

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 44, NR 2, 1998

Redagowanie jądrowych mRNA	94
Małe jąderkowe RNA	102
Fotoreceptory sinic	113
Szczepionki DNA	117
Antysensowne oligonukleotydy	125
Transportery ABC	136
Krypty: zapomniane organelle	151
Białka G — sygnalizatory komór- kowe	158
Białka G niewrażliwe na PTX	164

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

ICN Pharmaceuticals, Inc. powstała w 1960 roku. Główna siedziba firmy znajduje się w Costa Mesa, Kalifornia, USA. Jeden z jej działów to **ICN Biomedicals**. Istnieje 20 przedstawicielstw na wszystkich kontynentach, w tym utworzone na początku tego roku przedstawicielstwo w Polsce. **ICN Biomedicals** w swojej ofercie posiada szeroki wachlarz odczynników biomedycznych, które podzielono według następujących dziedzin:



Cell Biology

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



Immunobiologicals

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



Molecular Biology & Radiochemicals

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



Neuroscience

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



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

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



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
Mńska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

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

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
EDWARD DARŻYNKIEWICZ
(Warszawa)
ANNA FILIPEK
(Warszawa)
LESZEK KACZMAREK
(Warszawa)
JANINA KWIATKOWSKA-
-KORCZAK
(Wrocław)
KATARZYNA NAŁĘCZ
(Warszawa)
ANDRZEJ PŁOCIENNICZAK
(Warszawa)
EWA SIKORA
(Warszawa)
ANNA SZAKIEL
(Warszawa)
ELŻBIETA WYROBA
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

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

SPIS TREŚCI CONTENTS

- Mechanizmy redagowania jądrowych mRNA**
Mechanisms of nuclear mRNAs editing
ANDRZEJ KOSTYRKO, WIESŁAW H. TRZECIAK 94
- Małe jąderkowe RNA**
Small nucleolar RNA
JOANNA PIEŃKOWSKA, ZOFIA SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA . 102
- Fitochromopodobne systemy fotorecepcji u sinic**
Phytochrome-like photoreceptor systems in cyanobacteria
ANDRZEJ TRETYN 113
- Szczepionki DNA**
DNA vaccines
EDYTA GENDASZEWSKA 117
- Strategia antysensownych oligonukleotydów — nowe trendy**
Antisense strategy — new trends
MARIA KOZIOŁKIEWICZ 125
- Transportery ABC w komórkach człowieka**
ABC transporters in human cells
GRZEGORZ BARTOSZ 136
- Krypty: zapomniane organelle ponownie odkryte**
Vaults: forgotten organelles rediscovered
ŁUKASZ PUŁASKI 151
- Białka G — najważniejsze sygnalizatory komórkowe?**
G proteins — the most important cellular messengers?
LUDMIŁA ŻYLIŃSKA, ELŻBIETA RĘBAS, AGNIESZKA LACHO-
WICZ, LILLA LACHOWICZ 158
- Funkcja sygnalizacyjna białek G niewrażliwych na PTX w komórce**
Signalling function of G proteins insensitive on PTX in cell
AGNIESZKA LACHOWICZ, LILLA LACHOWICZ, LUDMIŁA ŻY-
LIŃSKA, ELŻBIETA RĘBAS 164
- Informacje o książkach 170

Mechanizmy redagowania jądrowych mRNA

Mechanisms of nuclear mRNAs editing

ANDRZEJ KOSTYRKO¹,
WIESŁAW H. TRZECIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Redagowanie mRNA apolipoproteiny B
 - II-1. Rola apolipoprotein: B100 i B48
 - II-2. Sekwencje niezbędne dla redagowania apoB
 - II-3. Podjednostka katalityczna edytosomu
 - II-4. Białka pomocnicze edytosomu
- III. Redagowanie mRNA receptorów glutaminianu
 - III-1. Rola receptorów glutaminianu
 - III-2. Sekwencje niezbędne dla redagowania
 - III-3. Deaminazy adenozyne zależne od dwuniciowego RNA
- IV. Redagowanie a nowotworzenie
 - IV-1. Udział APOBEC-1 w nowotworzeniu
 - IV-2. Redagowanie transkryptów antyonkogenów
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Editing of apolipoprotein B mRNA
 - II-1. Function of apolipoproteins: B100 and B48
 - II-2. Structural requirements for editing apoB
 - II-3. Catalytic subunit of editosome
 - II-4. Auxillary proteins of editosome
- III. Editing of glutamate receptors mRNAs
 - III-1. Function of glutamate receptors
 - III-2. Structural requirements for editing
 - III-3. Double stranded RNA dependend adenosine deaminases
- IV. Editing and oncogenesis
 - IV-1. Involvement of APOBEC-1 in oncogenesis
 - IV-2. Editing of antioncogenes transcripts
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ak — aminokwas; apo — apolipoproteina; AMPA — kwas- α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy; APOBEC-1 — podjednostka katalityczna kompleksu redagującego mRNA apolipoproteiny B; dsRAD (inaczej DRADA lub ADAR) — deaminaza adenozyne dwuniciowego RNA indukowana przez interferon; dsRNA — dwuniciowy RNA; GluR — receptor glutaminianu; LDL — lipoproteina o małej gęstości; MTP — mikrosomalne białko transportujące lipidy; NFI — nowotwory supresor neurofibromatozy typu I; PKR — kinaza białkowa zależna od RNA indukowana przez interferon; VLDL — lipoproteina o bardzo małej gęstości; WTI — nowotworowy supresor guza Wilmsa.

I. Wstęp

Analizując sekwencje cDNA, otrzymane przez odwrotną transkrypcję niektórych mRNA zauważono, że w pewnych przypadkach nie odpowiadają one sekwencjom eksonów kodujących te mRNA. Okazało się, że ta niezgodność jest wynikiem procesu zwanego reda-

gowaniem RNA (ang. *RNA editing*), polegającego na potranskrypcyjnej insercji, delecji bądź modyfikacji określonych nukleotydów. Redagowaniu m.in. ulegają RNA mitochondrialne, wirusowe, niektóre rRNA i tRNA. Szczególnie interesujące wydaje się redagowanie jądrowych mRNA z uwagi na jego udział w metabolizmie człowieka. Konsekwencją tego procesu, jeżeli redagowaniu ulega genetycznie określony kodon mRNA, może być zmiana sekwencji aminokwasów syntezowanego białka. Obecnie znane są dwa mechanizmy redagowania jądrowych mRNA, przy czym w obu przypadkach ma miejsce deaminacja określonego nukleotydu. Pierwszym jest deaminacja cytydyny mRNA apolipoproteiny B w jelicie cienkim ssaków. Drugim natomiast jest deaminacja adenozyne w pre-mRNA receptorów glutaminianu w mózgu ssaków. Ponadto znane są przykłady redagowania transkryptów genów jądrowych kodujących białka supresorowe nowotworów, którego mechanizmy nie są wyjaśnione.

Celem pracy jest omówienie mechanizmów redagowania jądrowych transkryptów genów klasy II (mRNA) ssaków. W związku z tym pominięto, przedstawione wcześniej na łamach *Postępów Biochemii*, opisy redagowania innych rodzajów RNA.

¹ Mgr, ² prof. dr hab., Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. im. Karola Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

II. Redagowanie mRNA apolipoproteiny B

II-1. Rola apolipoprotein: B100 i B48

Apolipoproteina B (apoB) odgrywa ważną rolę w metabolizmie lipoprotein człowieka. Jako jedyne białko wchodzi w skład lipoprotein o małej gęstości (LDL), które transportują dwie trzecie cholesterolu zawartego w osoczu krwi. Zwiększenie stężenia LDL sprzyja odkładaniu się cholesterolu w ścianach naczyń krwionośnych, dlatego też jest jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic [1].

Pełnej długości ludzka apoB — tzw. apoB100, o masie cząsteczkowej 512 kDa, zawiera 4536 aminokwasów. Syntetyzowana jest w wątrobie i wykorzystywana do tworzenia lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL). Wydzielane do krążenia VLDL są przetwarzane przy udziale lipazy lipoproteinowej w lipoproteiny o pośredniej gęstości (IDL) i ostateczne w LDL [1]. Oddziaływanie pomiędzy apoB, a lipidami w LDL następuje poprzez amfipatyczne α -helisy i harmonijki- β , które przypuszczalnie decydują o nieodwracalnym wiązaniu się apolipoproteiny z lipidami [1].

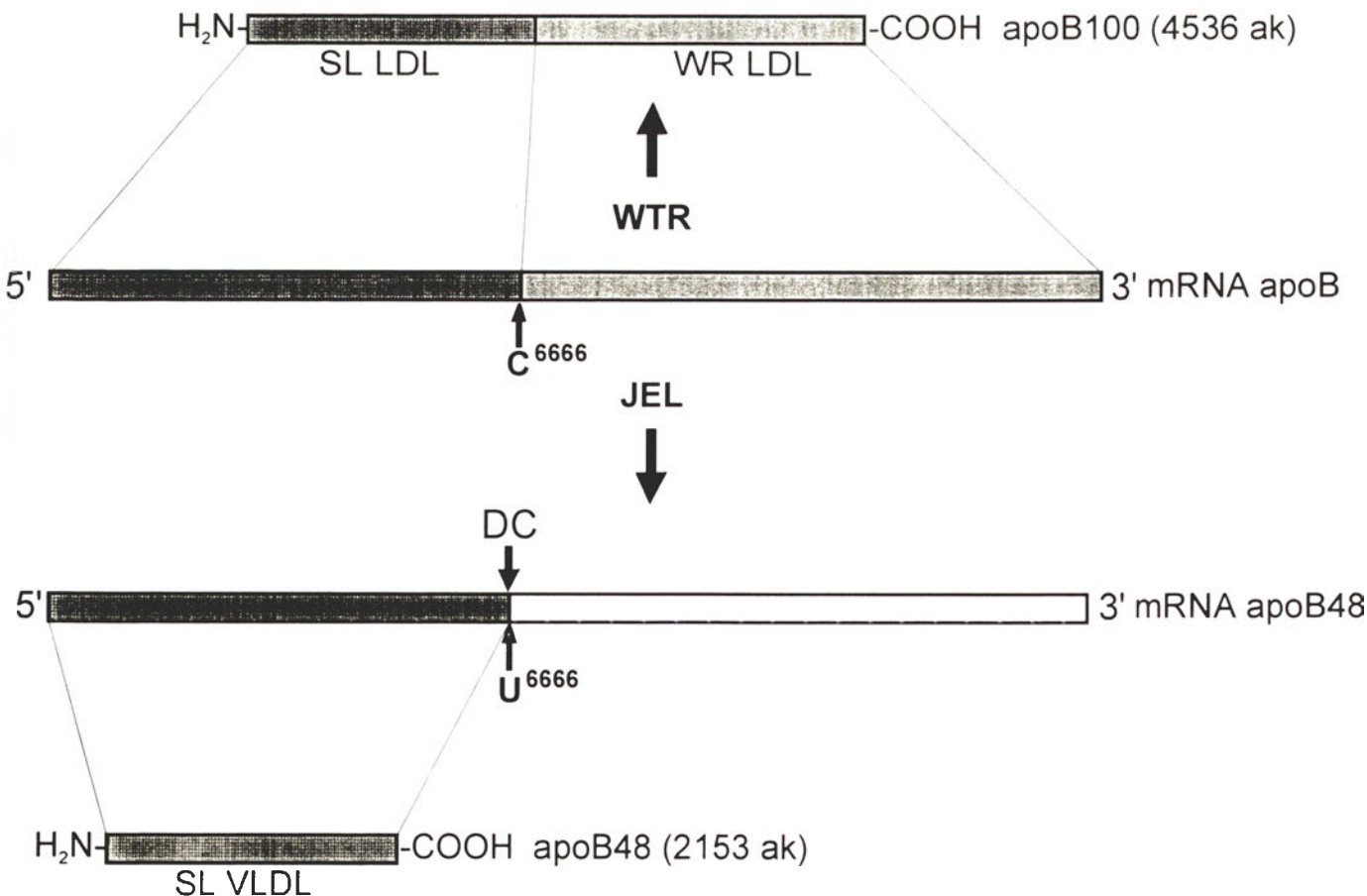
W jelicie cienkim człowieka produktem białkowym genu apoB jest krótsza forma zwana apolipoproteina B48 (apoB48) — zawiera 2152 aminokwasów począwszy od N-końca (48% sekwencji apoB100). W odróż-

nieniu od apoB100 apoB48 pozbawiona jest domeny receptorowej umożliwiającej rozpoznawanie i pinocytózę LDL przez komórki wątrobowe (hepatocyty). Synteza apoB48 w ścianie jelita jest niezbędna do składania i wydzielania chylomikronów wzbogaconych w triacyloglicerole [1].

ApoB48 powstaje w wyniku modyfikacji potranskrypcyjnej mRNA apoB. Proces redagowania mRNA apoB powoduje deaminację cytydyny w eksonie 26 (C^{6666}) do urydyny [2]. Powoduje to zmianę kodonu Glu^{2135} (CAA) na kodon stop (UAA). Redagowanie mRNA apoB ma miejsce w jelicie cienkim u wszystkich ssaków.

II-2. Sekwencje niezbędne dla redagowania apoB

W warunkach prawidłowych deaminacja cytydyny mRNA apoB zachodzi z dużą dokładnością. Stwierdzono, że proces ten zaczyna przebiegać w jądrze komórkowym równocześnie ze splicingiem i poliadenylacją [3] jednakże szybkość redagowania wzrasta w miarę dojrzewania mRNA — obecność intronu blisko miejsca redagowania spowalnia ten proces [4]. Poprzez ukierunkowaną mutagenezę zidentyfikowano sekwencje nukleotydowe mRNA apoB odpowiedzialne za specyficzność redagowania. Mutacja któregośkolwiek z nukleotydów w jedenastonukleotydowej sek-



Ryc. 1. Synteza apolipoprotein B100 i B48

apoB — apolipoproteina B; C^{6666} — cytydyna (6666 nukleotyd mRNA apoB) ulegająca deaminacji do urydyny- U^{6666} ; DC — deaminacja cytydyny; SL LDL — domena apoB100 odpowiedzialna za składanie lipoprotein o małej gęstości (LDL); SL VLDL — domena apoB48 odpowiedzialna za składanie apolipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL) i chylomikronów; WR LDL — domena apoB100 odpowiedzialna za wiązanie LDL z receptorem; JEL — jelito; WTR — wątroba.

wencji rozpoznającej zwanej „sekwencją cumowania” (ang. „*mooring sequence*”) znosi bądź w znacznym stopniu ogranicza redagowanie mRNA apoB *in vitro*, co wskazuje na ścisłą zależność procesu redagowania od tej sekwencji [5]. Stwierdzono, że insercja „sekwencji cumowania” do innego genu bądź innego miejsca w mRNA apoB powoduje deaminację najbliższej cytydyny w kierunku 5' [6]. Występowanie „sekwencji cumowania” jest również niezbędne dla złożenia edytosomu — kompleksu redagującego zawierającego deaminazę cytydynową i białka pomocnicze [6]. Optymalnym warunkiem dla redagowania mRNA apoB jest występowanie czteronukleotydowej spacji pomiędzy cytydyną a „sekwencją cumowania”. Wydajność deaminacji zwiększa duża zawartość nukleotydów AU w sekwencjach znajdujących się w sąsiedztwie „sekwencji cumowania” i/lub miejsca redagowania [7]. W odległości siedmiu nukleotydów od „sekwencji cumowania” w kierunku 3' stwierdzono występowanie drugiej „sekwencji cumowania” nieaktywnej z powodu braku cytydyny w miejscu potencjalnego redagowania. Sprawdzono, że deaminacji ulega cytydyna wprowadzona w miejsce 6687 nukleotydu poprzedzającego tę sekwencję [8].

Przypuszczalnie funkcją drugiej „sekwencji cumowania” jest utrzymywanie białek pomocniczych w pobliżu miejsca redagowania, co ma ułatwić ich mobilizację w momencie składania edytosomu.

II-3. Podjednostka katalityczna edytosomu

Znaczny postęp w zrozumieniu mechanizmu redagowania był możliwy dzięki sklonowaniu cDNA kodującego białko, które katalizuje redagowanie mRNA apoB. Białko to, o masie cząsteczkowej 27 kDa zwane APOBEC-1 (ang. *apoB mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 1*) stanowi podjednostkę katalityczną kompleksu redagującego (edytosomu) mRNA apoB. Należy do deaminaz adenozyne (EC 3.5) zależnych od Zn^{2+} [9]. Pierwszym etapem klonowania cDNA kodującego ludzkie białko APOBEC-1, było wyizolowanie z biblioteki cDNA jelita szczura cDNA kodującego białko (229 ak) redagujące mRNA apoB [10]. Następnie szczurzy cDNA użyto jako sondę do identyfikacji ludzkiego cDNA kodującego APOBEC-1. Ludzki gen, który zawiera 5 eksonów jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 12 w paśmie 13.1-13.2 [11]. Produkt białkowy genu ludzkiego składa się z 236 ak i jest w 70% homologiczny z białkiem szczurzym, od którego się różni brakiem występowania motywu zamka leucynowego [12]. Porównanie sekwencji sklonowanych cDNA APOBEC-1 człowieka i kilku gatunków zwierząt pozwoliło na określenie w produkcie białkowym ośmiu konserwatywnych regionów [11-14]. Dwa z nich utworzone przez aminokwasy 15-20 oraz 31-34 należą do potencjalnych motywów odpowiedzialnych za umiejscowienie jądrowe. Fragment sekwencji obejmujący aminokwasy 61-100 jest regio-

nem o 100% homologii, w którym aminokwasy konserwatywne 61-66 oraz 84-93 tworzą część domeny katalitycznej [9, 15]. Trzy aminokwasy tej domeny: His⁶¹, Cys⁹³ i Cys⁹⁶ tworzą chelat z jonami Zn^{2+} i wraz z Glu⁶³ są niezbędne dla deaminacji cytydyny [9, 16]. Aminokwasy w pozycjach 189-193 tworzą dwa wysoce konserwatywne regiony zawierające reszty Pro przylegające do domen bogatych w Leu. Mogą one być odpowiedzialne za połączenie enzymu z białkami pomocniczymi. Ponadto APOBEC-1 posiada zdolność wiązania RNA i w aktywnej postaci występuje jako samorzutnie utworzony homodimer [11]. Nie wiadomo jednak czy APOBEC-1 bierze udział w redagowaniu innych mRNA. Lokalizacja tego białka w tkankach człowieka i królika odpowiada miejscom, gdzie mRNA apoB jest redagowany (przede wszystkim w jelicie cienkim i w niewielkim stopniu w okrężnicy) [11, 12]. U szczura APOBEC-1 znajduje się w wątrobie i jelicie cienkim oraz w mniejszym stopniu w okrężnicy, nerkach, śledzionie, płucach i w śladowych ilościach we wszystkich tkankach. U myszy ekspresja genu APOBEC-1 (który zawiera 8 eksonów, obejmuje obszar 25 kb i zlokalizowany jest na chromosomie 6 [14]) ma miejsce głównie w jelicie cienkim i wątrobie. Technika hybrydyzacji RNA-DNA (ang. *Northern blotting*) wykazano istnienie dwóch izoform mysiego mRNA APOBEC-1 o różnych wielkościach: w jelicie cienkim — 2.2 kb, a w wątrobie, śledzionie, nerkach, płucach, mięśniach i sercu — 2.4 kb [2, 11, 12]. Mysi mRNA APOBEC-1 z wątroby (2.4 kb) zawiera transkrypt wszystkich 8 eksonów natomiast mRNA APOBEC-1 z jelita (2.2 kb) nie posiada sekwencji będącej produktem pierwszych trzech eksonów, gdyż transkrypcja jelitowa genu inicjowana jest w eksonie czwartym [14]. Jelitowy mRNA APOBEC-1 zawiera na końcu 5' swoisty 102-nukleotydowy odcinek, który nie występuje w wątrobowym mRNA, gdyż zostaje usunięty podczas splicingu [14]. W liniach komórek nowotworowych badano ekspresję genu reportera wykorzystując jako promotory sekwencje mysiego genu APOBEC-1 poprzedzające ekson 1 oraz ekson 4. Wykazano, że sekwencja poprzedzająca ekson 1 zachowuje się jak promotor w transfekowanych komórkach wątrobowych (Hepa), a sekwencja poprzedzająca ekson 4 posiada aktywność promotora w transfekowanych komórkach jelitowych (Caco), co wskazuje na specyficzność tkankową ekspresji obu izoform. Stwierdzono, że wątrobowy mRNA istnieje w dwóch formach ulegających alternatywnemu splicingowi (ang. *alternative splicing*) dzięki różnym miejscom akceptorowym w eksonie czwartym. Zatem w wątrobie i jelicie myszy wybór promotora i alternatywny splicing mogą warunkować specyficzną dla danej tkanki ekspresję genu [14].

