwszym etapem oddziaływań pomiędzy rizobiami i rośliną jest kolonizacja włóśników korzeniowych przez bakterie, czego widocznym efektem jest deformacja i skręcanie włóśników. Szereg uzyskanych dotychczas wyników wskazuje na to, że deformacja włóśników może być wywołana także w nieobecności bakterii, przez oczyszczone czynniki Nod, które wykazują aktywność biologiczną przy bardzo niskich stężeniach, 10^{-12} - 10^{-7} M [13, 69]. Skręcanie włóśników korzeniowych następuje już po 10 minutach od podania oczyszczonych oligosacharydów lipochitynowych i prawdopodobnie spowodowane jest reorganizacją cytoskieletu komórek epidermalnych [70]. Ustalono, że w tym czasie zachodzi depolaryzacja błon plaz-

matycznych, wpływ protonów, zmiany w poziomie jonów wapnia i rozmieszczeniu filamentów aktyny [71-73]. Procesy te są częścią złożonych mechanizmów komórkowych kontrolujących deformację włóśników korzeniowych.

Na podstawie uzyskanych do tej pory wyników pewne jest, że czynniki Nod są bakteryjnymi sygnałami indukującymi złożone odpowiedzi gospodarza roślinnego prowadzące do wytworzenia brodawki. Infekcja oraz morfogeneza i funkcjonalny rozwój brodawki zachodzą pod genetyczną kontrolą rośliny. Czynniki Nod aktywują w roślinie tak zwane geny nodulinowe, sklasyfikowane jako geny wczesne (*ENOD*) i późne (*NOD*) w zależności od czasu ich ekspresji [van Kammen, cyt. za 13]. Większość z tych genów jest specyficzna dla symbiozy i ulega ekspresji prawie wyłącznie w tkankach brodawki [9, 15, 74].

VI-1. Wczesne geny nodulinowe

Jednocześnie z procesem infekcji, w komórkach epidermy korzenia ulegają ekspresji wczesne geny nodulinowe. Geny te są aktywowane w najwcześniejszych etapach symbiozy, jeszcze przed wiązaniem azotu, a białka przez nie kodowane, tzw. wczesne noduliny biorą udział w procesie infekcji bakteryjnej (deformacja włóśników, tworzenie nici infekcyjnej) i morfogenezy brodawki (podziały komórkowe, powstanie brodawki pierwotnej) [11, 13].

W ostatnich latach zidentyfikowano i sklonowano wiele wczesnych genów nodulinowych [11, 13, 75-83]. Identyfikacja tych genów okazała się niezwykle pomocna w badaniach percepcji czynników Nod i szlaku transdukcji sygnału, w których pełnią one rolę swoistych markerów, tym bardziej, że niektóre z nich mogą podlegać ekspresji pod wpływem wyizolowanych czynników Nod [12].

Najwcześniej aktywowane są geny *ripl* (ang. *rhizobium-induced peroxidase*), kodujący peroksydazę oraz *ENOD12* i *ENOD5*, których produktami są białka bogate w prolinę [15, 84]. Wszystkie trzy geny są aktywowane bardzo szybko, w ciągu kilku godzin od infekcji specyficznym szczepem bakterii lub podania oczyszczonych NF [8, 13]. Wydaje się, że *ripl* nie jest zaangażowany w dalsze etapy brodawkowania, w przeciwieństwie do *ENOD12* i *ENOD5*, które są indukowane także w czasie tworzenia nici infekcyjnej oraz powstawania brodawki [13].

Gen *ENOD12* został zidentyfikowany między innymi w grochu (*PsENOD12 A* i *B*) oraz lucernie (*MsENOD12*) [77, 82]. Analiza sekwencji aminokwasowej białek kodowanych przez *ENOD12* z tych roślin wykazała obecność powtarzającego się, charakterystycznego pentapeptydu bogatego w prolinę, co sugeruje, że białka te są prawdopodobnie związane ze ścianą komórkową [10, 11]. *PsENOD5* z grochu koduje białko o masie cząsteczkowej 14 kDa, które, poza proliną zawiera także stosunkowo dużo alaniny, glicy-

ny i seryny, podobnie jak glikoproteiny arabinogalaktanowe będące składnikami ścian komórkowych. Ustalono, że obydwie wczesne białka nodulinowe posiadają N-kończącą sekwencję sygnałową i przypuszczalnie są transportowane przez błonę. Badania z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* wykazały, że *PsENOD5* podlega ekspresji tylko w zainfekowanych komórkach, w których znajduje się nić infekcyjna, co sugeruje, że białko kodowane przez ten gen może być składnikiem ściany komórkowej nici infekcyjnej. Z kolei, ekspresję *PsENOD12* obserwowano we włośnikach korzeniowych i w komórkach kory korzenia zarówno zainfekowanych, jak również w tych, które jeszcze nie zawierały nici infekcyjnej [11]. Tak więc białko to może wchodzić w skład nie tylko nici infekcyjnej, ale także ścian komórkowych tych komórek kory, przez które będzie przechodziła nić infekcyjna. *PsENOD12* podlega ekspresji również we wszystkich komórkach brodawki pierwotnej. Obecność białek kodowanych przez *PsENOD12* i *PsENOD5* stwierdzono też w błonie peribakteroidowej otaczającej bakteroidy [11-13].

Badania genów nodulinowych u grochu doprowadziły do identyfikacji innych wczesnych nodulin [11]. *PsENOD2* i *PsENOD14* kodują homologiczne polipeptydy o masie cząsteczkowej 6 kDa. Białka te posiadają N-kończącą sekwencję sygnałową i cztery reszty cysteinowe rozmieszczone w podobny sposób jak w białkach wiążących metale. Nie jest wykluczone, że są to białka transportujące do bakteroidów żelazo lub molibden, niezbędne dla funkcjonowania nitrogenazy [4, 5].

W komórkach parenchymy brodawek soi i grochu stwierdzono ekspresję genu *ENOD2* [10, 11]. Obydwie białka są strukturalnie podobne do białka kodowanego przez *PsENOD12* i przypuszczalnie są także składnikami ściany komórkowej. Ze względu na lokalizację w komórkach parenchymy wydaje się, że białka te mogą współdziałać w tworzeniu bariery tlenowej zapewniającej wewnątrz brodawki odpowiednie środowisko dla funkcjonowania wrażliwej na tlen nitrogenazy.

Wiele uwagi poświęcono ostatnio *ENOD40*, który został sklonowany z grochu, soi i lucerny [11]. Gen ten podlega ekspresji podczas intensywnych podziałów merystematycznych prowadzących do wytworzenia brodawki [11-13]. Badania wykazały brak homologii z jakąkolwiek znaną sekwencją. Ustalono natomiast, że sekwencje kodowane przez *ENOD40* są poliadenylowanymi transkryptami o długości 700 par zasad nie zawierającymi długiej ramki odczytu, co sugeruje, że nie białko, lecz mRNA może być aktywnym produktem pełniącym regulatorowe funkcje we wczesnych etapach powstawania brodawki [11, 13]. Jest to dość oryginalna sugestia, która jak dotąd nie znalazła potwierdzenia w rezultatach uzyskanych przez innych badaczy. Wykazano natomiast, że *ENOD40* wprowadzony do tytoniu, rośliny nie należącej do *Leguminosae*, wywoływał efekty charakterystyczne dla niektó-

rych fitohormonów indukując podziały komórkowe [85-87]. Porównanie sekwencji klonów *ENOD40* z transformowanego tytoniu oraz kilku motylkowatych wykazało obecność wysoko konserwatywnych fragmentów kodujących oligopeptydy złożone z 10 aminokwasów (tytoń) i 12-18 aminokwasów (soja, groch, lucerna i wyka) [86, 87]. W badaniach *in vitro* prowadzonych na protoplastach dzikiego tytoniu wykazano, że peptydy te, w stężeniach 10^{-12} - 10^{-16} M zmieniały odpowiedź na auksyny indukując podziały protoplastów przy hamujących stężeniach hormonu. Niewykluczone, że czynniki Nod mogą indukować podziały komórkowe w szlaku niezależnym od sygnału auksynowego i to w stężeniach ponad dwukrotnie niższych od stężenia auksyn. Wskazują na to uzyskane ostatnio interesujące wyniki badań *in vitro*, które wykazały, że protoplasty tytoniu ulegają podziałom komórkowym w wyniku aktywacji przez czynniki Nod genu *AXII*, który jest indukowany przez auksyny i cytokininy w czasie podziałów komórkowych [88].

Odkrycie peptydu kodowanego przez *ENOD40* ma znaczenie nie tylko dla poznania molekularnych podstaw wytwarzania brodawek w procesie symbiozy. Jest ono niezwykle istotne dla badań mających na celu identyfikację nowych cząsteczek sygnałowych pełniących, podobnie jak klasyczne fitohormony, funkcje regulatorowe w procesach wzrostu i rozwoju roślin. W 1991 r. doniesiono o odkryciu systeminy, pierwszego roślinnego peptydu aktywnego w procesach związanych z odpornością roślin na zranienia [89, 90]. Produkt genu *ENOD40* byłby drugim przykładem aktywnego peptydu uczestniczącego w morfogenezie roślin i dowodem na to, że funkcjonowanie peptydów jako związków sygnałowych nie ogranicza się tylko do świata zwierzęcego.

VI-2. Późne geny nodulinowe

Późne geny nodulinowe (*NOD*) podlegają ekspresji tuż przed lub w czasie wiązania azotu atmosferycznego. Białka kodowane przez te geny są niezbędne dla funkcjonowania brodawki, ale niektóre spośród nich są obecne także poza brodawką, w innych częściach rośliny i podlegają ekspresji nie tylko podczas symbiozy [15].

Śród genów *NOD* najlepiej scharakteryzowana jest rodzina genów kodujących leghemoglobinę, białko, które bardzo obficie występuje w brodawce, stanowiąc do 25% wszystkich białek rozpuszczalnych [12, 14, 89]. Leghemoglobina jest hemoproteiną o wysokim powinowactwie do tlenu, wykazującą znaczną homologię i strukturalne podobieństwo do zwierzęcej hemoglobiny [91]. W dojrzałej brodawce białko to pełni ważną rolę jako istotny element mechanizmu chroniącego nitrogenazę przed zbyt wysokim stężeniem tlenu, a jednocześnie zapewniającego dostateczną ilość generowanej w procesach oksydacyjnych energii niezbęd-

nej dla reakcji katalizowanej przez ten enzym [12].

Inne późne geny nodulinowe kodują enzymy lub podjednostki enzymów uczestniczących w metabolizmie i transporcie azotu (syntaza glutaminianowa, syntaza glutaminowa, aminotransferaza asparaginianowa, oksydaza moczanowa) i węgla (syntaza sacharozy, karboksylaza fosfoenolopirogronianowa) [15, 75]. Te geny nie są specyficzne tylko dla symbiotycznych brodawek, lecz podlegają ekspresji również w innych częściach rośliny, choć nie jest wykluczone, że enzymy kodowane przez geny brodawkowe mogą różnić się kinetyką lub właściwościami immunologicznymi od enzymów syntetyzowanych poza brodawką.

Produktem późnych genów nodulinowych są także niektóre białka znajdujące się w błonie peribakteroidowej [15]. Błona peribakteroidowa otacza mikrosymbionty uwolnione z nici infekcyjnej w procesie endocytozy do cytoplazmy komórek gospodarza. Błona ta odgrywa ważną rolę w kontroli wymiany metabolitów [12]. Sugeruje się, że może mieć ona także znaczenie dla ochrony przed fitoaleksynami, wytwarzanymi w komórkach roślinnych w odpowiedzi na infekcję bakteryjną [75]. PBM pochodzi z błony plazmatycznej komórek roślinnych, ale jej specyficzne właściwości są determinowane obecnością późnych nodulin.