II-4. Białka pomocnicze edytosomu

Chociaż APOBEC-1 posiada zdolność do wiązania

RNA, enzym nie może redagować mRNA apoB *in vitro* bez udziału białek pomocniczych (ang. *auxillary proteins*) [11, 13]. Białka pomocnicze mogą specyficznie oddziaływać z mRNA apoB a ponadto wiążą się z APOBEC-1. Motyw sekwencji APOBEC-1 bogaty w leucynę może być odpowiedzialny za połączenie z tymi białkami. Przed złożeniem edytosomu, którego stała sedymentacji wynosi 27S [17] wchodzi one w skład kompleksów o stałej sedymentacji 60S [2]. W obecności mRNA apoB kompleks 60S dysocjuje na wolne białka pomocnicze, które wiążą się z „sekwencją cumowania” tworząc kompleks o stałej sedymentacji 11S rozpoznający miejsce redagowania mRNA apoB [17]. Badania wiązania się białek z mRNA apoB *in vitro* wykazały, że białka z ekstraktów wątrobowych i jelitowych — kowalencyjnie związane z mRNA apoB pod wpływem promieniowania UV (ang. *UV cross-linking*) mają masę cząsteczkową od 44 do 66 kDa [17]. Na przykład wykryte w enterocytach szczura białko pomocnicze o masie cząsteczkowej 60 kDa (p60) wiąże się z nukleotydami mRNA apoB w pozycjach 6671-6674 wchodzącymi w skład jedenastonukleotydowej „sekwencji cumowania”. Świadczy o tym osłabienie wiązania p60 z mRNA apoB wywołane mutacjami w obrębie tej sekwencji [2]. Ponadto w edytosomie wykryto białko antygenowe o masie cząsteczkowej 240 kDa (p240). Jednakże nie wykazano, aby białko p240 łączyło się z mRNA apoB lub APOBEC-1 [18]. Przypuszczalnie białko to uczestniczy w składaniu i stabilizacji edytosomu. Ostatnio sklonowano cDNA kodujący białko wiążące się z APOBEC-1 i z mRNA apoB. Białko to nazwane ABBP-1 (ang. *APOBEC-1 Binding Protein-1*) o masie cząsteczkowej 35 kDa zawiera 331 aminokwasów [19]. Jest ono identyczne z opisaną wcześniej ludzką rybonukleoproteiną A/B hnRNP [20], od której różni się sekwencją 47 reszt aminokwasowych końca karboksylowego. W hodowli komórek, w których zachodziła ekspresja genu APOBEC-1 transfekcja antysensowym cDNA

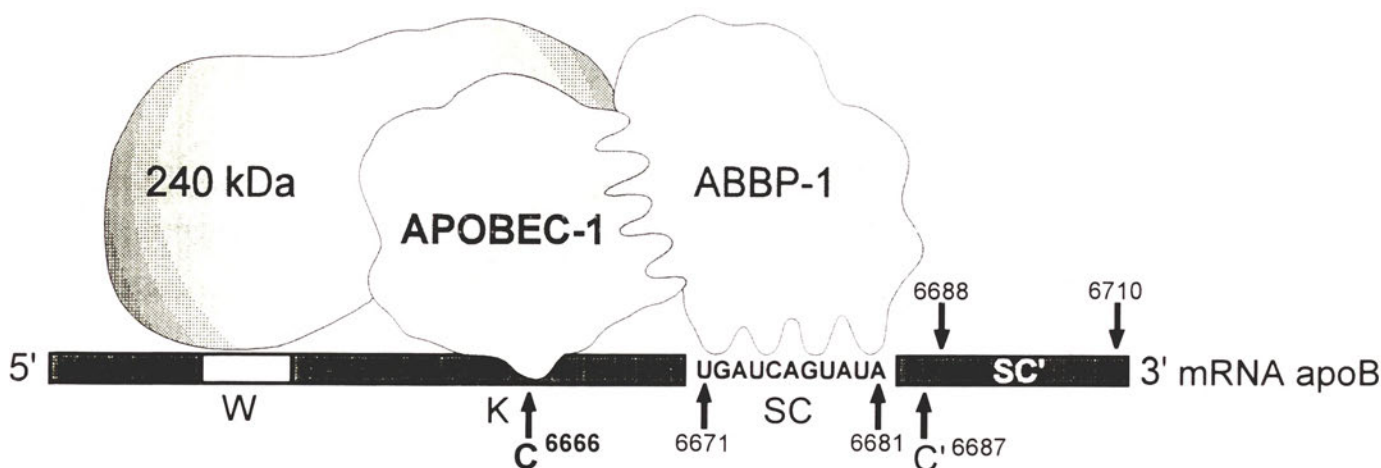
białka APPB-1 hamującym ekspresję genu ABBP-1 spowodowała znaczne ograniczenie redagowania mRNA apoB [19]. Świadczy to o udziale ABBP-1 jako białka pomocniczego w redagowaniu mRNA apoB *in vivo*.

Nieznana jest liczba ani rodzaje białek pomocniczych biorących udział w redagowaniu mRNA apoB. Wiadomo natomiast, że znajdują się one nie tylko w tkankach syntetyzujących apoB48, ale również w tkankach i narządach, w których nie wykrywa się produktów redagowania mRNA apoB [9-11, 13]. Występowanie tych białek w wielu tkankach może świadczyć o ich udziale w innych — dotychczas nie odkrytych rodzajach redagowania mRNA.

III. Redagowanie mRNA receptorów glutaminianu

III-1. Rola receptorów glutaminianu

Drugim z przedstawianych mechanizmów selektywnego redagowania mRNA jest deaminacja adenozyne wykryta w transkryptach genów receptorów glutaminianu. Glutaminian (Glu) jest głównym neuroprzekaźnikiem pobudzającym postsynaptyczne receptory kanałów jonowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Wynikiem substytucji aminokwasu (lub aminokwasów) w białku receptora Glu jest zmniejszenie przewodnictwa kanału jonowego [21, 22]. Zapobiega to napływowi jonów wapnia (Ca^{2+}) do komórki nerwowej (neuronu). Nadmiar Ca^{2+} w neuronie trwale depolaryzuje błonę komórkową i powoduje zwiększone uwalnianie Glu. Może to prowadzić do łańcuchowego zniszczenia wielu komórek (kaskada glutaminianowa) wskutek wzrostu ciśnienia osmotycznego oraz przez aktywację nukleaz, proteaz i lipaz zależnych od jonów Ca^{2+} [23]. Receptory glutaminianu (GluR) są produktami białkowymi ponad dwudziestu genów [24]. W transkryptach pięciu z nich zidentyfikowano



Ryc. 2. Kompleks redagujący (edytosom) mRNA apolipoproteiny B według [1] zmodyfikowano według [8, 18, 19] APOBEC-1 — podjednostka katalizująca deaminację cytydyny (C^{6666}) nukleotydu mRNA apoB; ABBP-1 — białko pomocnicze wiążące się z mRNA apoB i APOBEC-1; K — miejsce katalitycznej deaminacji mRNA apoB; SC — „sekwencja cumowania” (nukleotydy 6671-6681); SC’ — „sekwencja cumowania” (nukleotydy 6688-6710) aktywna po wprowadzeniu cytydyny (C) w miejsce 6687 nukleotydu; W — sekwencja mRNA apoB wpływająca na wydajność deaminacji; 240 kDa — białko pomocnicze stabilizujące edytosom.

łącznie osiem miejsc redagowania, w których deaminacja adenozyiny powoduje zmianę aminokwasu. Występują one w pre-mRNA receptorów glutaminianu należących do klas receptorów AMPA (kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego) oraz receptorów kainowych — rozpoznających kwas kainowy (cykliczny analog Glu) [24–26]. Wyróżnia się tzw. miejsca redagowania: Q/R, R/G, I/V i Y/C określone przez aminokwasy kodowane w pierwotnym transkrypcie genu GluR i kodowane po redagowaniu. Redagowanie zachodzi w pre-mRNA trzech receptorów AMPA: GluR-B (w miejscach: Q/R i R/G), GluR-C (w miejscu R/G) i GluR-D (w miejscu R/G) oraz w pre-mRNA dwóch receptorów kainowych: GluR5 (w miejscu Q/R) i GluR6 (w miejscach: Q/R, I/V i Y/C) [24, 26].

III-2. Sekwencje niezbędne dla redagowania

W biosyntezie receptora glutaminianu redagowaniu ulega pre-mRNA GluR. Deaminacja zachodzi przed splicingiem i wymaga występowania w pre-mRNA odcinka dwuniciowego RNA (dsRNA) utworzonego przez fragment eksonu (liczący kilkanaście nt) zawierający modyfikowaną adenozyinę i komplementarną do niego sekwencję intronu. Sekwencja ta może przylegać do miejsca redagowania (pre-mRNA GluR-B [27]) lub być od niego odległa o ok. 1860 nukleotydów (pre-mRNA GluR5 i GluR6 [26]). Ponadto nie musi być komplementarna do miejsca redagowania, gdyż w pre-mRNA GluR-B modyfikowana adenozyina w miejscu Q/S tworzy wiązanie wodorowe z uracylem, natomiast w miejscu R/S pozostaje niezwiązana i nie ma to wpływu na wydajność reakcji [27]. Intron zawiera też kilka sekwencji będących odwróconym powtórzeniem własnych sekwencji (ang. *inverted repeat*). Umożliwiają one tworzenie dodatkowych fragmentów dsRNA przypuszczalnie zwiększających wydajność redagowania [24–27]. Wydajność *in vitro* jest największa, gdy długość dsRNA wynosi 100 pz. Jeżeli dsRNA jest krótszy niż 36 pz, większość reszt adenozyiny pozostaje niezmodyfikowana [28].

III-3. Deaminazy adenozyiny zależne od dwuniciowego RNA

Specyficzne redagowanie pre-mRNA GluR katalizują deaminazy adenozyiny dwuniciowego RNA. Enzymy te działają na regiony dsRNA katalizując deaminację adenozyiny do inozyiny, która w procesie translacji jest odczytywana jako guanozyna. Zlokalizowane są w większości komórek ssaków i nie działają na reszty adenozyiny jednoniciowego RNA ani DNA [29]. Pierwszą z wyizolowanych deaminaz adenozyiny dsRNA nazwano dsRAD1 (również DRADA1 lub ADAR1) [29, 30]. Stwierdzono, że ekspresja genu dsRAD1 jest indukowana przez interferony α i γ [30, 31]. Enzym może katalizować zarówno redagowanie

pre-mRNA GluR jak i wirusowego RNA [30–32]. Przykładem tego jest redagowanie kolistego jednoniciowego RNA wirusa HDV (wirus δ zapalenia wątroby), w wyniku którego powstają dwa białka o różnych funkcjach w cyklu rozwojowym wirusa. W tym przypadku fragment RNA wirusa tworzy w miejscu redagowania samokomplementarny dsRNA [33]. Ludzki gen dsRAD1 posiada długość 30 kpz, zawiera 15 eksonów i zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 1 w paśmie 21.1–21.2 [34]. Produkt białkowy genu dsRAD1 o masie cząsteczkowej 140 kDa zawiera 1226 ak. Blisko końca aminowego białka występuje domena wiążąca Z-DNA [28, 35]. Analiza komputerowa 137 genów wykazała, że konformacja Z-DNA występuje 10 razy częściej na końcu 5' niż na końcu 3' tych genów co sugeruje, że redagowanie RNA przez dsRAD1 jest regulowane przez tworzenie Z-DNA [36].

W środkowej części białka występują trzy domeny wiążące dsRNA, zawierające wysoce zachowawcze i powtarzalne sekwencje aminokwasów. Domeny te, oznaczone jako RI, RII i RIII, kodowane są odpowiednio przez eksony 3, 5 i 7 [34, 37]. Motywy zachowawcze domen R wykryto w kilku białkach wiążących się z dsRNA, do których należy kinaza białkowa zależna od RNA indukowana przez interferon (PKR) [38]. Stwierdzono, że domeny R w PKR i dsRAD1 posiadają m.in. identyczne motywy (SKK), zawierające lizynę, niezbędną dla wiązania się z substratem enzymu [37, 38]. Stosując ukierunkowaną mutagenezę stwierdzono, że domena RIII jest najważniejsza, a RII najmniej ważna dla aktywności enzymu [30]. Domeny te zawierają miejsca alternatywnego splicingu, które umożliwiają występowanie trzech izoform dsRAD1, z których dwie są krótsze, od białka o pełnej długości (forma-a), na skutek delekcji 26 ak w eksonie 7 (forma-b) lub 19 ak w eksonie 6 (forma-c). Aktywności enzymatyczne tych izoform są podobne, natomiast ich ekspresja jest zróżnicowana tkankowo [37]. W pobliżu końca karboksylowego dsRAD1 występuje region podobny do domeny katalitycznej deaminaz hydrolitycznych posiadający potencjalne miejsce koordynacyjnego wiązania Zn^{2+} . Domena katalityczna zawiera zachowawczą sekwencję CHAE (Cys⁹⁰⁹, His⁹¹⁰, Ala⁹¹¹, Glu⁹¹²), w której reszty His i Glu, rozdzielone niepolarną resztą (Ala), są kluczowe dla aktywności enzymu, podobnie jak w przypadku APO-BEC-1. Sekwencja CHAE występuje też w innych deaminazach adenozyiny zależnych od dsRNA (RED1, RED2) [30]. Mutacja w obrębie tej sekwencji hamuje aktywność enzymu, ale nie wpływa na jego wiązanie się z substratem (dsRNA). Reszty aminokwasowe His⁹¹⁰, Cys⁹⁶⁶ i Cys¹⁰³⁶ tworzą wiązania koordynacyjne z Zn^{2+} natomiast reszta Glu⁹¹² przypuszczalnie bierze udział w przenoszeniu protonu [39].

Z biblioteki cDNA szczura wyizolowano cDNA wspomnianej deaminazy adenozyinowej zależnej od dwuniciowego RNA nazwanej RED1 (711 ak). Sklono-

wano również cDNA ludzkiego białka — hRED1 [140], którego gen znajduje się na długim ramieniu chromosomu 21 w paśmie 22.3 [41]. Produkt białkowy genu występuje w dwóch izoformach zawierających 701 oraz 741 aa [41]. Dłuższa izoforma powstaje dzięki alternatywnemu splicingowi, podczas którego z pre-mRNA hRED1 nie zostaje usunięta sekwencja *AluJ*. Wykazano, że w warunkach *in vitro*, RED1 znacznie efektywniej niż dsRAD1 redaguje miejsce Q/R w pre-mRNA GluR-B [25]. Najnowsze badania obu enzymów porównujące specyficzność redagowania pre-mRNA GluR-B w komórkach HeLa dowiodły, że hRED1 jest enzymem odpowiedzialnym za redagowanie pre-mRNA GluR-B *in vivo* [27].