Ostatnio zidentyfikowano nowe geny *NOD* z *Vicia faba* (*VfNOD32*) i *Lotus japonicus* (*LjNOD16*), które kodują białka o nieznanym na razie funkcjach [92, 93].

VII. Uwagi końcowe

W ostatnich latach dokonano istotnego postępu w poznaniu molekularnych podstaw symbiozy roślin motylkowatych z rizobiami. Szczególne osiągnięcia można obserwować w zakresie charakterystyki związków sygnałowych i wzajemnej wymiany sygnałów, która jest podstawą efektywnych oddziaływań symbiotycznych. Czynniki Nod, bakteryjne związki sygnałowe indukują specyficzne odpowiedzi komórek roślinnych poprzez aktywację ekspresji genów, jednak mechanizm tej aktywacji nie jest znany. Szczególnie istotne jest uzyskanie odpowiedzi na pytania dotyczące percepcji i transdukcji sygnału. Znaczne rozmiary i złożona budowa chemiczna czynników Nod są raczej przeszkodą w ich swobodnym wnikanu do komórek, zarówno systemem symplastu jak i apoplastu. Nie stwierdzono, jak dotąd, obecności czynników Nod w cytoplazmie komórek odpowiadających na te związki. Ze względu na to, że czynniki Nod wykazują aktywność przy bardzo niskich stężeniach, a ich specyficzność względem gospodarza jest determinowana obecnością określonych podstawników w szkieletcie cukrowcowym, sugeruje się, że cząsteczki te są rozpoznawane przez receptory znajdujące się w komórkach roślinnych [2, 8, 13]. Niestety wyniki poszukiwań receptorów NF są na razie skromne i sprowadzają się do identyfikacji dwóch białek wiążących czynniki Nod

z *R. meliloti*, wyizolowanych z frakcji mikrosomalnej ekstraktów korzeni *Medicago truncatula* i ekstraktów z kultur tkankowych *Medicago varia* [94, 95].

Nie jest jasne, czy oligosacharydy lipochitynowe indukują odpowiedź komórek bezpośrednio, czy odbywa się to w szlaku transdukcji sygnału za pośrednictwem wtórnych przekaźników. Przypuszczalnie czynniki Nod są tylko sygnałem pierwotnym, który wpływa na zmianę stosunku auksyny/cytokiny poprzez podniesienie poziomu cytokinin [19, 20]. Zachwianie równowagi tych fitohormonów mogłoby stanowić wtórny sygnał indukujący podziały komórkowe i powstanie brodawki. Jak już wcześniej wspomniano, czynniki Nod aktywują transkrypcję wczesnego genu nodulinowego *ENOD40*, którego produkt zmienia odpowiedź komórek na auksyny indukując podziały komórkowe [86]. Powyższą sugestią potwierdzać mogą także wyniki doświadczeń, w których mutanty *nod⁻* *R. meliloti*, nie syntetyzujące czynników Nod, odzyskiwały częściowo zdolność infekcji po wprowadzeniu do ich genomu genu uczestniczącego w syntezie jednej z cytokinin, zeatyny [19]. Ponadto obserwowano, że kwas 2,3,5-trójiodobenzoesowy (TIBA) oraz kwas *N*-(1-naftył)-ftalamowy (NPA), które są inhibitorami polarnego transportu auksyn, indukują powstawanie na korzeniach lucerny struktur podobnych do brodawek, w których może zachodzić ekspresja wczesnych genów nodulinowych [96]. Niewykluczone, że czynniki Nod mogą zmieniać stosunek fitohormonów poprzez wpływ na syntezę endogennych inhibitorów polarnego transportu auksyn, za które uważa się flawonoidy [97]. Potwierdzałyby to wyniki badań wskazujące na to, że NF stymulują ekspresję syntazy chalkonowej, kluczowego enzymu w syntezie flawonoidów [98-101]. Tak więc flawonoidy syntetyzowane w korzeniu, nie tylko umożliwiają chemotaksję rizobii w kierunku rośliny-gospodarza i aktywują bakteryjne geny *nod*, ale być może także regulują stosunek auksyny/cytokiny w komórkach korzenia.

Przedstawiony przegląd uzyskanych w ciągu ostatniej dekady rezultatów badań nad wczesnymi etapami symbiozy skłania do sugestii, że czynniki Nod mogą być rozważane jako regulatory wzrostu roślin [102, 103]. Ze względu na to, że zawierają w swojej cząsteczce szkielet cukrowcowy wymieniane są jako przedstawiciele oligosacharyn, nowej klasy roślinnych regulatorów wzrostu, do której należą aktywne biologicznie oligosacharydy biorące udział w kontroli ekspresji genów [104]. Więcej informacji o tej klasie związków zainteresowany Czytelnik może znaleźć w pracy opublikowanej w „*Postęпах Biologii Komórki*” [90].

Artykuł otrzymano 25 lipca 1997 r.

Zaakceptowano do druku 12 stycznia 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Martinez-Romero E, Caballero-Mellado J (1996) *Crit Rev Plant Sci* 15: 113-140

2. Dénarié J, Debellé F (1996) *Annu Rev Biochem* **65**: 503-535
3. Boivin C, Ndoye I, Molouba F, de Lajudie P, Dupuy N, Dreyfus B (1997) *Crit Rev Plant Sci* **16**: 1-30
4. Howard JB, Rees DC (1994) *Annu Rev Biochem* **63**: 235-264
5. Burris RH (1991) *J Biol Chem* **266**: 9339-9342
6. Hunt S, Layzell DB (1993) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 483-511
7. Dénarié J, Debellé F, Rosenberg Ch (1992) *Annu Rev Microbiol* **46**: 497-531
8. Geurts R, Franssen H (1996) *Plant Physiol* **112**: 447-453
9. Long SR (1996) *Plant Cell* **8**: 1885-1898
10. Nap J-P, Bisseling T (1990) *Science* **250**: 948-954
11. Schultze M, Condorosi E, Ratet P, Buiré M (1994) *Int Rev Cytol* **156**: 1-75
12. Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995) *Plant Cell* **7**: 869-885
13. Franssen H, Mylona P, Pawlowski K, Van de Sande K, Heidstra R, Geurts R, Kozik A, Matvienko M, Yang WC, Hadri A-E, Martinez-Abarca F, Bisseling T (1995) *Phil Trans R Soc London B* **350**: 101-107
14. Long SR (1989) *Cell* **56**: 203-214
15. Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991) *Annu Rev Microbiol* **45**: 345-382
16. Brewin NJ (1991) *Annu Rev Cell Biol* **7**: 191-226
17. Dénarié J, Roche P (1992) W: Verma DPS (red) Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. CRC Pres Boca Raton, Ann Arbor, London, str. 295-324
18. Verma DPS (1992) *Plant Cell* **4**: 373-382
19. Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T (1992) *Plant Mol Biol* **19**: 89-107
20. Hirsch AM (1992) *New Phytol* **122**: 211-237
21. Spaink HP, Lugtenberg BJJ (1994) *Plant Mol Biol* **26**: 1413-1422
22. De Bruijn FJ, Downie JA (1991) *Curr Opin Biotechnol* **2**: 184-192
23. Spaink HP (1995) *Annu Rev Phytopathol* **33**: 345-368
24. Spaink H (1996) *Crit Rev Plant Sci* **15**: 559-582
25. Golinowski W, Lotocka B (1991) *Kosmos* **40**: 331-346
26. Lotocka B, Golinowski W (1995) *Kosmos* **44**: 569-578
27. Kopcinska J, Golinowski W (1995) *Kosmos* **44**: 579-587
28. Lorkiewicz Z (1997) *Acta Biochim Pol* **44**: 1-12
29. Redmond JW, Betley M, Djordjevic MA, Innes RW, Kuempel PL, Rolfe B (1986) *Nature (Lond)* **323**: 632-634
30. Peters NK, Frost JW, Long SR (1986) *Science* **233**: 917-1008
31. Peters NK, Long SR (1988) *Plant Physiol* **88**: 396-400
32. Fisher RF, Long SR (1992) *Nature (Lond)* **357**: 655-660
33. Peters NK, Verma DPS (1990) *Mol Plant-Microbe Interact* **3**: 4-8
34. Siqueira JO, Nair MG, Hammerschmidt R, Safir GR (1991) *Crit Rev Plant Sci* **10**: 63-121
35. Dakora FD, Philips DA (1996) *Physiol Mol Plant Pathol* **49**: 1-20
36. Wojtaszek P (1993) *Post Biochem* **39**: 139-146
37. Firmin JL, Wilson KE, Rossen L, Johnston A WB (1986) *Nature (Lond)* **324**: 90-92
38. Kosslak RM, Bookland R, Barkei J, Paaren HE, Appelbaum ER (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7428-7432
39. Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé J-C, Dénarié J (1990) *Nature (Lond)* **344**: 781-784
40. Price NPJ, Talmont F, Wieruszkeski J-M, Promé D, Promé J-C (1996) *Carbohydr Res* **289**: 115-136
41. Carlson RW, Sanjuan J, Bhat UR, Glushka J, Spainak HP, Wijfjes AHM, Van Brussel AAN, Stokkermans TJW, Peters NK, Stacey G (1993) *J Biol Chem* **268**: 18372-18381
42. Stokkermans TJW, Ikeshita S, Cohn J, Carlson RW, Stacey G, Ogawa T, Peters NK (1995) *Plant Physiol* **108**: 1587-1595
43. Van der Drift K MGM, Spaink HP, Bloemberg GV, Van Brussel AAN, Lugtenberg BJJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE (1996) *J Biol Chem* **271**: 22563-22569
44. Spaink HP (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 977-986
45. Cárdenas L, Dominguez J, Quinto C, López-Lara IM, Lugtenberg BJJ, Spaink HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE (1995) *Plant Mol Biol* **29**: 453-464
46. Spaink HP, Wijfjes AHM, Van Vliet TB, Kijne JW, Lugtenberg BJJ (1993) *Aust J Plant Physiol* **20**: 381-392
47. Noel KD (1992) W: Verma DPS (red) Molecular Signal in Plant-Microbe Communications. CRC Press. Boca Raton, Ann Arbor, London, str 341-357
48. Leigh JA, Coplin DL (1992) *Annu Rev Microbiol* **46**: 307-346
49. Gonzáles JE, York GM, Walker GC (1996) *Gene* **179**: 141-146
50. Van Workum WAT, Canter Cremers HCJ, Wijfjes AHM, Van der Kolk Ch, Wijffelman CA, Kijne JW (1997) *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 290-301
51. Kondorosi A (1992) W: Verma DPS (red) Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. CRC Press. Boca Raton, Ann Arbor, London, str 325-340
52. Györgypal Z, Kondorosi E, Kondorosi A (1991) *Mol Plant-Microbe Interact* **4**: 356-364
53. Schlaman HRM, Spaink HP, Okker RJH, Lugtenberg BJJ (1989) *J Bakteriol* **171**: 4686-4693
54. Recourt K, Van Brussel AAN, Driessen AJM, Lugtenberg BJJ (1989) *J Bakteriol* **171**: 4370-4377
55. Schell MA (1993) *Annu Rev Microbiol* **47**: 597-626
56. Goethals K, Van Montagu M, Holsters M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1646-1650
57. Sanjuan J, Grob P, Göttfert M, Hennecke H, Stacey G (1994) *Mol Plant-Microbe Interact* **7**: 364-369
58. Göttfert M, Grob P, Hennecke H (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2680-2684
59. Carlson RW, Price NPJ, Stacey G (1994) *Mol Plant-Microbe Interact* **7**: 684-695
60. Geremia RA, Mergaert P, Geelen D, Van Montagu M, Holsters M (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2669-2673
61. John M, Röhrig H, Schmidt J, Wieneke U, Schell J (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 625-629
62. Röhrig H, Schmidt J, Wieneke U, Kondorosi E, Barlier I, Schell J, John M (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3122-3126
63. Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, de Billy F, Promé J-C, Dénarié J (1991) *Nature (Lond)* **351**: 670-673
64. Laeremans T, Caluwaerts I, Verreth C, Rogel MA, Vanderleyden J, Martinez-Romero E (1996) *Mol Plant-Microbe Interact* **9**: 492-500
65. Mergaert P, D'Haese W, Fernández-López M, Geelen D, Goethals K, Promé J-C, Van Montagu M, Holsters M (1996) *Mol Microbiol* **21**: 409-419
66. López-Lara IM, Blok-Tip L, Quinto C, Garcia ML, Stacey G, Bloemberg GV, Lamers GEM, Lugtenberg BJJ, Thomas-Oates JE, Spaink HP (1996) *Mol Microbiol* **21**: 397-408
67. Cloutier J, Laberge S, Prévost D, Antoun H (1996) *Mol Plant-Microbe Interact* **9**: 523-531
68. Cárdenas L, Dominguez J, Santana O, Quinto C (1996) *Gene* **173**: 183-187
69. Relić B, Talmont F, Kopcinska J, Golinowski W, Promé J-C, Broughton WJ (1993) *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 764-774
70. Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaink HP, Van Kammen A, Bisseling T (1994) *Plant Physiol* **105**: 787-797
71. Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M (1995) *Plant J* **7**: 939-947
72. Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M (1996) *Plant J* **10**: 295-301
73. Ehrhardt DW, Wais R, Long SR (1996) *Cell* **85**: 673-681
74. Pawlowski K (1997) *Physiol Plant* **99**: 617-631