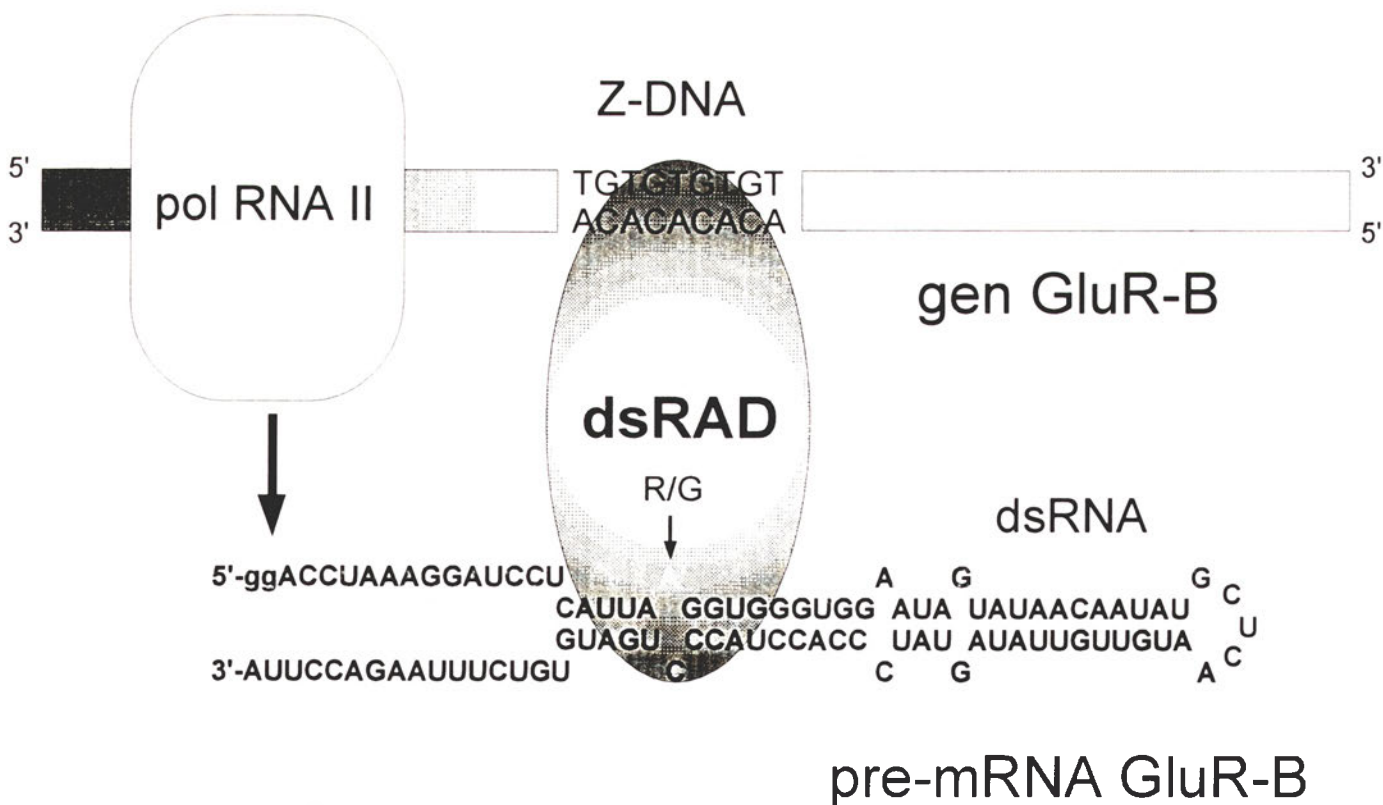
Sklonowano również cDNA deaminazy adenozyne dsRNA nazwanej RED2 [42]. Sekwencja RED2 jest podobna do RED1. Jednakże RED2 nie katalizuje redagowania pre-mRNA GluR-B, a jego ekspresja ma miejsce tylko w mózgu. Możliwe jest więc, że RED2 katalizuje redagowanie transkryptów specyficznych tkankowo [42]. Ostatnio sklonowano również cDNA enzymu, którego sekwencja wykazuje wysoką homologię do sekwencji dsRAD1 nazwanego dsRAD2 (lub DRADA2) i różną od dsRAD1 specyficzność substratową [43]. Enzym ten występuje w czterech izoformach (a, b, c, d) powstających podobnie jak w przypadku dsRAD1 dzięki alternatywnemu splicingowi. Izoformy te różnią się aktywnością redagowania

pre-mRNA GluR-B. Stwierdzono, że formy -a i -b dsRAD2 wykazują podobną aktywność redagowania miejsc Q/R i R/G w pre-mRNA GluR-B jest RED1 natomiast formy -c i -d dsRAD2 nie posiadają aktywności redagowania tych miejsc. Nie wykazano ich udziału w redagowaniu innych pre-mRNA [43].

IV. Redagowanie a nowotworzenie

IV-1. Udział APOBEC-1 w nowotworzeniu

Aktywność APOBEC-1 stwierdzono w kilku liniach wyprowadzonych z komórek nowotworowych nie syntetyzujących apoB48 co sugeruje, że w tych komórkach APOBEC-1 ma inną funkcję [44]. Ostatnio wykazano, że myszy transgeniczne, u których obserwuje się zwiększoną ekspresję APOBEC-1 redagują inne rodzaje mRNA [45]. Aby ustalić, czy zwiększenie ekspresji enzymu obniży produkcję LDL poprzez zredukowanie syntezy apoB100 wyhodowano transgeniczne króliki i myszy, u których występowała nadmierna ekspresja APOBEC-1 w wątrobie. Stwierdzono, że w wątrobach tych zwierząt mRNA apoB był redagowany, a stężenie apoB100 i LDL było zmniejszone w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych [45]. Nieoczekiwanie jednak wszystkie transgeniczne myszy i króliki wykazały wątrobową dysplazję a wiele myszy raka wątroby. Badano także inne wątrobowe



Ryc. 3. Redagowanie miejsca R/G w pre-mRNA receptora glutaminianowego B przez deaminazę adenozyne zależną od dwuniciowego RNA według [28] zmodyfikowano według [27]
A* — adenozyne ulegająca deaminacji w miejscu redagowania R/G (zmiany kodonu argininy na kodon glicyny); dsRAD — deaminaza adenozyne zależna od podwójnoniciowego RNA; dsRNA — podwójnoniciowy RNA wiążący się z deaminazą adenozyne; GluR-B — receptor glutaminianowy B; pol RNA II — polimeraza RNA II; Z-DNA — fragment Z-DNA na końcu genu wiążący się z deaminazą adenozyne.

mRNA posiadające „sekwencje cumowania” podobne do tych w mRNA apoB analizując deaminację cytydyny i stwierdzono, że redagowaniu w wątrobie myszy transgenicznym ulegają mRNA kinazy tyrozynowej i homologu jednego z czynników inicjacji translacji [1, 45]. Wyniki te sugerują, że uboczne redagowanie wątrobowych mRNA kodujących białka o ważnych funkcjach fizjologicznych wywołuje dysplazję i raka wątroby. Identyfikacja tych białek może doprowadzić do odkrycia nowych cząsteczek o ważnych funkcjach biologicznych.

IV-2. Redagowanie transkryptów antyonkogenów

Występowanie „sekwencji cumowania” stwierdzono również w mRNA kodującym supresor nowotworu nerwiakowłóknika typu I — NF1 (ang. *neurofibromatosis type 1*) [46]. Produkt białkowy genu NF1 — neurofibromina (372 kDa) jest odpowiedzialny za hydrolizę GTP związanego z białkiem Ras biorącym udział w transdukcji sygnału prowadzącej do wzmożenia podziałów komórkowych [47]. Redagowanie mRNA NF1 modyfikuje cytydynę 2914 w kodonie Arg (CGA) do urydyny tworząc kodon stop (UGA). Zachodzi ono w normalnej tkance i kilkakrotnie intensywniej w nowotworowej. W odróżnieniu od mRNA apoB redagowanie mRNA NF1 jest niezależne od aktywności APOBEC-1 co sugeruje, że inny enzym bierze udział w redagowaniu tego mRNA [46]. Redagowanie mRNA stwierdzono także w transkrypcie genu białka WT1 powodującego supresję nerczaka (guza Wilmsa). Produkt białkowy genu WT1 jest czynnikiem transkrypcyjnym (posiadającym motyw czterech palców cynkowych) krytycznym dla prawidłowego rozwoju narządów moczowo-płciowych. Jest niezbędny w różnicowaniu nefroblastów do komórek nefronów. Może odgrywać wieloraką funkcję w rozwoju nabłonka nerkowego i powstawaniu nowotworu [48]. Ponadto stwierdzono, że WT1 jest induktorem ekspresji genu białka p21 — inhibitora kinazy zależnej od cykliny [49]. Powoduje również supresję genu receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-1 (ang. *insulin like growth factor 1*) hamując proliferację komórek [50] oraz w dojrzałym nabłonku nerkowym represję genu Pax-2 regulującego wczesne etapy morfogenezy nerek [51]. Stwierdzono, że WT1 wiąże się z tą samą sekwencją promotorową, z którą reaguje białkowy produkt genu odpowiedzi wczesnego wzrostu EGR-1 (ang. *Early Growth Response-1*) i w wyniku oddziaływania białko -DNA hamuje transkrypcję aktywowaną przez EGR-1 [52].

Redagowanie mRNA WT1 obserwowane u człowieka i szczura, polega na amidacji urydyny (w pozycji 839) do cytydyny [53]. Zredagowany mRNA WT1 zawierający kodon proliny (CCC) zamiast leucyny (CUC) koduje białko o mniejszej o 30% efektywności hamowania transkrypcji aktywowanej przez białkowy produkt genu EGR-1 [52, 53].

V. Uwagi końcowe

Obecnie znanych jest kilka przykładów redagowania jądrowych mRNA. Poznano enzym redagujący mRNA apoB oraz enzymy redagujące mRNA GluR. Nie są znane natomiast enzymy odpowiedzialne za redagowanie mRNA transkryptów antyonkogenów wywołujące nowotworzenie. Nie jest znana ilość białek pomocniczych biorących udział w redagowaniu jądrowych mRNA. Białka te występują w kilku rodzajach tkanek również w tych, w których redagowanie nie jest zauważalne.

Duże zainteresowanie udziałem APOBEC-1 w redagowaniu mRNA apoB wiąże się z jego ewentualnym zastosowaniem w terapii genowej obniżającej poziom cholesterolu w osoczu krwi. Polegałaby ona na wprowadzeniu do wątroby genu APOBEC-1. Jednakże tego typu próby dokonane na myszach i królikach poważnie podważyły możliwość zastosowania APOBEC-1 w terapii genowej ze względu na rozwój nowotworu wątroby [45]. Bardziej obiecującą możliwością terapii pozostaje inhibicja mikrosomalnego białka transportowego (MTP) niezbędnego dla składania oraz wydzielania VLDL i chylomikronów [1]. Poznano sekwencje czterech deaminaz adenozyliny dsRNA, katalizujących redagowanie pre-mRNA GluR w mózgu oraz ich lokalizacje chromosomalne. Gen hRED1 zlokalizowany jest w regionie odpowiedzialnym za występowanie niektórych chorób psychicznych, w tym psychozy afektywnej dwubiegunowej [41]. Obecnie istnieje więc możliwość rozstrzygnięcia, czy uszkodzenia neuronów, będące przyczyną tych chorób, są spowodowane nadmiernym napływem Ca^{2+} , wywołanym mutacjami genów enzymów katalizujących redagowanie pre-mRNA GluR.

Podziękowanie

Autorzy dziękują panu dr Arturowi Jarمولowskiemu za wkliwne przeczytanie pracy i podzielenie się merytorycznymi uwagami dotyczącymi tekstu, które przyczyniły się do jego poprawienia.

Artykuł otrzymano 3 lipca 1997 r.

Zaakceptowano do druku 6 stycznia 1998 r.

ADDENDUM

Ludzki gen APOBEC-1 posiada 5 eksonów. Miejsce inicjacji translacji występuje w eksonie drugim. Sekwencja końcowa 5' zawiera dwie powtarzalne sekwencje Alu. Wykazano istnienie dwóch miejsc inicjacji transkrypcji. Pierwsze miejsce inicjacji transkrypcji znajduje się na początku niekodującego eksonu 1 i poprzedzone jest pierwszą sekwencją Alu. Drugie miejsce inicjacji transkrypcji znajduje się wewnątrz drugiej sekwencji Alu występującej w intronie 1, który zostaje wycięty podczas splicingu w przypadku startu transkrypcji z miejsca pierwszego. Żadne z miejsc inicjacji transkrypcji nie posiada kasety TATA ani CCAT [54].

[54] Fujino T, Navaratnam N, Scott J, (1998) *Genomics* 47: 266-275

Piśmiennictwo

1. Innerarity TL, Borén J, Yamanaka S, Olofsson S-O (1996) *J Biol Chem* **271**: 2353-2356
2. Navaratnam N, Shah R, Patel D, Fay V, Scott J (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 222-226
3. Lau PP, Xiong WJ, Zhu HJ, Chen SH, Chan L (1991) *J Biol Chem* **266**: 20550-20554
4. Sowden M, Hamm JK, Spinelli S, Smith HC (1996) *RNA* **2**: 274-288
5. Shah RR, Knott TJ, Legros JE, Navaratnam N, Greeve JC, Scott J (1991) *J Biol Chem* **266**: 16301-16304
6. Backus JW, Smith HC (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 6781-6786
7. Backus JW, Smith HC (1994) *Biochim Biophys Acta* **1217**: 65-73
8. Backus JW, Schock D, Smith HC (1994) *Biochim Biophys Acta* **1219**: 1-14
9. Navaratnam N, Bhattacharya S, Fujino T, Patel D, Jarmuz AL, Scott J (1995) *Cell* **81**: 187-195
10. Teng B, Burant CF, Davidson NO (1993) *Science* **260**: 1816-1819
11. Lau PP, Zhu H-J, Baldini A, Charnsangavej C, Chan L (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8522-8526
12. Hadjiagapiou C, Giannoni F, Funahashi T, Skarosi SF, Davidson NO (1994) *Nucleic Acids Res* **22**: 1874-1879
13. Yamanaka S, Poksay KS, Driscoll DM, Innerarity TL (1996) *J Biol Chem* **271**: 11506-11510
14. Nakamuta M, Oka K, Krushkal J, Kobayashi K, Yamamoto M, Li W-H, Chan L (1995) *J Biol Chem* **270**: 13042-13056
15. Mac Ginnite AJ, Anant S, Davidson NO (1995) *J Biol Chem* **270**: 14768-14775
16. Yamanaka S, Poksay KS, Balestra ME, Zeng GQ, Innerarity TL (1994) *J Biol Chem* **269**: 21725-21734
17. Harris SG, Sabio I, Mayer E, Steinberg MF, Backus JW, Sparks JD, Sparks CE, Smith HC (1993) *J Biol Chem* **268**: 7382-7392
18. Schock D, Kuo S-R, Steinburg MF, Bolognino M, Sparks JD, Sparks CE, Smith HC (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1097-1102
19. Lau PP, Zhu H-J, Nakamuta M, Chan L (1997) *J Biol Chem* **272**: 1452-1455
20. Khan FA, Jaiswal AK, Szer W (1991) *FEBS Lett* **290**: 159-161
21. Hollmann M, Hartley M, Heinemann 2 (1991) *Science* **252**: 851-853
22. Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, Cull-Candy SG (1996) *J Physiol (Lond)* **492**: 129-142
23. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (1993) W: *Biochemia Harpera*, PZWL Warszawa, str 887-909
24. Dabiri GA, Lai F, Drakas RA, Nishikura K (1996) *embo j* **15**: 34-45
25. Melcher T, Mass S, Herb A, Sprengel R, Seeburg PH, Higuchi M (1996) *Nature (Lond)* **379**: 460-464
26. Herb A, Higuchi M, Sprengel R, Seeburg PH (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1875-1880
27. Yang J-H, Sklar P, Axel R, Maniatis T (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4354-4359
28. Herbert A (1996) *Trends Genet* **12**: 6-9
29. Rebagliati MR, Melton DA (1987) *Cell* **48**: 599-605
30. Liu Y, Samuel CE (1996) *J Virol* **70**: 1961-1968
31. Patterson JB, Samuel CE (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 5376-5388
32. Polson AG, Bass BL (1994) *embo j* **13**: 5701-5711
33. Polson AG, Bass BL, Casey JL (1996) *Nature (Lond)* **380**: 454-456
34. Wang Y, Zeng Y, Murray JM, Nishikura K (1995) *J Mol Biol* **254**: 184-195
35. Herbert AG, Lowenhaupt K, Spitzner J, Rich A (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7550-7554
36. Schroth GP, Chou PJ, Ho PS (1992) *J Biol Chem* **267**: 11846-11855
37. Liu Y, George CX, Patterson JB, Samuel CE (1997) *J Biol Chem* **272**: 4419-4428
38. McMillan NA, Carpick BW, Hollis B, Toone WM, Zamanian-Daryoush M, Williams BR (1995) *J Biol Chem* **270**: 2601-2606
39. Lai F, Drakas R, Nishikura K (1995) *J Biol Chem* **270**: 17098-17105
40. O'Connell MA, Gerber A, Keller W (1997) *J Biol Chem* **272**: 473-478
41. Mittaz L, Scott HS, Rossier C, Seeburg PH, Higuchi M, Antonarakis SE (1997) *Genomics* **41**: 210-217
42. Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Higuchi M, Seeburg PH (1996) *J Biol Chem* **271**: 31795-31798
43. Lai F, Chen CX, Carter KC, Nishikura K (1997) *Moll Cell Biol* **17**: 2413-2424
44. Bostrom K, Garcia Z, Poksay KS, Johnson DF, Lusis AJ, Innerarity TL (1990) *J Biol Chem* **265**: 22446-22452
45. Yamanaka S, Balestra ME, Ferrell LD, Fan J, Arnold KS, Taylor S, Taylor JM, Innerarity TL (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8483-8487
46. Skuse GR, Cappione AJ, Sowden M, Metheny LJ, Smith HC (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 478-486
47. Knudson AG (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10914-10921
48. Dressler GR (1995) *Semin-Nephrol* **15**: 263-271
49. Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, Kreidberg J, Haber DA (1997) *Cancer Res* **57**: 1429-1434
50. Werner H, Shen-Orr Z, Rauscher FJ 3rd, Morris JF, Roberts CT Jr, Le Roith D (1995) *Moll Cell Biol* **15**: 3516-3522
51. Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ 3rd, Dressler GR (1995) *Development* **121**: 867-875
52. Rackley RR, Kessler PH, Campbell C, Williams BR (1995) *J Urol* **154**: 700-705
53. Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ, Sukumar S (1994) *Genes Dev* **8**: 720-731

**Acta
Biochimica
Polonica**

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

Małe jąderkowe RNA

Small nucleolar RNA

JOANNA PIENKOWSKA¹

ZOFIA SZWEJKOWSKA-KULIŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Klasyfikacja snoRNA i ich struktura
- III. Geny małych jąderkowych RNA
- IV. Transkrypcja i dojrzewanie snoRNA
- V. Białka kompleksujące z snoRNA
- VI. Udział snoRNA w dojrzewaniu pre-rRNA
 - VI-1. Udział snoRNA w reakcjach „rozcinań” prekursorowego rRNA
 - VI-2. Udział snoRNA w metylacji rRNA
 - VI-3. Udział w pseudourydylacji rRNA
- VII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: rDNA — rybosomowy DNA; snRNA — małe jąderkowe RNA; snoRNA — małe jąderkowe RNA; snoRNP — kompleks rybonukleoproteinowy; pre-rRNA — prekursorowy rRNA; TMG — 2,2,7 trójmetyloguanozyna; BP — miejsce rozgałęzienia; ETS — zewnętrzna sekwencja niekodująca; ITS — wewnętrzna sekwencja niekodująca; MRP — drożdżowa rybonukleaza; kDA — kilodaltony.

I. Wstęp

Informacja genetyczna komórki zawarta w kwasie deoksyrybonukleinowym przepisywana jest w procesie transkrypcji, a następnie translacji dając odpowiednią sekwencję aminokwasową białka. Synteza białka zachodzi w kompleksach rybonukleoproteinowych zwanych rybosomami. Elementami składowymi rybosomów są, oprócz białek, cząsteczki rybosomowego RNA (rRNA). W przypadku cytoplazmatycznych rybosomów u *Eukaryota* są to: 18S rRNA, 5,8S rRNA, 25-28S rRNA i 5S rRNA. Pierwsze trzy z tych cząsteczek pochodzą z jednego dużego transkryptu pierwotnego będącego produktem transkrypcji tzw. rDNA (Ryc. 1), natomiast 5S rRNA jest transkrypcją samodzielną. Rybosomowy DNA (rDNA) u eukariontów powtarza się setki, a nawet tysiące razy w układzie tandemowym. Znajduje się w specjalnych miejscach chromosomów, które są związane z tworzeniem jąderka. Podczas oogenezy u *Xenopus laevis* rDNA jest selektywnie replikowany kilka tysięcy razy, co powoduje zwiększenie liczby jego kopii do 2×10^6 , tak że stanowią one ok. 75% DNA oocytów. Cząsteczki RNA wchodzące w skład prekursorowego rRNA są po

Contents:

- I. Introduction
- II. Classification and structure of snoRNAs
- III. Genes of snoRNAs
- IV. Transcription and maturation of snoRNAs
- V. Proteins associating with snoRNAs
- VI. Involvement of snoRNAs in rRNA maturation
 - VI-1. Involvement of snoRNAs in rRNA processing
 - VI-2. Involvement of snoRNAs in rRNA 2'-O-methylation
 - VI-3. Involvement of snoRNAs in rRNA pseudouridylation
- VII. Concluding remarks

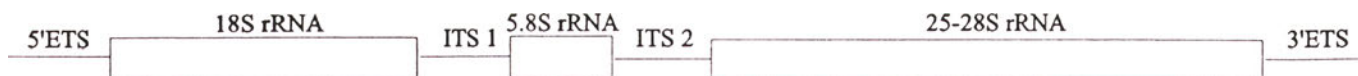
transkrypcji wycinane oraz chemicznie modyfikowane. Modyfikowaniu ulegają tak zasady, jak i reszty rybozowe nukleozydów rybosomowych cząsteczek RNA. U kręgowców cząsteczki rRNA zawierają ok. 100 metylowanych reszt cukrowych, 95 pseudourydyn i 10 metylowanych zasad. Natomiast u drożdży modyfikacje te są o połowę mniej liczne.

W procesie dojrzewania cząsteczek RNA takich, jak pre-mRNA czy pre-rRNA udział biorą małe cząsteczki RNA, które ze względu na lokalizację oraz pełnią funkcję podzielić można na dwie klasy: małe jąderkowe RNA (snRNA — ang. *small nuclear RNA*) oraz małe jąderkowe RNA (snoRNA — ang. *small nucleolar RNA*). Cząsteczki jąderkowych snRNA uczestniczą w dojrzewaniu pre-mRNA na terenie jądra, podczas gdy jąderkowe cząsteczki snoRNA biorą udział w dojrzewaniu pre-rRNA (lub i w biogenezie rybosomu) na terenie jąderka [1-3].

Wszystkie dotąd scharakteryzowane małe jąderkowe RNA są pochodzenia eukariotycznego (większość pochodzi z drożdży, a pozostałe z kręgowców). Nie ma natomiast dowodu na to aby jakiegokolwiek cząsteczki podobne do snoRNA brały udział w dojrzewaniu prokariotycznych rRNA. Jedynie u bakterii *Sulfolobus acidocaldarius*, należącej do królestwa *Archaeobacteria*, odkryto małe cząsteczki RNA będące podobne pod względem funkcjonalnym do eukariotycznego U3 snoRNA. Te tak zwane U3-podobne RNA są podstawowym składnikiem archeobakteryjnej RNP endonukleazy biorącej udział w dojrzewaniu 16S rRNA. W obrębie cząsteczki podobnej do U3 znajduje się motyw nukleotydowy komplementarny do regionu pre-rRNA zawierającego trzy miejsca hydrolizy wiązań fosfodiesterowych generujących 16S rRNA [4-7].

Podobnie do snRNA biorących udział w splicingu

¹ Mgr, ² dr hab., Zakład Ekspresji Genów, UAM ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań



Ryc. 1. Transkrypt pierwotny eukariotycznych rybosomowych RNA pochodzących z rDNA. Częsteczki 18S, 5.8S i 25/28S rRNA kodowane są w transkrypcie pierwotnym oskrzydłonym zewnętrznymi sekwencjami niekodującymi: 5' ETS i 3' ETS (ang. *external transcribed spacers*) oraz rozdzielone przez dwie wewnętrzne sekwencje niekodujące: ITS 1 i ITS 2 (ang. *internal transcribed spacers*).

pre-mRNA, snoRNA łączą się ze specyficznymi białkami i występują jako osobne kompleksy rybonukleinoproteinowe zwane snoRNP. Uważa się, że snoRNP łączą się z pre-rRNA, białkami rybosomalnymi oraz białkami nierybosomalnymi tworząc olbrzymie kompleksy biorące udział w dojrzewaniu rRNA i składaniu podjednostek rybosomalnych. Brak pewnych specyficznych snoRNA i zasocjowanych z nimi białek lub mutacje w częsteczkach snoRNA blokują dojrzewanie dużych transkryptów rRNA i hamują produkcję częsteczek 18S, 5.8S i 25S/28S rRNA [3].

II. Klasyfikacja snoRNA i ich struktura

Częsteczki małych jąderkowych snoRNA można podzielić na dwie grupy w zależności od sposobu ich powstawania. Pierwsza to nie-intronowe snoRNA. Nazwa ta dotyczy częsteczek RNA, które kodowane są przez „samodzielne jednostki genowe” (zwane dalej genami niezależnymi). Druga grupa to intronowe snoRNA. Są to częsteczki, których sekwencje kodujące zawarte są w intronach różnych pre-mRNA.

Inny rodzaj klasyfikacji opiera się na obecności pewnych konserwatywnych struktur i sekwencji nukleotydowych w snoRNA. Pierwsza grupa częsteczek snoRNA posiada konserwatywne bloki C i D. Te snoRNA, zwane C/D snoRNA, zasocjowane są z fibrylaryną i większość z nich (tzw. antysensowne snoRNA) jest istotna dla prawidłowej metylacji reszt rybozowych w rRNA. Drugą grupę stanowią snoRNA odznaczające się obecnością tzw. bloku H (sekwencja: ANANNA, gdzie N oznacza jakikolwiek nukleotyd) oraz sekwencji nukleotydowej ACA [8, 9]. Częsteczki te, zwane ACA snoRNA, zasocjowane są z istotnym białkiem jąderkowym — Gar 1. Dowiedziono, że pełnią istotną rolę w pseudorydytacji rRNA. Tabe-

la 1 przedstawia klasyfikację snoRNA pod kątem konserwatywnych struktur i sekwencji nukleotydowych.

Kilka sekwencji nukleotydowych oraz elementów struktur drugorzędowych jest konserwatywnych wśród częsteczek snoRNA. Sekwencje konserwatywne stanowi sześć elementów, znanych jako domeny A i B, bloki C i D, blok H, sekwencja ACA oraz fragmenty sekwencji nukleotydowej snoRNA komplementarne do rRNA. Elementy te nie są identyczne w każdym snoRNA, w którym występują ale wykazują między sobą wysokie podobieństwo. Domeny A i B istnieją jedynie w U3 oraz w U14 (nie są to jednak domeny homologiczne) [10, 11], podczas gdy bloki C i D występują zarówno w U3 i U14 jak i w wielu innych snoRNA, zazwyczaj razem. Zidentyfikowano również blok podobny do C (zwany C') zlokalizowany w U3 oraz blok podobny do D (zwany D') występujący w kilku innych rodzajach snoRNA (rozdział VI-2).

Domeny A oraz B zawarte w U3 i U14 snoRNA są komplementarne do różnych regionów 18S rRNA. Analizy genetyczne wykazały, że obie domeny w drożdżowym U14, długości 13 i 14 nukleotydów są istotne dla produkcji dojrzałego 18S rRNA. Są one konserwatywne pośród wszystkich U14 RNA (zarówno u drożdży jak i u kręgowców) i są podstawowe dla aktywności U14. Zostały przeprowadzone eksperymenty wykazujące ważność komplementarności zasad między U14 a 18S rRNA. W doświadczeniach tych wprowadzona letalna mutacja punktowa w domenie A U14 snoRNA została „zneutralizowana” przez odpowiednią zmianę zasady w 18S rRNA przywracającą komplementarność [12]. Również bezpośrednie porównanie między U3 a pre-rybosomalnym RNA (w regionie 5' ETS) wymagane jest do syntezy 18S rRNA [10]. Mutacje w pre-rRNA, które znoszą to oddziaływanie są letalne i hamują syntezę 18S rRNA. Natomiast bloki

Tabela 1.

Klasyfikacja snoRNA pod kątem obecności konserwatywnych struktur i sekwencji nukleotydowych

Klasa	snoRNA	Funkcja	Białka zasocjowane z tą klasą częsteczek snoRNA
C/D snoRNA wyznaczające miejsce metylacji	Wiele częsteczek snoRNA u drożdży i kręgowców	Długie sekwencje komplementarne do rRNA wyznaczają miejsce metylacji rybozy	Fibrylaryna Nop1
Inne C/D snoRNA	U3, U8, U14, U22	Wymagane do dojrzewania pre-rRNA	Fibrylaryna Nop1
ACA snoRNA wyznaczające miejsce pseudouridytacji	Wiele częsteczek snoRNA u drożdży i kręgowców	Wyznaczają miejsca syntezy pseudourydyny	Gar1
Inne ACA snoRNA	snR10, snR30	Wymagane do dojrzewania pre-rRNA i biogenezy rybosomów	Gar1
Endonukleazy	RNaza MRP	Dojrzewanie pre-rRNA w miejscu A ₃	Pop1, Pop3, Pop4

C, C', D i D' nie wykazują komplementarności w stosunku do rRNA i biorą prawdopodobnie udział w dojrzewaniu snoRNA oraz w powstawaniu kompleksów snoRNP. U drożdży bloki C i D (oba po 6 nukleotydów) są wymagane do akumulacji U14 oraz do wiązania się tego RNA z fibrylaryną. W pracowni M. P. Terns'a wykazano, że blok D odgrywa kluczową rolę w zatrzymywaniu U3 i U8 snoRNA (*X. laevis*) w jąderku, hipermetylacji 5' kapu oraz istotny jest dla stabilności tych cząsteczek [13].

Wykazano, że bloki D oraz D' w antysensownych snoRNA są elementami, które w sekwencji rRNA precyzyjnie wyznaczają nukleotydy mające ulec metylacji [14], natomiast blok H i sekwencja ACA wyznaczają urydinę mającą następnie ulec izomeryzacji dającej pseudourydinę, o czym napisano szczegółowo w rozdziale szóstym [15].

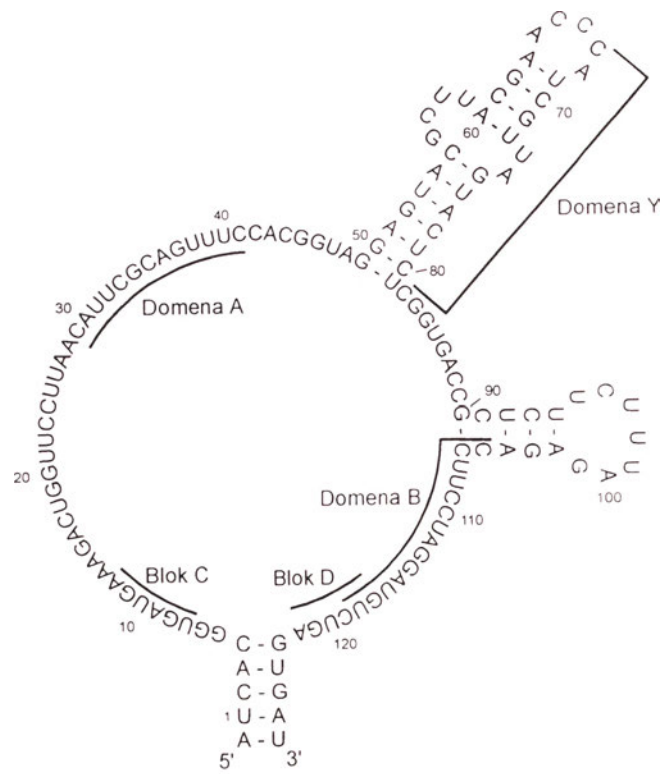
Podobnie jak w przypadku bloków C i D, blok H oraz sekwencja ACA są wymagane do dojrzewania i stabilności tej grupy snoRNA [8].

Wśród snoRNA istnieje wiele takich cząsteczek, które zawierają albo bardzo długie regiony (o długości do 21 nukleotydów) komplementarne do rRNA — C/D snoRNA albo krótkie (5-12 nukleotydów) — ACA snoRNA. Obecność tych regionów daje możliwość bezpośredniego oddziaływania cząsteczek snoRNA z rRNA na zasadzie komplementarności zasad. Elementy te są komplementarne do regionów konserwatywnych w 18S i 25/28S rRNA i są istotne dla procesu metylacji i pseudourydylacji rRNA.

Informacje odnośnie struktury drugorzędowej małych jąderkowych snoRNA są dostępne jedynie dla kilku snoRNA (U3, U14 i 7-2/MRP) [3, 16-21]. Na przykład wszystkie U14 snoRNA charakteryzują się obecnością tzw. „5', 3' ramienia końcowego”, w skład którego wchodzi parujące się ze sobą sekwencje leżące po 5' stronie bloku C oraz po 3' stronie bloku D wraz z tymi blokami (Ryc. 2). Wyniki badań metodą ukierunkowanej mutagenazy wykazały, że obecność tego ramienia jest podstawowym warunkiem do akumulacji drożdżowego U14. Bloki C i D oskrzydlają sparowane ramię końcowe tworząc tzw. motyw „Y”. Motyw ten występuje na końcach kilku snoRNA, ale nie wszystkie snoRNA zawierające bloki C i D charakteryzują się jego obecnością. Charakterystyczną cechą U14 snoRNA pochodzących z drożdży i roślin jest obecność dodatkowej domeny, zwanej domeną Y (Ryc. 2). Domeny tej brak w U14 snoRNA kręgowców [22]. Nie należy mylić domeny Y („Y” pochodzi od angielskiego słowa „yeast” — drożdże) z tzw. motywem Y złożonym z bloku C, D oraz sparowanego „5', 3' ramienia końcowego”.

III. Geny małych jąderkowych RNA

Geny snoRNA wykazują niezwykle dychotomię organizacji w genomie jądrowym. Jedna klasa jest zorganizowana w sposób „tradycyjny” zawierając sek-



ramię końcowe: motyw Y

Ryc. 2. Drugorzędowa struktura U14 snoRNA pochodzącego z *S. cerevisiae*. Wszystkie U14 snoRNA posiadają cztery elementy konserwatywne oraz 5', 3' ramię końcowe. Elementami konserwatywnymi są domeny A i B (13 i 14 nukleotydów długości), które są komplementarne względem konserwatywnych sekwencji w 18S rRNA, oraz bloki C i D. Domena Y (nie mylić z tzw. motywem „Y”) jest obecna jedynie w U14 drożdży i roślin.

wencję promotorową z 5' oraz sekwencję terminatorową z 3' strony genu. Są to „niezależne” geny snoRNA. Geny te u drożdży niemal wszystkie występują jako rozproszone, pojedyncze kopie genów. Wyjątek stanowią U3, snR190 i U14 (U3 kodowane jest przez dwa geny, a snR190 i U14 powstają z jednej jednostki kodującej i są transkrybowane wspólnie w postaci jednego prekursora). U kręgowców geny U3 są również rozproszone w genomie, ale występują w wielu kopiach. U kręgowców i u roślin istnieją pseudogeny U3. Również u kręgowców istnieją pseudogeny U13 [3]. W przypadku drożdżowych U3 snoRNA charakterystyczna jest dodatkowo obecność intronu w obrębie sekwencji kodującej snoRNA [23-26].

Druga klasa genów kodujących snoRNA jest całkowicie nietypowa. Sekwencje kodujące ten rodzaj cząsteczek snoRNA zawarte są w intronach genów kodujących białka. Obecność jednostek kodujących snoRNA w obrębie intronów pre-mRNA była pierwszy raz zaobserwowana w przypadku U14 snoRNA. W intronach 5, 6 i 8 genu białka szoku termicznego żaby szponiastej — hsc70 zidentyfikowano odpowiednio trzy geny U14 [18]. Również introny genów białka rybosomalnego L1, czy intron genu nukleoliny (uczestniczącej w dojrzewaniu pre-rRNA), kodują cząsteczki snoRNA [3]. Interesującym zjawiskiem jest możliwość kodowania jednego rodzaju snoRNA (np. U14) w

różnych genach tego samego organizmu [27] jak i występowanie jednego rodzaju snoRNA (np. U21) w intronach różnych genów, ale pochodzących z różnych organizmów [28]. Zdziwiający jest fakt, że co najmniej jeden snoRNA jest kodowany i jako intronowy, i jako nie-intronowy gen. U14 jest kodowany przez gen wbudowany w intron u ssaków, gadów i ryb, natomiast u *S. cerevisiae* jest kodowany przez gen „niezależny”. U kukurydzy geny U14 są zorganizowane tandemowo. Ta mieszanka różnych sposobów kodowania może mieć ciekawe znaczenie dla ewolucji genów snoRNA [3].

Wiele białek zawierających w intronach swoich genów sekwencje kodujące snoRNA jest związanych z syntezą lub funkcją rybosomów (np. w intronach genów białek rybosomalnych S3, L1 i L5 kodowane są U15, U16, U18, U20 i U21) lub z regulacją podziału komórkowego (np. intron genu białka RCC1 kodujący U17) [3]. Ten układ organizacyjny sugeruje potencjalne powiązanie regulacji metabolizmu jądrowego RNA i koordynacji produkcji rybosomów z innymi procesami komórkowymi, takimi jak np. cykl komórkowy. Wydaje się to potwierdzać usytuowanie U17 w intronie ludzkiego genu RCC1, istotnego dla kondensacji chromatyny i replikacji DNA. Taka lokalizacja snoRNA zapewnia koordynację biogenezy rybosomów z cyklem komórkowym (ang. *feedback scheme*). Występowanie jednostek kodujących snoRNA w kilku intronach wymienionych genów jest również logiczne jeżeli wziąć pod uwagę wysoki poziom ekspresji tych genów. Umieszczenie snoRNA, uczestniczących w procesie dojrzewania rRNA, w obrębie intronów pre-mRNA może łączyć i koordynować ekspresję transkryptów polimerazy RNA I i II, synchronizując dojrzewanie mRNA z syntezą rRNA i ostatecznie z biogenezą rybosomów.