75. Sánchez F, Padilla JE, Pérez H, Lara M (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 507-528
76. Krause A, Broughton WJ (1992) *Mol Plant-Microbe Interact* **5**: 96-103
77. Allison LA, Kiss GB, Bauer P, Poiret M, Pierre M, Savauré A, Kondorosi E, Kondorosi A (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 375-380
78. Minami E, Kouchi H, Carlson RW, Cohn JR, Kolli VK, Day RB, Ogawa T, Stacey G (1996) *Mol Plant-Microbe Interact* **9**: 574-583
79. Minami E, Kouchi H, Cohn JR, Ogawa T, Stacey G (1996) *Plant J* **10**: 23-32
80. Peng H-M, Dreyer DA, Vanden-Bosch KA, Cook D (1996) *Plant Physiol* **112**: 1437-1446
81. Christiansen H, Hansen AC, Vijn I, Pallisgaard N, Larsen K, Yang W-C, Bisseling T, Marcker KA, Jensen EØ (1996) *Plant Mol Biol* **32**: 809-821
82. Bauer P, Poirier S, Ratet P, Kondorosi A (1997) *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 39-49
83. Schröder G, Frühling M, Pühler A, Perlick AM (1997) *Plant Mol Biol* **33**: 113-123
84. Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, Vanden-Bosch K (1995) *Plant Cell* **7**: 43-55
85. Marx J (1996) *Science* **273**: 1338-1339
86. Van de Sande K, Pawlowski K, Czaja I, Wieneke U, Schell J, Schmidt J, Walden R, Matvienko M, Wellink J, Van Kammen A, Franssen H, Bisseling T (1996) *Science* **273**: 370-373
87. Ryan C (1996) *Trends Plant Sci* **1**: 365-366
88. Röhrig H, Schmidt J, Walden R, Czaja I, Lubenow H, Wieneke U, Schell J, John M (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13389-13392
89. Pearce G (1991) *Science* **253**: 895-898
90. Jakubowska A, Murach AP, Kowalczyk S (1996) *Postępy Biol Komórki* **23**: 657-682
91. Konieczny A (1989) *Post Biochem* **35**: 109-125
92. Perlick AM, Frühling M, Schröder G, Frosch Sch, Pühler A (1996) *Plant Physiol* **110**: 147-154
93. Kapranov P, de Bruijn FJ, Szczyglowski K (1997) *Plant Physiol* **113**: 1081-1090
94. Bono J-J, Rioud J, Nicolaou KC, Bockovich NJ, Estevez VA, Cullimore JV, Ranjeva R (1995) *Plant J* **7**: 252-260
95. Niebel A, Bono J-J, Ranjeva R, Cullimore JV (1997) *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 132-134
96. Hirsch AM, Bhuvanewari TV, Torrey JG, Bisseling T (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1244-1248
97. Jacobs M, Rubery HP (1988) *Science* **241**: 346-349
98. McKhan HI, Paiva NL, Dixon RA, Hirsch AM (1997) *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 50-58
99. Savauré A, Sallaud Ch, El-Turk J, Zuanazzi J, Ratet P, Schultze M, Kondorosi A, Esnault R, Kondorosi E (1997) *Polant J* **11**: 277-287
100. Krause A, Lan VTT, Broughton WJ (1997) *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 388-393
101. Bolanosvasquez MC, Warner D (1997) *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 339-346
102. Dénarié J, Cullimore J (1993) *Cell* **74**: 951-954
103. Promé J-C (1996) *Cur Opin Struct Biol* **6**: 671-678
104. Aldington S, Fry SC (1993) *Adv Bot Res* **19**: 1-101

**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**

XXXIII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO Katowice, 9—12 wrzesień 1997

Sprawozdanie

W dniach 9-12 września 1997 roku obradował w Katowicach XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego pod honorowym patronatem Jego Magnificencji Rektora Śląskiej Akademii Medycznej Profesora Zbigniewa Religi, Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Śląskiego Profesora Tadeusza Sławka, Jego Magnificencji Rektora Akademii Wychowania Fizycznego Profesora Janusza Nowotnego, i Dyrektora Instytutu Biologii Doświadczalnej i Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN Profesora Macieja Nałęcza.