IV. Transkrypcja i dojrzewanie snoRNA

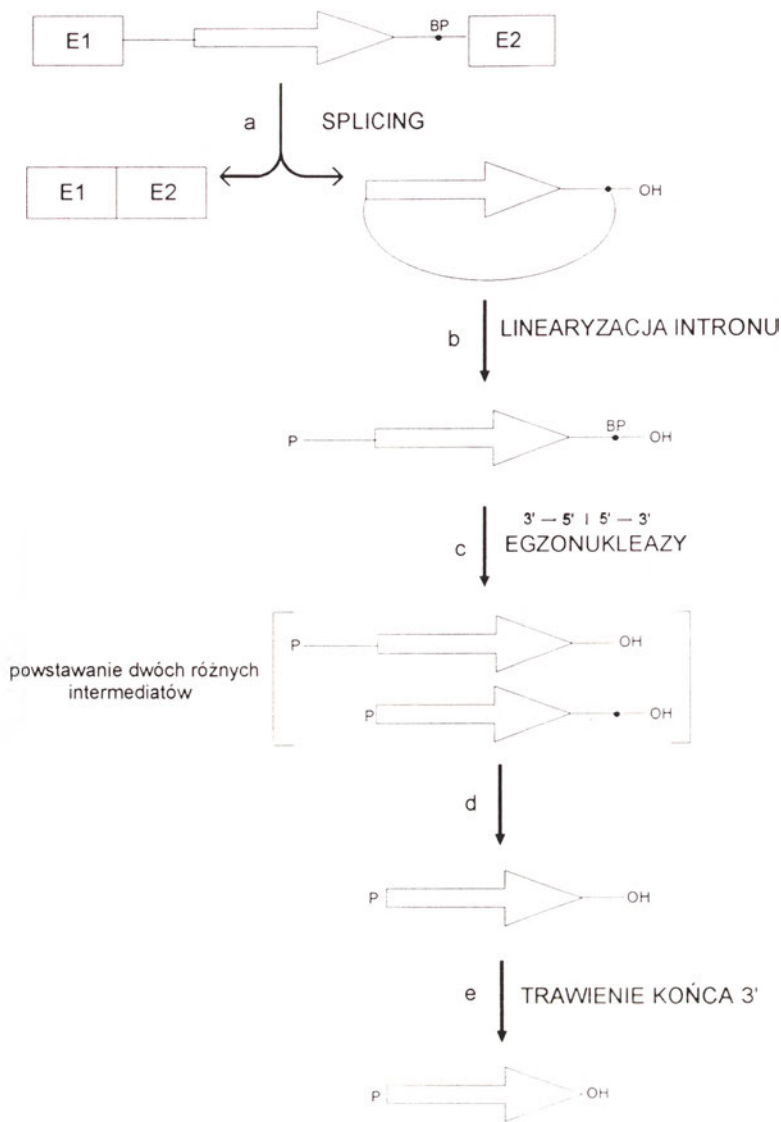
Cząsteczki snoRNA są syntetyzowane głównie przez polimerazę RNA II (np. U3, U8 i U13 kręgowców i drożdży). Natomiast 7-2/MPR RNA z kręgowców i roślin, oraz roślinne geny U3 (z pomidora, tytoniu, pszenicy, kukurydzy i rzodkiewnika) są transkrybowane przez polimerazę RNA III [3, 23-25]. Wśród wszystkich poznanych dotąd cząsteczek snoRNA zaobserwowano trzy różne typy końców 5'. Duża część snoRNA kręgowców oraz większość snoRNA drożdżowych posiada w tym miejscu 2,2,7-trójmetyloguanozynę (TMG), co świadczy, że są one produktami polimerazy RNA II. Drugi rodzaj modyfikacji końca 5'-fosforan γ -monometylowy występuje w U3 snoRNA u roślin. Ten snoRNA transkrybowany jest, jak już wspomniano, przez polimerazę RNA III. Natomiast u ssaków ponad połowa snoRNA charakteryzuje się obecnością niemodyfikowanego fosforanu na 5' końcu cząsteczki. Tego typu koniec 5' swoisty jest dla cząsteczek RNA wycinanych z intronów pre-mRNA. Na-

tomiast na 3' końcach wszystkich snoRNA występuje grupa hydroksylowa (3'-OH).

Intronowe snoRNA są transkrybowane razem z kodującym je pre-mRNA i uwalniane z intronów w procesie dojrzewania. Jak już wspomniano wyżej, te małe jąderkowe RNA są kodowane zazwyczaj w intronach genów kodujących białka istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Interesujący jest przypadek genów snoRNA U22 i U25 do U31 kodowanych przez introny ssaczego genu UHG (ang. *U Host Gene*). Otóż eksony tego genu nic nie kodują. Ważne są natomiast introny kodujące cząsteczki snoRNA, np. U22 snoRNA istotny dla dojrzewania 18S rRNA u kręgowców. Istnienie tego typu genu może wyjaśniać funkcję jaką mogą pełnić w komórce ogromne ilości zdawałoby się „bezużytecznego” DNA [29, 30].

Proces dojrzewania intronowych snoRNA był po raz pierwszy zademonstrowany w eksperymencie polegającym na iniekcji do jąder oocytów *X. laevis* transkryptów mysiego białka hsc70 (zawierającego w intronie gen U14) [31] i żabiego białka rybosomalnego L1 (zawierającego w intronie gen U16) [32]. Dojrzałe U14 i U16 snoRNA były wycinane z intronów i posiadały prawidłowe 5' i 3' końce. Wykonano także eksperyment, w którym zademonstrowano dojrzewanie pochodzących z intronów cząsteczek ludzkich U15, U17 i U20 snoRNA w ekstraktach z komórek HeLa oraz komórek mysich [21, 33]. We wszystkich systemach pre-mRNA niosący intron kodujący cząsteczkę snoRNA ulega splicingowi. Jednak system używany do dojrzewania snoRNA wydaje się być niezależny od splicingu pre-mRNA. Usunięcie jednego lub obu eksonów oskrzydlaających intron powodowało powstanie dojrzałych snoRNA w trzech zastosowanych systemach: tak w oocytach *X. laevis* (U14), jak i w ekstraktach komórkowych HeLa i mysich (U15, U17) [21, 33]. Dowodzi to obecności elementów RNA istotnych dla dojrzewania w obrębie samej cząsteczki snoRNA. W zasadzie uważa się, że z pojedynczego transkryptu pre-mRNA powstaje zarówno dojrzały mRNA, jak i dojrzały snoRNA. Jeżeli model ten jest prawdziwy oznacza to, że do procesu dojrzewania intronowych snoRNA niezbędna jest aktywność nukleazowa „generująca” dojrzałe końce snoRNA. Obecnie rozważa się dwa możliwe mechanizmy „cięcia” nukleolitycznego. W pierwszym z nich wycięty intron ma na początku strukturę lassa (wynikającą z reakcji splicingu). Następnie dochodzi do linearyzacji formy lassa, a kolejnym etapem jest egzonukleolityczne trawienie liniowego intronu. Drugi schemat zakłada, że najpierw następuje cięcie endonukleolityczne w obrębie jednej lub obu sekwencji oskrzydlaających intron, a następnie ma miejsce „dotrawienie” egzonukleolityczne.

Wydaje się, że dojrzewanie U17 i U19 przebiega zgodnie z pierwszym opisanym wyżej schematem (patrz Ryc. 3) [34, 35]. W intronach genu regulującego cykl komórkowy, RCC1, kodowane są dwie izoformy ludzkiego U17 snoRNA. Eksperymenty dotyczące



Ryc. 3. Model dojrzewania U17 i U19 snoRNA. Pre-mRNA niosący intron kodujący snoRNA podlega splicingowi, w rezultacie czego tworzony jest mRNA oraz intron w postaci lasa (a). Linearyzacja lasa (b) powoduje powstanie cząsteczki, która staje się następnie substratem dla $5' \rightarrow 3'$ i $3' \rightarrow 5'$ egzonukleazy (c). Akumulacja *in vitro* produktów dojrzałych na 5' końcu ale niedojrzałych na 3' końcu lub na odwrót wskazuje na to, że 5' i 3' końce snoRNA mogą być przycinane niezależnie od siebie. Dojrzewanie 3' końców może zachodzić w dwóch etapach. Po pierwsze, tworzone są półstabilne produkty pośrednie dojrzewania z 5-9 dodatkowymi nukleotydami na końcach 3' (d). Konwersja takich produktów do cząsteczek snoRNA z dojrzałymi 3' końcami przebiega powoli i jest najprawdopodobniej katalizowana przez egzonukleazy (e) [34, 35]. Nie wiadomo czy w dojrzewaniu 3' końców udział bierze jedna czy dwie różne egzonukleazy. Oznaczenia: E1 — ekson pierwszy, E2 — ekson drugi, linia — intron, duża pusta strzałka — gen snoRNA, BP — miejsce rozgałęzienia (ang. branch point), P — grupa fosforanowa, OH — grupa hydroksylowa.

dojrzewania tych trzech intronowych snoRNA (U17a, U17b oraz U19 kodowanego przez intron nie w pełni scharakteryzowanego genu) w ekstrakcie z komórek HeLa sugerują, że to raczej egzo- niż endonukleazy zaangażowane są w proces dojrzewania U17 i U19 RNA. Wskazują na to następujące fakty: (1) nie zidentyfikowano oczekiwanych produktów trawienia endonukleolitycznego; (2) „kapowanie” lub cyrkularyzacja pre-snoRNA hamowała powstawanie snoRNA; (3) U17 był wydajnie wycinany z substratu niosącego „obce” sekwencje oskrzydłające. Kumulacja, *in vitro*, produktów dojrzałych na 5' końcu ale niedojrzałych na końcu 3' lub *vice versa*, wskazuje na niezależne dojrzewanie obu końców snoRNA. Wykazano także, że dojrzewanie końca 3' może zachodzić w dwóch etapach. Najpierw powstają niestabilne intermedyaty z 5-9 nukleotydowymi „ogonami” na 3' końcu, a następnie nukleotydy te są wolno usuwane przez egzonukleazę [34]. W celu przestudiowania dojrzewania *in vivo*, regiony kodujące cząsteczki U17 i U19 snoRNA umieszczono sztucznie w intronie 2 ludzkiego genu β -globiny. Ekspresja tych pre-mRNA w małych komórkach COS dała wyniki w postaci prawidłowo dojrzałych snoRNA i prawidłowo złożonego globino-

wego mRNA. Stanowi to dowód, że snoRNA mogą być wycinane z genów „nierodzicielskich” i że ich sekwencje zawierają wszystkie sygnały niezbędne do zajęcia prawidłowego dojrzewania [34].

Wszystkie dostępne dane wskazują na to, że mechanizmy procesu dojrzewania U14, U15 i U20 kręgowców [21, 31, 33] są podobne do tego opisanego dla U17 i U19 snoRNA.

Transkrypty pre-mRNA, które zawierają snoRNA, często niosą kilka sekwencyjnych odmian tego samego snoRNA lub, w pewnych przypadkach, dwa różne rodzaje snoRNA są zlokalizowane w różnych intronach tego samego genu. Nie wiadomo było jednak czy pojedynczy intron może zawierać regiony kodujące dwie lub więcej cząsteczek snoRNA. W celu wyjaśnienia tej kwestii wklonowano do intronu 2 ludzkiego genu β -globiny dwa regiony kodujące różne snoRNA (U17a i U17b) rozdzielone fragmentem DNA o długości 36 nt. Taki pre-transkrypt ulega prawidłowemu splicingowi, jednak zamiast dojrzałych U17a i U17b RNA otrzymano fragment odpowiadający rozmiarowo tandemowi U17ab RNA, który jest prawidłowo „przycięty” na 5' końcu sekwencji U17a i na 3' końcu sekwencji U17b. Brak cięć na 3' końcu U17a lub 5'

końcu U17b jest argumentem negującym udział endonukleaz miejscowo-specyficznych w dojrzewaniu tych miejsc. Rozdzielenie regionów kodujących dwa U17 snoRNA funkcjonalnym eksonem zaowocowało powstaniem dwóch pojedynczych dokładnie „przyciętych” snoRNA U17a i U17b. To potwierdza zasadę „jeden intron — jedna cząsteczka snoRNA” mówiącą, że tylko pojedynczy snoRNA może być w pełni prawidłowo wycinany z pojedynczego intronu [34].

Według drugiego schematu „cięcia” endonukleolitycznego opisanego wyżej powstaje cząsteczka U16. U16 snoRNA, kodowany przez trzeci intron białka rybosomowego L1 z *Xenopus laevis*, jest uwalniany z pre-mRNA w drodze dojrzewania zarówno w systemie *in vitro* jak i *in vivo* [36]. Wykazano, że w niedalekiej odległości miejsc wycinania U16 snoRNA w obrębie intronu obecne są sekwencje mogące wykazywać aktywność autokatalityczną [37]. Elementy te są konserwatywne w dwóch kopiach L1 z *Xenopus laevis* oraz w pojedynczej kopii L1 z *X. tropicalis*. Aktywność katalityczna odpowiada tej opisanej dla rybosomu typu szpilki: jest zależna od jonów Mn^{2+} , produkuje 2'-3' cykliczny fosforan, 5'-OH koniec i zawiera zasadniczy element GAAA. Do katalizy niezbędna jest grupa 2'-OH reszty guanozynowej wchodzącej w skład w.w. elementu.

Również nie-intronowy prekursor drożdżowego U14 właściwie ulega procesowi dojrzewania w jądrze oocytu *Xenopus laevis*, co sugeruje, że elementy odpowiedzialne za prawidłowe dojrzewanie są ewolucyjnie konserwatywne w obrębie struktury obu intronowego i nie-intronowego U14. W przypadku intronowych snoRNA zasocjowanych z fibrylaryną (np. U14 i U16) jest prawdopodobne, że tzw. motyw „Y” działa jako element istotny dla dojrzewania snoRNA [16, 19, 20, 38]. Wiązanie fibrylaryny i/lub innych białek do tych drugorzędowych elementów strukturalnych mogłoby chronić końce 5' i 3' snoRNA przed degradacją egzonukleolityczną dojrzałego snoRNA. Przeciwciała antyfibrylarynowe wytrącają zarówno transkrypty pre-mRNA L1 zawierające U16 jak i samą dojrzałą cząsteczkę U16, co sugeruje, że składanie rybonukleoproteiny (snoRNP) może rozpoczynać się już w momencie, gdy snoRNA jest nadal częścią intronu pre-mRNA. Intronowe snoRNA, które nie są zasocjowane z fibrylaryną, takie jak U17 i U19, nie posiadają motywu „Y” co świadczy o tym, że inne nadal nie zidentyfikowane elementy strukturalne muszą być odpowiedzialne za oddziaływanie tej klasy snoRNA z białkami oraz za ich dojrzewanie [39].

Istnieje możliwość, że rybosomowe i nie-rybosomowe białka mogą wiązać się do intronowych snoRNA na poziomie prekursora i decydować czy snoRNA mają ulec wycięciu z transkryptu pre-mRNA. B o z z o n i i w s p. wykazali, że fragmenty pre-mRNA kodujące intron 3 genu białka L1 z *X. laevis* ulegają albo splicingowi, prowadzącemu do powstania dojrzałego mRNA, albo są „cięte” endonukleolitycznie w obrębie

intronu. W wyniku tego ostatniego procesu uwalniane są prekursorzy U16 RNA, których 5' i 3' oskrzydłujące sekwencje końcowe są następnie usuwane. Te wyniki sugerują, że całe cząsteczki pre-mRNA, a nie wycięte introny jak to jest w przypadku np. U14, U17 i U19, są substratami dla dojrzewania U16 RNA, wskazując na to, że splicing pre-mRNA i tworzenie snoRNA są reakcjami wykluczającymi się wzajemnie. Podobny mechanizm wycinania został zaproponowany dla U18 RNA kodowanego przez inne introny genu L1 u *X. laevis* [36, 37].

Nieznane jest miejsce dojrzewania intronowych snoRNA w obrębie jądra, ale pierwszorzędnym kandydatem jest aparatura spliceosomu. Taka lokalizacja mogłaby mieć znaczenie dla koordynacji i regulacji składania pre-mRNA (splicingu) i dojrzewania snoRNA. Analizy dojrzewania U16 wykazały, że białko wiążące się do pre-mRNA (hnRNP białko C) może wiązać się do sekwencji oskrzydłujących intron i wpływać na wydajność dojrzewania snoRNA z uwzględnieniem splicingu pre-mRNA [40].

V. Białka kompleksujące z snoRNA

SnoRNA występują na terenie jąderka jako kompleksy rybonukleoproteinowe. Każdy snoRNP jest złożony z zestawu białek i metabolicznie stabilnego małego jąderkowego RNA. Pierwsze dowody tego typu organizacji pochodzą z immunologicznych danych otrzymanych przy użyciu przeciwciał od pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi. Większość jąderkowych przeciwciał jest skierowanych przeciw fibrylarynie, ewolucyjnie konserwatywnemu białku o masie ok. 34 kDa, zlokalizowanemu w zwartym włóknikowym regionie jąderka. Tutaj zachodzą wczesne stadia dojrzewania rRNA oraz składania rybosomów. Fibrylaryna została scharakteryzowana w wielu organizmach eukariotycznych, takich jak: człowiek, mysz, żaba szponiasta, śluzowiec i drożdże [3]. Fibrylaryna jest obficie występującym jąderkowym białkiem, które odgrywa fundamentalną rolę we wszystkich podstawowych potranskrypcyjnych etapach biosyntezy rybosomów takich jak: dojrzewanie pre-rRNA, modyfikacja rRNA i składanie rybosomów. Odkryto, że fibrylaryna jest zasocjowana z większością snoRNP.

Antyfibrylarynowe przeciwciała wytrącają wiele snoRNA pochodzących z kręgowców (choć nie wszystkie) włączając TMG-kapowane U3, U8 i U13 jak również kodowane przez introny U14, U15, U16, U18, U20, U21, U22 i U24 snoRNA [3]. Większość drożdżowych snoRNA również wytrąca się po reakcji z ludzkimi przeciwciałami antyfibrylarynowymi, co wskazuje na ewolucyjnie zachowawczą strukturę tego białka i asocjację z snoRNA (odpowiednikiem fibrylaryny u drożdży jest białko NOP1).

Analizy biochemiczne wykazały dwie klasy kompleksów białkowo-rybonukleinoproteinowych (sno-

-RNP) istniejące zarówno w organizmach jedno- jak i wielokomórkowych. Klasa pierwsza (współczynnik sedymentacji 10-15S) to monomeryczne snoRNP. Klasa druga (70-90S) to duże kompleksy złożone prawdopodobnie z snoRNP zasocjowanych z rRNA w domniemanym kompleksie dojrzewania pre-rRNA.

Dotychczas zidentyfikowano niewiele białek zasocjowanych z snoRNA. Immunoprecypitacja licznych snoRNA tkankowców oraz niemal wszystkich drożdżowych snoRNA z przeciwciałami antyfibrylarynymi sugeruje, że fibrylaryna/NOPI jest powszechnym składnikiem wielu snoRNP. Fibrylaryna posiada dwa motywy: motyw rozpoznający RNA (RRM) oraz sekwencję bogatą w glicynę i argininę (GAR). Asocjacje fibrylaryno-snoRNP mogą powstawać zarówno w wyniku oddziaływań pośrednich typu białko-białko, jak i bezpośredniego wiązania do snoRNA lub rRNA. Ponieważ fibrylarynę łatwo usunąć z kompleksu niskim stężeniem soli, uważa się, że nie jest ona umiejscowiona w rdzeniu snoRNA, ale na jego obrzeżu.

Zidentyfikowano białko wiążące się do rdzenia cząsteczki ludzkiego U3. Ma ono masę około 55 kDa [41]. Do centralnego regionu ludzkiego 7-2/MRP RNA wiąże się białko Th [42]. Dwa białka zasocjowane z MRP (drożdżowa rybonukleaza niezbędna do dojrzewania 5,8S rRNA) oznaczone jako POP1 i SNM1 zidentyfikowano w drożdżach, ale nie udowodniono, że wiążą się one bezpośrednio do snoRNA [43, 44].

W drodze badań immunologicznych trzy inne białka jąderkowe zostały uznane za wiążące się z drożdżowymi snoRNA: SOF1 (U3) [45], Gar1 (snR10 i snR30) [46, 47] i SSB1 (snR11) [47], przy czym odkryto, że białko SOF1 jest zasocjowane z NOPI. Białka te posiadają motywy będące potencjalnymi miejscami wiązania do RNA. Jednak odkryto, że również inne białka jąderkowe (nukleolina, NSR1, NOP77 i NOP4) mające wpływ na dojrzewanie rRNA posiadają te motywy, a jednak nie są zasocjowane z snoRNA [3].

Białkami zasocjowanymi z snoRNA i biorącymi udział w dojrzewaniu drożdżowego pre-rRNA są: NOPI [49, 50], SOF1 [45], Gar1 [46, 47], POP1 [43] i SNM1 [44]. NOPI, SOF1 i Gar1 są wymagane do tych samych etapów wczesnego dojrzewania 18S rRNA co U3, U14 i snR30. Jednak oprócz tej funkcji białko NOPI wpływa także w jakiś sposób na proces metylacji rRNA.

Znane są także białka nie zasocjowane z rybosomami i snoRNA, które mają zasadniczy wpływ na dojrzewanie rRNA: XNR1, RAT1, NSR1, NOP77, SPB4, DRS1, CA9 i RNA1 [3].

VI. Udział snoRNA w dojrzewaniu pre-rRNA

VI-1. Udział snoRNA w reakcjach „rozcinań” prekursorowego rRNA

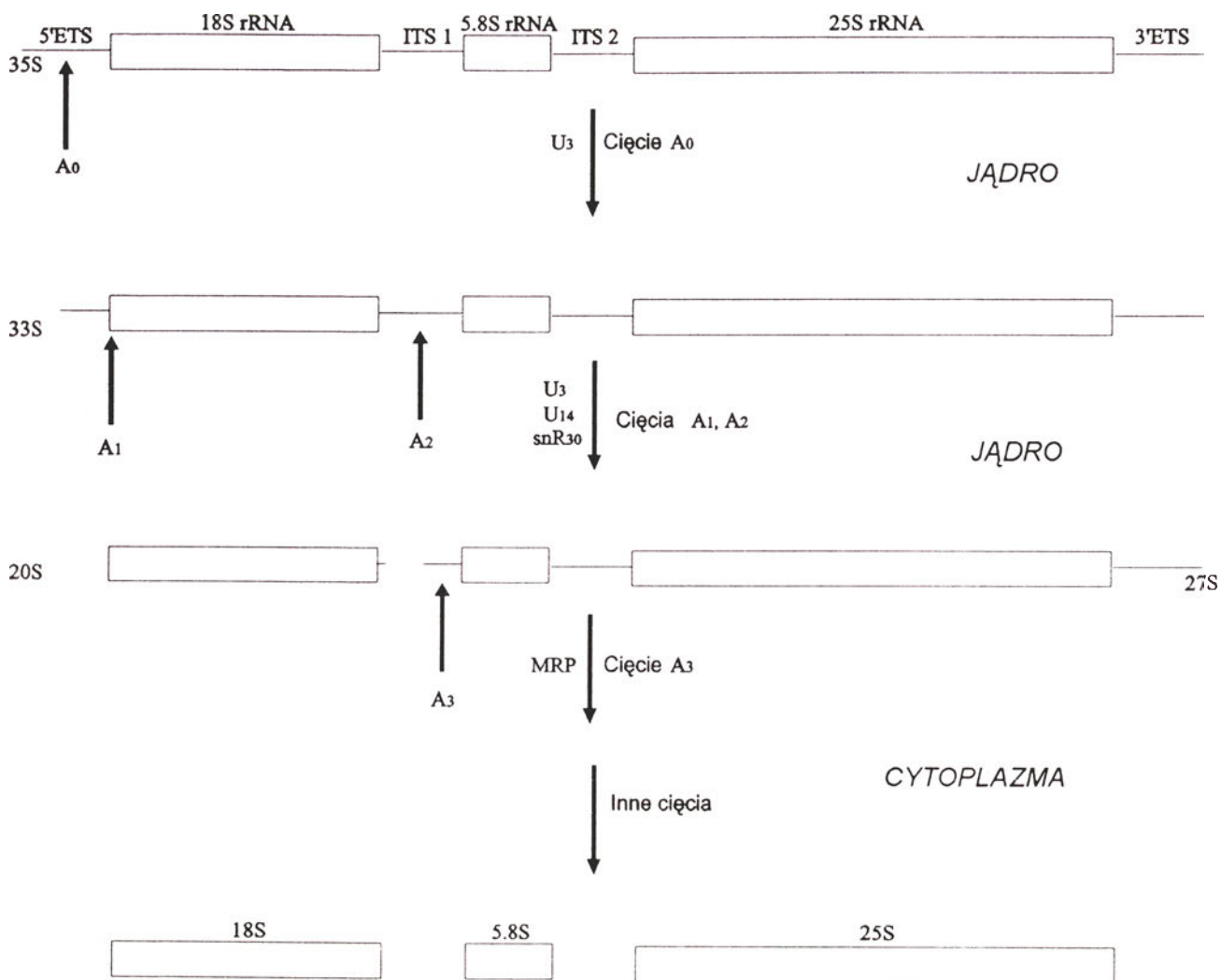
Podobnie do małych jąderkowych RNA biorących

udział w dojrzewaniu pre-mRNA, małe jąderkowe RNA uczestniczą w dojrzewaniu pre-rRNA. Obecnie wiemy, że w procesie „cięcia” pre-rRNA bierze udział pięć drożdżowych snoRNA, to jest: U3, U14, snR10, snR30 i MRP (przy czym brak snR10 nie powoduje zahamowania dojrzewania pre-rRNA) oraz sześć snoRNA u kręgowców, to jest: U3, U8, U14, U17, E3 i U22 [3]. Proces dojrzewania transkryptu pierwotnego rRNA u drożdży polegający na hydrolizie wiązań fosfodiesterowych w odpowiedniej kolejności i w odpowiednich miejscach pre-rRNA, zaprezentowany na rycinie czwartej, można podzielić na tzw. „cięcia” wczesne (związane z powstawaniem 18S rRNA) oraz późne (dotyczące dojrzewania 5, 8 S i 25/28S rRNA).

SnoRNA związane z wczesnymi etapami dojrzewania u drożdży („cięcia” wczesne) to: U3, U14, snR10 i snR30 (patrz Ryc. 4), a u kręgowców to: U3, U14 i U22. Etapy te dotyczą dojrzewania 5' ETS prekursora 35S rRNA i prekursora 20S do 18S rRNA. U14 bierze udział w tej samej reakcji „cięcia” (5' ETS) co U3. Fakt, że do pewnych „cięć” potrzebnych jest więcej niż jeden rodzaj snoRNA sugeruje, że te RNA mogą funkcjonować razem jako część dużego kompleksu złożonego z wielu cząstek snoRNP analogicznego do tego, w skład którego wchodzi cząstki snRNP (spliceosom). W procesie wczesnego „cięcia” u drożdży oprócz cząsteczek U3, U14 i snR30 RNA bezpośrednio wiążących się do rRNA, udział biorą również dwa mniej znaczące snoRNA (snR10 i snR31). Brak w układzie tych dwóch ostatnich obniża jedynie wydajność reakcji [3].

Wczesne „cięcie” w miejscu A1 powoduje powstanie dojrzałego 5' końca 18S rRNA. Analizy mutacyjne pozwoliły zidentyfikować pewną ilość regionów leżących w „górnym końcu” 5'-ETS-u, włącznie z miejscem wiążącym U3, które wymagane są w układzie *cis* dla dojrzewania transkryptu w miejscu A1. Rezultaty badań wskazują, że dojrzały 5' koniec drożdżowego 18S rRNA jest rozpoznawany przez dwa częściowo niezależne systemy, oba definiujące to samo miejsce „cięcia”. Jeden mechanizm identyfikuje miejsce cięcia A1 w sposób zależny od sekwencji (ang. *sequence-specific manner*) włącznie z rozpoznawaniem filogenetycznie konserwatywnych nukleotydów bezpośrednio przed miejscem A1 w 5' ETS. Drugi mechanizm wyznacza 5' koniec 18S rRNA przez odległość miejsca „cięcia” A1 w określonym dystansie trzech nukleotydów od struktury ramię — pętla / węzeł zlokalizowanej w obrębie dojrzałej sekwencji 18S rRNA. Produkty reakcji dojrzewania transkryptu w miejscu A1 widoczne po elektroforezie na żelu poliakrylamidowym wskazują na to, że w przeciwieństwie do drożdżowego 5,8S rRNA, 5' koniec 18S rRNA powstaje wskutek „cięcia” endonukleolitycznych [11].

Z etapami dojrzewania należącymi do późnych „cięć” związane są: U3 i U8 (u kręgowców) oraz 7-2/MRP RNA (u drożdży) [3]. U3 i U8 są odpowiedzialne za hydrolizę wiązania fosfodiesterowego



Ryc. 4. Proces dojrzewania drożdżowego pre-rRNA. Dojrzewanie rozpoczyna się w miejscu A_0 w regionie 5' ETS. Następnie zachodzą „cięcia” w miejscach A_1 i A_2 , które oskrzydłają 18S rRNA. Końcowe trawienie prekursora 20S do 18S rRNA zachodzi w cytoplazmie. Do dojrzewania w miejscach A_1 i A_2 wymagana jest obecność U3, U14 i snR30 snoRNA. U3 snoRNA wymagane jest również do cięcia A_0 . Częsteczki 5,8S i 25S rRNA są uwalniane w drodze następujących po sobie kolejnych reakcji dojrzewania. W dojrzewaniu miejsca A_3 udział bierze MRP RNA. Prekursory rRNA tkankowców dojrzewają w podobny sposób.

między ITS1 a 5.8S rRNA: U8 odpowiada za „cięcie” po 3' stronie 5.8S rRNA i obu końców 28S rRNA. Natomiast u drożdży do „cięcia” ITS1 wymagany jest MRP RNA. Powstały produkt 5.8S-25S rRNA jest trawiony dalej przez egzonukleazę [10-12].

Wykazano, że tylko 4 z 21 cząsteczek snoRNA analizowanych w *S. cerevisiae* jest niezbędnych dla wzrostu, co wskazuje na to, że synteza rybosomów nie wymaga pełnego kompletu snoRNA. W dojrzewaniu rRNA u eukariontów z cząsteczkami snoRNA współpracuje białkowa endonukleaza. Wyklucza to raczej katalityczną rolę cząsteczek snoRNA w miejscach „cięcia” pre-rRNA [51].

Istnieje duża liczba podobieństw między dojrzewaniem pre-rRNA u eukariontów i bakterii. W obu przypadkach dojrzewanie 5' i 3' końców rRNA wchodzącego w skład małej podjednostki rybosomowej jest ze sobą powiązane. W bakteriach osiągnięte to jest na drodze bezpośredniego parowania między 5' i 3' sekwencjami oskrzydłającymi prekursorowy rRNA (ang. *flanking spacer sequences*). Natomiast u eukariontów w procesie dojrzewania 18S rRNA pośredniczą cząste-

czki snoRNA oddziałujące w układzie *trans* z prekursorowym rRNA [52]. Możliwe, że ten bardziej złożony system dojrzewania u eukariontów został wybrany w toku ewolucji dlatego, gdyż oferuje większe możliwości regulacji dojrzewania pre-rRNA.

VI-2. Udział snoRNA w metylacji rRNA

Najczęściej występujące modyfikacje rRNA, 2'-O-metylacja reszt rybozowych oraz pseudourydylacja, powstają w rRNA na terenie jąderka podczas dojrzewania prekursorowego rRNA [14, 53, 54].

Jak już w tym artykule wspomniano wiele cząsteczek snoRNA charakteryzuje się obecnością sekwencji komplementarnych do fragmentów pre-rRNA. Cząsteczki zawierające takie sekwencje nazwano antysensownymi snoRNA. Sekwencje te niezbędne są dla pełnionej przez te snoRNA funkcji, a mianowicie wyznaczania miejsca 2'-O-metylacji. Wszystkie dotąd zidentyfikowane antysensowne snoRNA są wytrącane z ekstraktów przeciwciałami antyfibrylarynowymi i wszystkie zawierają blok C (5'-UGAUGA-3') oraz

blok D (5'-CUGA-3'), charakterystyczne dla większości snoRNA (patrz Ryc. 5a) [14, 53, 54].

Cząsteczki snoRNA zawierające długie sekwencje komplementarne do rRNA mogą być podzielone na dwie podgrupy w zależności od umiejscowienia bloków C i D oraz sekwencji antysensownych. Jednak podgrupa cząsteczek RNA charakteryzuje się obecnością motywu „Y” i obecnością długiego elementu antysensownego bezpośrednio przed blokiem D. Natomiast cząsteczki RNA należące do podgrupy drugiej nie mają motywu „Y” i zawierają tylko dwa nukleotydy po 3' stronie bloku D, a elementy antysensowne leżą w różnych miejscach cząsteczki [55].

Cechy konserwatywne w pierwszej podgrupie mogą odzwierciedlać wspólne schematy dojrzewania: np., motyw „Y” może kodować sygnały dla wycinania tych snoRNA z intronowego RNA. Jednak mogą być one również ważne dla funkcji snoRNA.

Seqwencje komplementarne do snoRNA znajdują się w rRNA w regionach jednoniciowych (odcinki komplementarne do U14, U18, U21 i U24 i dwuniciowych (odcinki komplementarne do U20 i snR40). Kilka miejsc komplementarnych do snoRNA jest skupionych w obrębie rRNA blisko siebie (np. komplementarnych do U20 i U13). Skupienie takie sugeruje, że mogą istnieć tzw. „gorące miejsca” aktywności snoRNA. Ułożenie w rRNA sekwencji komplementarnych w grupach wydaje się być związane z wpływem snoRNA na fałdowanie pre-rRNA. Pracując kolejno lub wspólnie snoRNA mogą katalizować główne reorganizacje rRNA na różnych etapach syntezy rybosomów działając jako 'RNA chaperony'.

Istnieją dowody, że antysensowne snoRNA zassocjowane z fibrylaryną funkcjonują jako przewodniki (ang. „guide RNAs”) w miejscowo specyficznej metylacji pre-rRNA [56]. Interesujące jest, że pewne mutacje w fibrylarynie, która oddziałuje ze wszystkimi tymi snoRNA, silnie inhibują jąderkową metylację drożdżowego pre-rRNA. Sekwencje snoRNA komplementarne do rRNA, razem z blokami D i D', dostarczają wystarczającej informacji niezbędnej do wyboru docelowego nukleotydu mającego ulec metylacji [56].

Analizy porównawcze antysensownych snoRNA potwierdziły kilka wcześniej zauważonych już cech tej klasy snoRNA. Cząsteczki te zawierają jedną a rzadziej dwie (U14, U24, U45 i U50) 10-21 nt sekwencje komplementarne do konserwatywnych regionów rdzenia dojrzałych rRNA. Te antysensowne elementy usytuowane są w sąsiedztwie 3' końca lub w 5' połowie snoRNA. Za sekwencjami komplementarnymi znanymi w 3' końcowym regionie znajduje się sekwencja bloku D, podczas gdy za sekwencją antysensowną w 5' połowie snoRNA występuje zawsze motyw D-podobny, zwany blokiem D', który często zawiera zmienione nukleotydy w porównaniu z autentyczną sekwencją bloku D (patrz Ryc. 5a) [55].

Każdy nowo odkryty snoRNA, z nielicznymi wyjątkami (np. U50), „wybiera” na zasadzie komplementar-

ności region rRNA, który zawiera co najmniej jeden nukleotyd mający ulec 2'-O-metylacji [14]. Istnieją takie cząsteczki snoRNA, które zawierają w swej strukturze dwie sekwencje wyznaczające miejsca metylacji dwóch nukleotydów w rRNA (np. U24) [57]. Odległość między blokiem D lub D' snoRNA a metylowanym na rybozie nukleotydem w rRNA jest niezmienna. W snoRNA, piąty nukleotyd „w górę” od bloku D lub D' jest zawsze na przeciwko 2'-O-metylowanemu nukleotydu w sekwencji rRNA:

5'--N [N]₃ N^{met} [N]₆₋₁₇--3' rRNA

3'--AGUCN [N]₃ [N]₆₋₁₇--5' snoRNA

blok D lub D'

Odkryto 35 ssaczyc i 8 drożdżowych antysensownych snoRNA odpowiedzialnych za metylację 47 reszt rybozowych w 18S i 25/28S rRNA. Wydaje się więc prawidłowe stwierdzenie, że antysensowne snoRNA zawierające bloki C i D (poza U3 i U14 biorącymi udział w hydrolizie wiązań fosfodiesterowych pre-rRNA) są odpowiedzialne za molekularne rozpoznanie miejsc 2'-O-metylacji, które występują w obrębie pre-rRNA.