W Zjeździe wzięło udział około 750 osób z kraju i zagranicy, w tym ośmiu biochemików pochodzenia polskiego z Białorusi, których pobyt sfinansowało Stowarzyszenie „Wspólnota Polska”.

Wydawnictwami Zjazdu były: trzy Komunikaty, informujące na bieżąco o Zjeździe i zaawansowaniu prac organizacyjnych; Program Zjazdu liczący 55 stron; oraz książka Streszczenia referatów, w której na 223 stronach znalazło się 586 streszczeń wykładów i doniesień zjazdowych.

Obrady Zjazdu odbywały się w budynkach Zakładów Teorii Medycyny oraz w budynku Centralnego Szpitala Klinicznego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach-Ligocie w dniach 10-12 września 1997 r.

Uroczyste otwarcie Zjazdu odbyło się 9 września o godz. 18.00 w Górnośląskim Centrum Kultury. Wszystkich uczestników Zjazdu i zaproszonych gości powitała Przewodnicząca oddziału katowickiego PTBioch i Komitetu Organizacyjnego dr hab. Iwona Żak. W imieniu JM Rektora SAM przywitał zebranych Prorektor ds Nauki Prof. Tadeusz Wilczok, następnie Rektor Uniwersytetu Śląskiego Prof. Tadeusz Sławek po powitaniu, złożył wszystkim uczestnikom życzenia satysfakcji naukowych podczas obrad Zjazdu.

Profesor Liliana Konarska, Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego po szczególnie serdecznym powitaniu wszystkich zebranych, omówiła biochemiczne wydarzenia oraz działalność Towarzystwa Biochemicznego w minionym roku, po czym przystąpiła do uroczystości wręczenia nagród laureatom Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Nagrodę im. Prof. Jakuba Parnasa w konkursie za najlepszą pracę doświadczalną otrzymał zespół w składzie Danuta Płochocka, Marek Wetnicki, Piotr Zielenkiewicz, Włodzimierz Ostoja-Zagórski z Instytutu Biochemii i Biofizyki w Warszawie za publikację „Three-dimensional model of the polyviral genome-linked protein” ogłoszoną w *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 1996, 93, 12150-12154. Sponsorem nagrody jest Molecular Research Center z San Sineti, USA. Nagrodę im. Prof. Bolesława Skarżyńskiego otrzymali Bogdan Falkiewicz i Bogdan Liberek z Zespołu Chemii Amino-kwasów i Peptydów Uniwersytetu Gdańskiego za prace „Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy I” oraz „Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy II” opublikowane w *Postęпах Biochemii* 1996, 42, (1), 41-47; (4), 340-349. W pierwszej edycji Konkursu Sekcji Kwasów Nukleinowych Zarządu Głównego i Firmy Sigma-Aldrich nagrodę otrzymali L. Woźniak, J. Pyzowski, W. J. Stec z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Łodzi za publikację „New approach to the synthesis of oligonucleoside methane phosphonates” ogłoszoną w *J. Organic Chemistry* 1996, 61, 879-881.

Wydarzeniem naukowym ceremonii był wykład inauguracyjny Prof. Aleksandra Kojas z Uniwersytetu Jagiellońskiego pt. „Rola cytokin w indukcji i hamowaniu stanu zapalnego”.

Na zakończenie, w części artystycznej wystąpił Chór Zespołu Pieśni i Tańca „Śląsk” sponsorowany przez Firmę Perkin-Elmer, po czym uczestnicy Zjazdu witali się tradycyjną lampką wina.

Program naukowy Zjazdu obejmował 8 sesji tematycznych:

- 1) Struktura i funkcja genu i genomu (org. dr hab. Zdzisław Krawczyk) — sympozjum sponsorowane przez Polską Sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN;
- 2) Patobiochemia tkanki łącznej (org. dr hab. Krystyna Olczyk, prof. dr hab. Edward Bańkowski, prof. dr hab. Marian Drózd);
- 3) Problemy biochemiczne w biologii i medycynie środowiskowej (org. dr hab. Sylwia Łabużek);
- 4) Biotechnologia (org. prof. dr hab. Jerzy Chmielowski);
- 5) Rodniki tlenowe i antyoksydanty (org. dr hab. Roman Tarnawski);

- 6) Postępy biochemii klinicznej (org. dr hab. Iwona Zak, prof. dr hab. Władysław Grzeszczak) — sympozjum sponsorowane przez Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej);
- 7) Biochemia wysiłku fizycznego (org. dr hab. Barbara Kłapcińska).
- 8) Doniesienia różne (org. dr hab. Ludmiła Węglarz).

Obrady toczyły się w czterech równolegle biegnących sesjach tematycznych, co niestety zmuszało uczestników Zjazdu do trudnych wyborów i rezygnowania z niektórych wykładów. Poszczególnym sesjom wykładowym towarzyszyły przynależne im tematycznie sesje plakatowe, każdego dnia prezentowano również doniesienia różne.

W czasie Zjazdu przeprowadzono dwa konkursy. Konkurs im. Prof. Włodzimierza Mozołowskiego za najlepszą pracę przedstawioną na Zjeździe przez młodego biochemika (do 30-tego roku życia) odbył się pod przewodnictwem Profesora Jerzego Popinigisa (Gdańsk). Przyznano dwie równoległe nagrody, które otrzymali Magdalena Pęska z Instytutu Biologii Doświadczalnej w Warszawie za pracę „Współdziałanie (cross-talk) różnych dróg sygnałowych w regulacji ekspresji genu dekarboksylazy ornitynowej (*ODC*) w nerce mysiej” oraz Marcin Schmidt z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu za pracę „Ludzki homolog genu *lethal(2)neighbour of tid Drosophila melanogaster* jako nowy marker zmian nowotworowych”. Konkurs im. Prof. Janiny Opieńskiej-Blauth za najlepszą prezentację przedstawioną przez autora-studenta, który w momencie przysyłania streszczenia nie posiadał jeszcze dyplomu ukończenia studiów, odbył się pod przewodnictwem Profesora Tomasza Borkowskiego (Lublin). Laureatem konkursu został Tomasz Wojciechowski, student V roku z koła naukowego przy Katedrze Biochemii AM w Gdańsku za prezentację „Histochemiczna metoda wykrywania produktów peroksydacji lipidów”. Nagrody zostały wręczone przez Profesor Lilianę Konarską podczas uroczystości zakończenia Zjazdu.

Ważną inicjatywą o znaczeniu popularyzacyjnym było zaproponowanie przez Redakcję czasopisma *Acta Biochimica Polonica* wydanie referowanych lub zgłoszonych na sesję plakatową prac Sympozjum Struktura i funkcja genu i genomu. W wyznaczonym terminie wpłynęło do Redakcji 9 oryginalnych prac badawczych. Prace, które otrzymają pozytywne recenzje będą opublikowane w ostatnim numerze 1997 r. ABP. Z podobną propozycją upowszechnienia prac wygłoszonych na Sympozjum Postępy Biochemii Klinicznej wystąpiła Redakcja *Wiadomości Lekarskich*.

Wśród imprez towarzyszących dużym zainteresowaniem cieszyły się liczne wystawy firm oferujących na Zjeździe aparaturę, sprzęt i chemikalia niezbędne do badań. Inną atrakcją, z której korzystali uczestnicy Zjazdu, było zwiedzanie Zamku Pszczyńskiego lub Sztolni Czarnego Pstrąga w Tarnowskich Górach. Spotkania towarzyskie dopełniły zestawu imprez towarzyszących, mających na celu zintegrowanie społeczności biochemicznej.

Informacje o Zjeździe podało Radio i Telewizja Katowice. Z okazji XXXIII Zjazdu PTBioch Telewizja Katowice wyemitowała okolicznościowy program poświęcony biochemii śląskiej, w której uczestniczyli dr hab. Joanna Rzeszowska-Wolny z Instytutu Onkologii w Gliwicach, prof. dr hab. Tadeusz Wilczok z Katedry Biochemii i Biofizyki ŚAM w Sosnowcu, dr hab. Iwona Zak z Katedry i Zakładu Biochemii i Chemii ŚAM w Katowicach. Na antenie przedstawiono pracownice Katedry Biochemii i Chemii ŚAM, natomiast kierownik Katedry prof. dr hab. Marian Drózdź omówił wiodące kierunki badawcze Katedry.

Na zakończenie chciałabym w imieniu organizatorów Zjazdu bardzo serdecznie podziękować koleżankom i kolegom z katowickiego oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, członkom, studentom i sympatykom za wspaniałą pomoc w dniach poprzedzających Zjazd i w gorących dniach trwania Zjazdu.

Organizatorom XXXIV Zjazdu PTBioch w Białymstoku życzę samych sukcesów.

Iwona Zak



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”.

Acta Biochimica Polonica

Vol. 44 No. 4/1997

QUARTERLY

PL ISSN0001-527X

31 11 13

Proteins: structural aspects

- Review
- Intramolecular electron transfer between tryptophan radical and tyrosine in oligoproline-bridged model peptides and hen egg-white lysozyme**
Kazimierz L. Wierzchowski **627**
- Regular papers
- Molten globule as an intermediate on the human prostatic phosphatase folding pathway**
Radosława Kuciel and Aleksandra Mazurkiewicz **645**
- Covalent modification and site-directed mutagenesis of an active site tryptophan of human prostatic acid phosphatase**
Zhongtao Zhang, Kirill Ostanin and Robert L. Van Etten **659**
- Prostatic acid phosphatase: structural aspects of inhibition by L-(+)-tartrate ions**
Leslie Lovelace, Krzysztof Lewiński, Clarissa G. Jakob, Radosława Kuciel, Włodzimierz Ostrowski and Łukasz Lebioda **673**
- The role of lysine-256 in the structure and function of sheep liver recombinant serine hydroxymethyltransferase**
Rashmi Talwar, Junutala R. Jagath, Asis Datta, V. Prakash, Handanahal S. Savithri and Naropantul Appaji Rao **679**
- Primary structure of porcine spleen ribonuclease: sequence homology**
Ayumu Kusano, Masanori Iwama, Akihiro Sanda, Kaori Suwa, Eiko Nakaizumi, Yuka Nakatani, Hiroko Ohkawa, Kazuko Ohgi and Masachika Irie **689**