Metylacja rRNA (zasady lub rybozy) jest ograniczona do uniwersalnych, konserwatywnych regionów rdzeniowych i występuje na poziomie transkryptu pierwotnego. Chociaż dokładna funkcja grup metylowych jest nieznana, to pewne typy metylacji prawdopodobnie wpływają na konformację transkryptu. Ponieważ 2'-O-metylowane nukleozydy są zlokalizowane w ewolucyjnie konserwatywnej strukturze rdzeniowej rRNA, jest możliwe, że hydrofobowe właściwości grup metylowych mogą brać udział w etapach rozpoznawania lub fałdowania cząsteczki — procesach podstawowych dla prawidłowego funkcjonowania rRNA. W komórkach ssaczyc, zahamowanie metylacji pre-rRNA znacząco zmniejsza lub znosi całkowicie wydajność dojrzewania pre-rRNA.

VI-3. Udział snoRNA w pseudourydylacji rRNA

Drugim, pod względem częstości występowania, rodzajem modyfikacji rRNA jest pseudourydylacja. W pełni zmodyfikowane drożdżowe rRNA zawierają 43 reszty pseudourydynowe, 13 w rRNA wchodzącym w skład małej podjednostki rybosomowej i 30 w rRNA wchodzącym w skład dużej podjednostki rybosomowej [15]. Interesujące jest, że również same snoRNA zawierają modyfikacje w postaci pseudourydyny. Nieznany był dotąd mechanizm wyznaczania w sekwencji rRNA miejsca mającego ulec pseudourydylacji. Najnowsze badania wykazały, że w reakcji pseudourydylacji udział biorą małe jąderkowe RNA charakteryzujące się obecnością sekwencji ACA oraz bloku H [15, 58-60]. Dla rozpoznania miejsca pseudourydylacji istotne są następujące procesy:

1 — hybrydyzacja cząsteczki snoRNA z komple-

mentarnymi do niej elementami rRNA oskrzydłającymi miejsce modyfikacji:

2 — identyfikacja urydyny w pre-rRNA zlokalizowanej w bliskiej i stałej odległości od sekwencji ACA w snoRNA (w większości snoRNA odległość ta wynosi 15 nukleotydów, jedynie w przypadku ludzkiego U68 snoRNA wynosi ona 16 nukleotydów).

Wydaje się, że opisany tu model mechanizmu wyznaczania urydyny mającej ulec modyfikacji jest prawidłowy, gdyż wykazano doświadczalnie, że brak pełnej hybrydyzacji między snoRNA i rRNA hamuje reakcję pseudourydylacji, a zmiana odległości o jeden nukleotyd między sekwencją ACA snoRNA a mającą ulec modyfikacji urydyną w rRNA powoduje przesunięcie miejsca pseudourydylacji na sąsiednią urydynę [15].

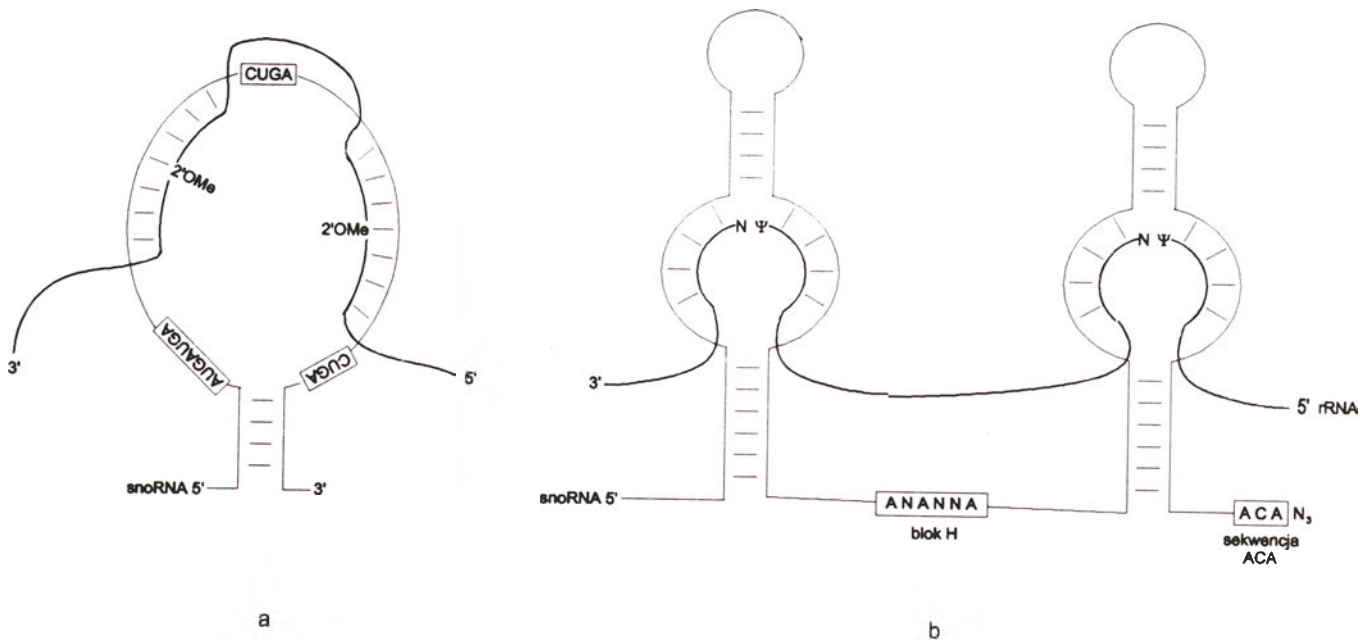
U drożdży wszystkie ACA snoRNA zasocjowane są z istotnym białkiem jąderkowym — Gar1 bogatym w reszty glicynowe i arigininowe [46, 8, 9]. Ostatnie eksperymenty udowodniły, że brak drożdżowego białka Gar1, stanowiącego normalnie składnik kompleksu rybonukleoproteinowego snoRNP, całkowicie hamuje pseudourydylację rRNA [61, 50]. Testując szczepy drożdżowe defektywne pod kątem poszczególnych snoRNA potwierdzono również udział snoRNA w pseudourydylacji [15, 52]. Wyniki badań wykazały, że cząsteczki zawierające blok ACA lub co najmniej pewna ich część funkcjonują jako cząsteczki kierujące pseudourydylacją rRNA.

ACA snoRNA zawierają, podobnie jak C/D snoRNA, sekwencje komplementarne do rRNA. Jednak w ich przypadku fragmenty te są dużo krótsze (5-12nt) niż u C/D snoRNA (do 21 nt) oraz występują parami. Tak jak w przypadku niektórych C/D snoRNA wyznaczających dwa miejsca 2'-O-metylacji reszty rybo-

zowej w rRNA (np. U24), tak i w przypadku ACA snoRNA jedna cząsteczka snoRNA może uczestniczyć w izomeryzacji dwóch urydyn (np. obecność drożdżowego snR8 jest wymagana do syntezy dwóch pseudourydyn oddalonych od siebie o 25 nukleotydów). Najczęściej jednak tylko jedna sekwencja w ACA snoRNA komplementarna do rRNA jest wykorzystywana do wyznaczenia miejsca modyfikacji (patrz Ryc. 5) [58].

Urydyna mająca ulec pseudourydylacji w rRNA leży w obrębie sekwencji komplementarnej do ACA snoRNA sama jednak nie paruje się z żadnym nukleotydem z antysensownej sekwencji snoRNA. Dla przypomnienia, miejscu 2'-O-metylacji w rRNA odpowiada komplementarny nukleotyd w antysensownej sekwencji C/D snoRNA. Sposób hybrydyzacji odcinków komplementarnych ACA snoRNA i rRNA wydaje się być najbardziej odpowiedni ze względu na reakcję pseudourydylacji. Reakcja izomeryzacji urydyny wymaga uwolnienia zasady z łańcucha polinukleotydowego, następnie dochodzi do obrotu uracylu wzdłuż osi N3-C6 o 180° i ponowne przyłączenie uracylu do rybozy tym razem jednak nie przez N1 lecz przez C5 czemu towarzyszy uwolnienie jednego atomu wodoru. Wydaje się więc logiczne, że urydyna mająca ulec pseudourydylacji nie tworzy hybrydu. Elementy oskrzydłające miejsce modyfikacji, komplementarne do sekwencji zawartych w snoRNA, są ewolucyjnie konserwatywne. Podczas hybrydyzacji z ACA snoRNA sekwencje te sparowane są z nimi usytuowanymi antyrównolegle w strukturze tzw. „pętli wewnętrznej” snoRNA (patrz rysunek 5) zarówno w jednej (blisko końca 5') jak i w drugiej (blisko końca 3') strukturze typu spinki w tej samej cząsteczce ACA snoRNA [53].

Wydaje się, że ACA snoRNA mogą wpływać na



Ryc. 5. Cząsteczki snoRNA wyznaczające nukleotydy mające ulec odpowiedniej modyfikacji: A — udział C/DsnoRNA w 2'-O-metylacji rRNA i B — udział ACA snoRNA w pseudourydylacji rRNA. Bloki C (AUGAUGA), D' („wewnętrzna” sekwencja CUGA), D (sekwencja CUGA znajdująca się na 3' końcu cząsteczki), H (ANANNA) oraz sekwencja ACA są zaznaczone ramkami „N” oznacza każdy z możliwych nukleotydów: A, C, G lub U.

wybór miejsca modyfikacji poprzez zakotwiczenie jakiejś nazwijmy to „uniwersalnej” syntazy pseudo-urydynowej lub przez indukowanie zmian konformacyjnych rRNA wymaganych do zajścia reakcji.

W świetle poczynionych badań wydaje się, że udział snoRNA w modyfikowaniu nukleozydów rRNA jest jedną z głównych funkcji cząsteczek małych jąderkowych RNA.

VII. Podsumowanie

Przedstawione w tym artykule dane eksperymentalne wskazują na niewątpliwie znaczącą rolę małych jąderkowych RNA w wielu istotnych procesach zachodzących na terenie jąderka i dotyczących syntezy rybosomów. Procesy te obejmują: dojrzewanie pre-rRNA i modyfikację nukleozydów oraz składanie podjednostek rybosomowych.

Ostatnie lata badań przyniosły odkrycie wielkiej ilości małych cząsteczek RNA pełniących różnorakie funkcje dotyczące dojrzewania cząsteczek pre-RNA. Wydaje się, że organizmy eukariotyczne wykształciły sobie raczej rozległe spektrum cząsteczek RNA kierujących mechanizmem modyfikacji aniżeli specyficzne dla każdego poszczególnego miejsca enzymy metylujące i pseudourydylujące.

Najnowsze dane eksperymentalne odkrywają całe spektrum cząsteczek snoRNA biorących udział w miejscowo specyficznej metylacji i pseudourydylacji rRNA. Stąd wydaje się słuszne stwierdzenie, że jedną z głównych funkcji snoRNA, obok udziału w „cięciu” pre-rRNA, jest udział w modyfikacji specyficznych nukleozydów rRNA.

Większość poznanych małych jąderkowych RNA to cząsteczki, których brak nie wywołuje śmierci danego organizmu. Brak takich snoRNA, jak: U3, U14, MRP czy snR30 jest letalny dla komórek drożdżowych. Warto zauważyć, że są to cząsteczki biorące udział w hydrolizie wiązań fosfodiesterowych w obrębie cząsteczki pre-rRNA.

Artykuł otrzymano 21 lipca 1997 r.

Zaakceptowano do druku 15 stycznia 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Filipowicz W, Kiss T (1993) *Mol Biol Rep* **18**: 149-156
2. Fournier MJ, Maxwell ES (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 132-135
3. Maxwell ES, Fournier MJ (1995) *Ann Rev Biochem* **35**: 897-934
4. Hughes JM (1996) *J Mol Biol* **259**: 645-654
5. Potter S, Durovic P, Russell A, Wang X, de Jong-Wong, Dennis PP (1995) *Biochem Cell Biol* **73**: 813-823
6. Potter S, Durovic P, Dennis PP (1995) *Science* **268**: 1056-1060
7. Durovic P, Dennis PP (1994) *Mol Microbiol* **13**: 229-242
8. Balakin AG, Smith L, Fournier MJ (1996) *Cell* **86**: 823-834
9. Ganot P, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1997) *Genes Dev* **11**: 941-956
10. Beltrame M, Tollervey D (1995) *EMBO J* **14**: 4350-4356
11. Venema J, Henry Y, Tollervey D (1995) *EMBO J* **14**: 4883-4892
12. Liang WQ, Fournier MJ (1995) *Genes Dev* **9**: 2433-2443
13. Terns MP, Grimm Ch, Lund E, Dahlberg JE (1995) *EMBO J* **14**: 4860-4871
14. Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie J, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1996) *Cell* **85**: 1077-1088
15. Ni J, Tien AL, Fournier MJ (1997) *Cell* **89**: 565-573
16. Jarmołowski A, Zagórski J, Li HV, Fournier MJ (1990) *EMBO J* **9**: 4503-4509
17. Parker KA, Steitz JA (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 2899-2913
18. Liu J, Maxwell EC (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 6565-6571
19. Tyc K, Steitz JA (1989) *EMBO J* **8**: 3113-3119
20. Huang GM, Jarmołowski A, Struck JC, Fournier MJ (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 4456-4463
21. Tycowski K T, Shu MD, Steitz JA (1993) *Genes Dev* **7**: 1176-1190
22. Samarsky DA, Schneider GS, Fournier MJ (1996) *Nucl Acids Res* **24**: 2059-2066
23. Kiss T, Solymosy F (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 1941-1949
24. Marshallsay C, Kiss T, Filipowicz W (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 3459-3466
25. Marshallsay C, Conelly S, Filipowicz W (1992) *Plant Mol Biol* **19**: 973-983
26. Brule F, Venema J, Segault V, Tollervey D, Brantant C (1996) *RNA* **2**: 183-197
27. Xia L, Liu J, Sage C, Trexler EB, Andrews MT, Maxwell ES (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 4844-4849
28. Renalier MH, Nicoloso M, Qu LH, Bachellerie JP (1996) *FEBS Letters* **379**: 212-216
29. Tycowski K T, Shu MD, Steitz JA (1994) *Science* **263**: 1558-1561
30. Tycowski K T, Shu MD, Steitz JA (1995) *Letters to Nature* **379**: 464-466
31. Leverette RD, Andrews MT, Maxwell ES (1992) *Cell* **71**: 1215-1221
32. Fragapane P, Prislei S, Michienzi A, Caffarelli E, Bozzoni I (1993) *EMBO J* **12**: 2921-2928
33. Kiss T, Filipowicz W (1993) *EMBO J* **12**: 2913-2920
34. Kiss T, Filipowicz W (1995) *Genes Dev* **9**: 1411-1424
35. Cecconi F, Mariottini P, Amaldi F (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 4670-4676
36. Caffarelli E, Fatica A, Prislei S, DeGregorio E, Fragapane P, Bozzoni I (1996) *EMBO J* **15**: 1221-1131
37. Prislei S, Fatica A, DeGregorio E, Arse M, Fragapane P, Cafarelli E, Presutti C, Bozzoni I (1995) *Gene* **163**: 221-226
38. Watkins NJ, Leverette RD, Xia L, Andrews MT, Maxwell ES (1996) *RNA* **2**: 118-133
39. Kiss T, Bortolin M L, Filipowicz W (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 1391-1400
40. Santoro B, DeGregorio E, Caffarelli E, Bozzoni I (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 6975-6982
41. Lubben B, Marshallsay C, Rottmann N, Luhrmann R (1993) *Nucl Acids Res* **21**: 5377-5385
42. Yuan Y, Tan E, Reddy R (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 5266-5274
43. Lygerou Z, Mitchell P, Petfalski E, Seraphin B, Tollervey D (1994) *Genes Dev* **8**: 1423-1433
44. Schmitt ME, Clayton DA (1994) *Genes Dev* **8**: 2617-2628
45. Jansen RP, Tollervey D, Hurt EC (1993) *EMBO J* **12**: 2549-2558
46. Girard JP, Lehtonen H, Caizergues-Ferrer M, Amalric F, Tollervey D, Lapeyre B (1992) *EMBO J* **11**: 673-682
47. Girard JP, Caizergues-Ferrer M, Lapeyre B (1993) *Nucl Acids Res* **21**: 2149-2155
48. Clark MW, Yip MLR, Campbell J, Abelson J (1990) *J Cell Biol* **111**: 1741-1751
49. Tollervey D, Lehtonen H, Carmo-Fonseca M, Hurt EC (1991) *EMBO J* **10**: 573-583
50. Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC (1993) *Cell* **72**: 443-457
51. Elela SA, Igel H, Ares M Jr (1996) *Cell* **85**: 115-124
52. Morrissey JP, Tollervey D (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 2469-2477

53. Nicoloso M, Qu LH, Miochot B, Bachellerie JP (1996) *J Mol Biol* **260**: 178-195
 54. Tycowski KT, Smith CM, Shu MD, Steitz JA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14480-14485
 55. Bachellerie JP, Miochot B, Nicoloso M, Balakin A, Ni J, Fournier MJ (1995) *TIBS* **26**: 1-6
 56. Grosjean H, Szweykowska-Kulińska Z, Moton Y, Fasiolo F, Simos G (1997) *Biochemie* in press
 57. Qu LH, Henry Y, Nicoloso M, Miochot B, Azum

MC, Renalier MH, Caizergues-Ferrer M, Bachellerie JP (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 2669-2676
 58. Smith CM, Steitz JA (1997) *Cell* **89**: 669-672
 59. Ganot P, Bortolin ML, Kiss T (1997) *Cell* **89**: 799-809
 60. Tollervey D, Kiss T (1997) *Cell Biol* **9**: 337-342
 61. Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Gelugne JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1997) *EMBO J* in press

Fitochromopodobne systemy fotorecepcji u sinic¹

Phytochrome-like photoreceptor systems in cyanobacteria

ANDRZEJ TRETYN*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Komplementarna adaptacja chromatyczna *Fryemyella*
- III. Białko o właściwościach fitochromopodobnych *Synechocystis*
- IV. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AP — allofikocyjanina; CCA — komplementarna adaptacja chromatyczna; FR — światło dalekiej czerwieni; ORF — otwarta ramka odczytu; P_r — forma fitochromu absorbująca światło czerwone; P_{fr} — forma fitochromu absorbująca daleką czerwień; PBS — fikobilisomy; PC — fikocyjanina; PE — fikoerytryna; Phy — fitochrom; R — światło czerwone.