Proteins: structural aspects

Reviews	Female hormones act as natural antioxidants — a survey of our research Kunio Yagi	701
	Tumor-specific pyruvate kinase isoenzyme M₂ involved in biochemical strategy of energy generation in neoplastic cells Maria Gumińska, Jan Ignacak, Teresa Kędryna and Maria B. Stachurska	711
	Selective cobalamin malabsorption and the cobalamin-intrinsic factor receptor Ralph Gräsbeck	725
Regular papers	Synergistic effect of 5-fluorodeoxyuridine and quinoxaline antifolates on murine leukemia self-cultured <i>in vitro</i> Małgorzata Balińska, Irmina Szablewska, Dorota Janiszewska, Agnieszka Brzezińska and Krzysztof Pawełczak	735
	The effects of combined antifolates on inhibition of growth of murine leukemia cells cultured <i>in vitro</i> Małgorzata Balińska, Irmina Szablewska, Dorota Janiszewska, Katarzyna Bartuzi and Krzysztof Pawełczak	743
	The effect of dihydrotestosterone on transcription of prostatic acid phosphatase mRNA in human hyperplastic gland Joanna Dulińska, Piotr Laidler, Włodzimierz S. Ostrowski, Sławomir Mrozicki and Marek Gałka	751
	2-Methyl-thiazolidine-2,4-dicarboxylic acid protects against paracetamol induced toxicity in human liver derived HepG2 cells Lidia Włodek and Hans Rommelspacher	759
Short communications	The effect of experimental neoplastic disease on malondialdehyde level and glutathione status in erythrocytes of rats Jolanta Batko	767
	The activity of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in erythrocytes from patients with polycythemia vera Julian Frendo and Maria Wróbel	771

Inhibition of mammalian topoisomerase I by 1-nitro-9-aminoacridines. Dependence on thiol activation

Ewa Ciesielska, Elżbieta Pastwa and Leszek Szmigiero

775

Genes and gene expression

Minireview

Kainate-evoked modulation of gene expression in rat brain

Bożena Kaminska, Robert K. Filipkowski, Ireneusz W. Biedermann, Dorota Konopka, Dorota Nowicka, Michał Hetman, Michał Dąbrowski, Dariusz C. Gorecki, Katarzyna Lukasiuk, Arkadiusz W. Szklarczyk and Leszek Kaczmarek

781

Short communication **New intron-containing human tRNA^{Leu} genes**

Urszula Karwowska and Zofia Szwejkowska-Kulińska

791

Plant biochemistry

Review

Two plant signalling peptides: systemin and ENOD 40

Jan Barciszewski and Andrzej B. Legocki

795

Regular papers

On the specific pattern of long chain polyprenols in green needles of *Pinus mugo* Turra

Beata Kazimierczak, Józefina Hertel, Ewa Świeżewska, Tadeusz Chojnacki and Andrzej Marczewski

803

Phosphorylation of sucrose synthase from maize seedlings

Susanne Lindblom, Pia Ek, Grażyna Muszyńska, Bo Ek, Jadwiga Szczegielniak and Lorentz Engström

809

Characterization of two lipopolysaccharide types isolated from *Rhizobium galegae*

Leena A. Räsänen, Ryszard Russa, Teresa Urbanik, Adam Choma, Hubert Mayer and Kristina Lindström

819

Proteins: structural aspects

Review

An enigma: the role of viral RNA aminoacylation

Anne-Lise Haenni and François Chapeville

827

A novel restriction endonuclease *UnbI*, a neoschizomer of *Sau96I* from an unidentified psychrofilic bacterium from Antarctica is inhibited by phosphate ions

Magdalena Kawalec, Piotr Borsuk, Stanisław Piechula and Piotr P. Stepień

Continuous assay for acid phosphatase using 1-naphthyl phosphate as a substrate

Ewa Luchter-Wasylewska

Index od authors

Balińska, M.	735, 743	Janiszewska, D.	735, 743	Ostrowski, Wł.S.	673, 751
Barciszewski, J.	795	Kaczmarek, L.	781	Pastwa, E.	775
Bartuzi, K.	743	Kaminska, B.	781	Pawelczak, K.	735, 743
Batko, J.	767	Karwowska, U.	791	Piechula, St.	849
Biedermann, I.W.	781	Kawalec, M.	849	Prakash, V.	679
Borsuk, P.	849	Kazimierczak, B.	803	Rao, N.A.	679
Brzezińska, A.	735	Kędryna, T.	711	Räsänen, L.A.	819
Chapeville, F.	827	Kleinkauf, H.	839	Rommelspacher, H.	759
Chojnacki, T.	803	Konopka, D.	781	Russa, R.	819
Choma, A.	819	Kuciel, R.	645, 673	Sanda, A.	689
Ciesielska, E.	775	Kusano, A.	689	Savithri, H.S.	679
Datta, A.	679	Laidler, P.	751	Stachurska, M.B.	711
Dabrowski, M.	781	Lebioda, L.	673	Stepień, P.P.	849
Dulińska, J.	751	Legocki, A.B.	795	Suwa, K.	689
Ek, B.	809	Lewiński, K.	673	Szablewska, I.	735, 743
Ek, P.	809	Lindblom, S.	809	Szczegielniak, J.	809
Engström, L.	809	Lindström, K.	819	Szklarczyk, A.W.	781
Filipkowski, R.K.	781	Lovelace, L.	673	Szmigiero, L.	775
Frendo, J.	771	Luchter-Wasylewska, E.	853	Szweykowska-	
Gałka, M.	751	Lukasiuk, K.	781	Kulińska, Z.	791
Gorecki, D.C.	781	Marczewski, A.	803	Świeżewska, E.	803
Gräsbeck, R.	725	Mayer, H.	819	Talwar, R.	679
Gumińska, M.	711	Mazurkiewicz, A.	645	Urbanik, T.	819
Haenni, A.-L.	827	Mrozicki, Sł.	751	Van Etten, R.L.	659
Hertel, J.	803	Muszyńska, G.	809	Von Döhren, H.	839
Hetman, M.	781	Nakaizumi, E.	689	Wierzchowski, K.L.	627
Ignacak, J.	711	Nakatani, Y.	689	Włodek, W.	759
Irie, M.	689	Nowicka, D.	781	Wróbel, M.	771
Iwama, M.	689	Ohgi, K.	698	Yagi, K.	701
Jagath, J.R.	679	Ohkawa, H.	689	Zhang, Zh.	659
Jakob, C.G.	673	Ostanin, K.	659		

okwitowanie dla wpłacającego

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł

podpis przyjmującego

okwitowanie dla wpłacającego

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł

podpis przyjmującego