I. Wstęp

Fitochrom, fotoreceptor kontrolujący większość indukowanych przez światło procesów u roślin, zbudowany jest z części białkowej (o masie ok. 120-124 kDa, w zależności od gatunku rośliny) oraz grupy chromoforowej posiadającej budowę podobną do fikobilin, barwników występujących u niektórych glonów [1]. Fitochrom występuje w dwóch spektralnie różnych, fotoodwracalnych formach. Pierwsza z nich, oznaczana jako P_r, pochłania światło czerwone (R); natomiast druga, P_{fr}, absorbuje daleką czerwień (FR). Naświetlanie roślin światłem R prowadzi do przekształcenia P_r w P_{fr}, i odwrotnie — FR indukuje fotokonwersję P_{fr} do P_r. Formę P_{fr} uważa się za fizjologicznie aktywną, a jej powstaniu towarzyszy uruchomienie jednego z kilku

Contents:

- I. Introduction
- II. Complementary chromatic adaptation of *Fryemyella*
- III. Phytochrome-like protein of *Synechocystis*
- IV. Conclusions

możliwych łańcuchów transdukcji sygnału, indukujących powstawanie określonych odpowiedzi komórkowych [2-4]. W ostatnim czasie nastąpił znaczny postęp w badaniach nad molekularną budową fitochromu, natomiast ciągle nieznane pozostają docelowe polipeptydy o charakterze regulatorowym, na które może oddziaływać aktywna forma tego barwnika. Rzeczą wartą odnotowania jest fakt, że w ciągu ostatnich miesięcy ukazało się kilka prac dotyczących mechanizmów fotorecepcji, które opublikowane zostały w *Nature*, *Science* i innych renomowanych czasopismach naukowych. Przedstawione w nich dane rzucają nowe światło na problem ewolucji tego fotoreceptora oraz molekularny mechanizm jego działania.

Jedna ze starszych hipotez wyjaśniających mechanizm działania fitochromu zakładała, że barwnik ten może być regulowany przez światło enzymem [2, 5]. Pod koniec lat osiemdziesiątych pojawiły się pierwsze dowody, które zdawały się potwierdzać tę hipotezę, gdyż stwierdzono, że cząsteczki izolowanego i oczyszczonego fitochromu wykazują aktywność kinaz białkowych. Wkrótce okazało się jednak, że analizowane preparaty fitochromowe były zanieczyszczone biał-

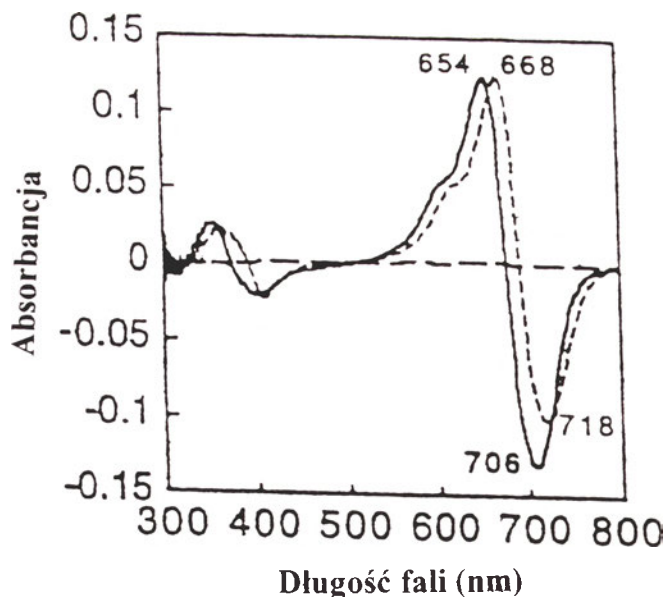
* Prof. dr hab., Uniwersytet M. Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Gagarina 9, 87-100 Toruń 12, oraz Akademia Rolniczo-Techniczna im. M. Oczapowskiego w Olsztynie, Zakład Biologii Komórki, Kortowo, 10-718 Olsztyn

¹ Praca ta powstała podczas pobytu autora w Instytucie Maxa-Plancka w Kolonii, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (Grant 6 PO4C 046 10) oraz Unię Europejską (INCO-Copernicus Programme, Grant IC 15-CT96-0920).

kiem o wspomnianej aktywności [5]. Jednakże w ostatnim czasie opublikowano szereg prac jednoznacznie wskazujących na możliwość funkcjonowania fitochromu jako kontrolowanej przez światło kinazy białkowej [5]. Jednocześnie wykazano, że fitochrom nie jest jedynie barwnikiem charakterystycznym dla organizmów eukariotycznych. Obecność genów kodujących polipeptydy o strukturze podobnej do fitochromu wykryto u dwóch gatunków sinic: *Fryemyella diplosiphon* [6-7] i *Synechocystis sp. cv PCC6803* [9].

II. Komplementarna adaptacja chromatyczna *Fryemyella*

W błonach tylakoidów wielu sinic stwierdzono występowanie tzw. fikobilisonów (PBS, od ang. *phyco-bilisomes*), wielkocząsteczkowych kompleksów, które absorbują energię świetlną w widzialnym zakresie widma pomiędzy 540 a 660 nm [6]. Energia ta przekazywana jest do centrów reakcji fotosyntetycznych rozmieszczonych również w błonie tylakoidów. W skład PBS wchodzi dwa rodzaje białek: fikobili-proteiny i białka zespalające (ang. *linker protein*). U nitkowatej sinicy *Fryemyella diplosiphon* pierwszy typ białek może wiązać trzy różne rodzaje grup chromoforowych: fikocyjaninę (PC), allofikocyjaninę (AP) i fikoerytrynę (PE), które nadają im różną barwę, zmieniającą się w zależności od warunków świetlnych otoczenia. Pozwala to wspomnianej sinicy na optymalne wykorzystanie światła fotosyntetycznie aktywnego. Opisane zjawisko nazywa się komplementarną adaptacją chromatyczną (CCA, ang. *complementary chromatic adaptation*). W przypadku naświetlania kolonii *F. diplosiphon* światłem czerwonym dochodzi do gromadzenia w jej komórkach głównie błękitnych PC. Z drugiej strony, światło zielone stymuluje gromadzenie w PBS czerwonej PE [6]. Analiza szeregu mutantów omawianej sinicy, charakteryzujących się zaburzeniami w CCA pozwoliła scharakteryzować dwa geny, które odpowiadają za regulację tego procesu (Ryc. 1). Pierwszy z nich nazwano *rcaE*, a drugi *rcaC* (od ang. *regulator of chromatic adaptation*). Kodowane przez te geny białka mają podobny ciężar cząsteczkowy (odpowiednio 74 i 73 kD), ale odmienną budowę. Na podstawie przeprowadzonej analizy komputerowej stwierdzono, że N-końcowa domena białka RcaE zawiera ok. 140-aminokwasowy odcinek podobny do homologicznej domeny fitochromowej (wiążącej grupę chromoforową) [6]. Z drugiej strony, C-końcowy fragment RcaE wykazuje uderzające podobieństwo do bakteryjnych kinaz histydynowych [8] oraz ostatnio opisanego receptora etylenu [9], jednego z roślinnych fitohormonów. Drugie z wyżej wspomnianych białek (RcaC) wykazuje duży stopień homologii do innych bakteryjnych białek biorących udział w odbiorze i transdukcji sygnału — do tzw. regulatorów odpowiedzi (ang. *response regulators*), które mają w N-końcowej domenie podlegającą fosforylacji resztę



Ryc. 1. Widmo różnicowe barwników uzyskanych w wyniku przyłączenia do białka CphI różnych grup chromoforowych: PEB (linia przerywana), PCB (linia ciągła) i PΦB (linia kropkowa). Na podstawie [10], zmodyfikowane. Skróty nazw tak jak w tekście.

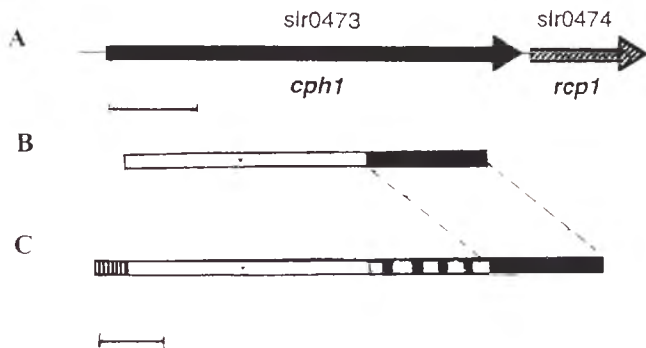
asparaginową. Biorąc pod uwagę budowę obydwu tych typów białek wysunięto wniosek, że w komórkach *F. diplosiphon*, podobnie jak u wielu bakterii (np. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), funkcjonuje charakterystyczny dla nich dwuskładnikowy system sensoryczny (ang. *twocomponent sensory system*). System ten składa się z dwóch białek sprzężonych ze sobą w procesie odbioru i transdukcji sygnałów środowiskowych. Każdy z obu polipeptydów zbudowany jest z dwóch domen pełniących odmienne funkcje. N-końcowa domena pierwszego białka (tzw. *input domain*) uczestniczy w percepcji sygnału, a jej aktywacja prowadzi do autofosforylacji zlokalizowanej w domenie C-końcowej reszty histydynowej [8]. W drugim etapie transdukcji grupa fosforanowa przenoszona jest z reszty histydynowej pierwszego białka na N-końcowy fragment drugiego polipeptydu, który nazywany jest regulatorem odpowiedzi (ang. *response regulator*). W wyniku ufosforylowania znajdującej się tam reszty asparaginowej następują zmiany konformacyjne w C-końcowej domenie tego polipeptydu (określanej jako *output*). W ten sposób uaktywniony regulator odpowiedzi może oddziaływać z innymi białkami lub bezpośrednio łączyć się z odcinkami promotorowymi specyficznych genów [8]. Z przedstawionego opisu wynika, że system związany z komplementarną adaptacją chromatyczną u sinicy *F. diplosiphon* spełnia kryteria klasycznego, bakteryjnego dwuskładnikowego systemu sensorycznego. Przy czym biorące prawdopodobnie udział w absorpcji fal (o określonej długości) białko RcaE byłoby pierwszym, a regulujące odpowiedź komórkową białko RcaC drugim składnikiem tego systemu. Ostatnie badania prowadzone przez tą samą grupę badaczy [7] wskazują, że system ten wydaje się być nieco bardziej skomplikowany.

Wykazano, że u omawianej sinicy funkcjonuje jeszcze jedno białko (RcaF), które może pełnić podobne funkcje jak RcaC.

III. Białko o właściwościach fitochromopodobnych *Synechocystis*

W 1996 r. ukazała się praca japońskich badaczy donosząca o zsekwencjonowaniu genomu sinicy *Synechocystis sp. cv. PCC6803* [10]. Całkowitą długość genomu określono na 3.573.470 par zasad (bp). Na podstawie analizy porównawczej dostępnych baz danych stwierdzono, że w genomie tym występować może 3.168 potencjalnych genów kodujących różne białka, z czego 145 (4,6%) posiada kolejność nukleotydów identyczną z już znanymi sekwencjami [10]. Wśród nich 128 koduje różne polipeptydy biorące udział w procesie fotosyntezy. Kolejnych 1.257 (39,6%) i 340 (10,8%) sekwencji nukleotydowych wykazuje podobieństwo do już znanych bądź hipotetycznych genów. Aż 45% (1.426) potencjalnych genów koduje polipeptydy nie wykazujące żadnego podobieństwa do białek, których sekwencje znajdują się w obecnie dostępnych bazach danych [9]. Jedną z największych niespodzianek było stwierdzenie, że jedna z otwartych ramek odczytu (ORF, od ang. *Open Reading Frame*), oznaczona jako slr0473, koduje białko zbudowane z 748 reszt aminokwasowych. Polipeptyd ten wykazuje duże podobieństwo do N-końcowej (zawierającej grupę chromoforową) domeny fitochromu roślin wyższych. W związku z tym białko powstające na przypuszczalnym genie nazwano Cph1 (od ang. *cyanobacterial phytochrome*) [11]. Dokładna analiza DNA zawierającego locus slr0473 (*cph1*) wykazała, że tuż za nim znajduje się następny, potencjalny gen (ORF slr0474), który oznaczono *rcp1*, a powstające na jego bazie białko Rcp1 (od ang. *Response regulator for cph1*). Nazwa ta wzięła się stąd, iż slr0474 koduje polipeptyd posiadający sekwencje aminokwasowe charakterystyczne dla bakteryjnych kinaz histydynowych dwuskładnikowych systemów transdukcji sygnału, a zwłaszcza białko CheY, które uczestniczy w procesach chemorepcji u bakterii *Escherichia coli* [8]. Rycina 1 przedstawia budowę operonu kodującego Cph1 i Rcp1.

Białko Cph1 ma wiele właściwości charakterystycznych dla fitochromu. Między innymi jest zdolne do autokatalitycznego przyłączania różnych grup chromoforowych. Jednakże, tylko wbudowanie fitochromobiliny (PΦB) lub fikocjanobiliny (PCB), prowadziło do powstania barwnika o właściwościach spektralnych charakterystycznych dla fitochromu (Ryc. 2). Porównując pierwszorzędową budowę Cph1 i cząsteczki fitochromu (Ryc. 1B-C) widać, że pierwsze z białek jest znacznie mniejsze. Jak już wspomniano powyżej, Cph1 składa się z 748, natomiast Phy (w przypadku owsa) ze 1118-u reszt aminokwasowych [11]. Cph1 nie zawiera od 60-cio do 100-aminokwasowego odcinka występu-



Ryc. 2. Schemat budowy operonu zawierającego geny *cph1* i *rcp1* (A) oraz cząsteczki białka Cph1 (B). Dla porównania przedstawiono schemat liniowej budowy cząsteczki fitochromu roślin wyższych (C). Jak można zauważyć (porównując B i C) C- i N-terminalne odcinki obu polipeptydów wykazują istotne podobieństwo. Z tym, że cząsteczka fitochromu na N-końcu i w środkowej części posiada dodatkowe sekwencje aminokwasowe, które nie występują w białku Cph1. Gwiazdka przedstawia miejsce przyłączenia grupy chromoforowej. Na podstawie [10], zmodyfikowane. Skala: A — 500 par zasad, B i C — 100 reszt aminokwasowych.

jącego w N-końcowej domenie fitochromu i około połowy domeny C-końcowej (Ryc. 1). Brak pierwszego ze wspomnianych odcinków polipeptydowych może rzutować na nieco odmienne, w porównaniu do fitochromu, widmo absorpcyjne Cph1-PΦB. Również proteolityczne usunięcie podobnego fragmentu Phy prowadzi do przesunięcia widma absorpcyjnego jego formy P_r w kierunku światła niebieskiego. Inną z charakterystycznych cech fitochromu jest jego tzw. ciemniowa rewersja — niezależne od światła przekształcanie P_r do P_f . Okazało się, że Cph1 z przyłączaną PΦB lub PCB może również podlegać temu procesowi [11].

Forma P_r Cph1-PΦB (pochłaniająca światło czerwone) wykazuje jeszcze jedną niezwykle istotną właściwość — ma zdolność do zależnej od ATP autofosforylacji [11]. Potencjalnym, jeżeli nie jedynym białkiem, na które może być przenoszona grupa fosforanowa jest powstający na tym samym operonie Rcp1. Wspomniana grupa przenoszona jest z histydyny (His_{538}) pierwszego białka na resztę asparagynową (Asp_{68}) drugiego [11]. Uzyskane sztucznie mutanty, zawierające w ww. pozycjach inne reszty aminokwasowe nie były zdolne do przeprowadzania auto- i transfosforylacji [11]. Wyniki te w sposób jednoznaczny sugerują, że Cph1 i Rcp1 pełnią funkcje przypisywane białkom dwuskładnikowych systemów transdukcji sygnału [8, 12]. Pierwsze z nich funkcjonować może indukowana przez światło kinaza histydynowa, drugie natomiast może działać jako regulator odpowiedzi [11].

Wydaje się, że donorem grupy fosforanowej jest wyłącznie forma P_r^1 Cph1. Tezę tę potwierdzono eksperymentalnie. Wpierw doprowadzono do autofosforylacji P_r (i powstania ufosforylowanej formy P_r^1), a następnie przy udziale światła czerwonego przekształcono ją w P_r^1 , którą inkubowano z białkiem Rcp1 [11]. W tych warunkach eksperymentalnych nie do-

szło jednak do wymiany reszty fosforanowej pomiędzy oboma białkami. Na tej podstawie przypuszcza się, że forma P_{fr} , Cph1 nie ma zdolności do autofosforylacji, jak również nie jest ona zdolna do przenoszenia reszty fosforanowej na białko Rcp1 [11].

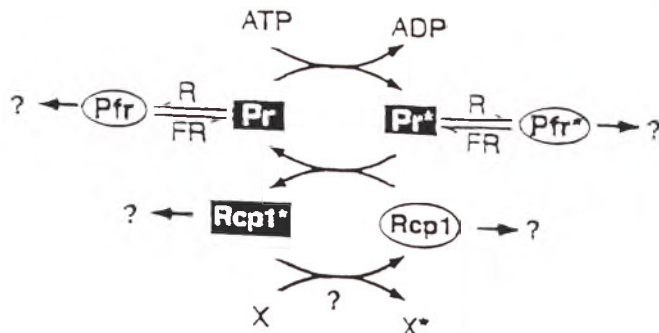
Na podstawie opisanych wyników Yeh i wsp. [11] przedstawili hipotezę tłumaczącą mechanizm działania pseudofitochromowego systemu u *Synechocystis sp.* (Ryc. 3). Zakłada ona, że białko Cph1 może występować w czterech (podczas gdy fitochromu tylko w dwóch) formach: P_r , P_r^1 oraz P_{fr} i P_{fr}^1 . Ich wzajemny stosunek w komórce regulowany jest przez światło i stan ufosforylowania Rcp1. Przez analogie do dotąd poznanych dwuskładnikowych systemów transdukcyjnych przypuszcza się, że fosforylacja Rcp1 może prowadzić do aktywacji tego białka, bądź oprócz niego istnieją jeszcze dalsze akceptory (na schemacie oznaczone jako X), na które przenoszona jest grupa fosforanowa (Ryc. 3).

Przedstawiony mechanizm działania systemu fotoreceptorowego u *Synechocystis sp.* odbiega od mechanizmu działania fitochromu, który zakłada, że jego jedyną aktywną formą jest P_{fr} [1-4]. Wydaje się, że w przypadku systemu funkcjonującego u wspomnianej sinicy światło raczej reguluje liczebność oraz stan ufosforylowania P_r , Cph1. Jednakże nie można wykluczyć, że zarówno P_r , jak i P_{fr}^1 kontrolują odmienne, dotąd nieznanne procesy fizjologiczne, poprzez ich zrównicowany wpływ na białka docelowe inne niż Rcp1. Fakt istnienia fotokonwersji P_r do P_{fr} oraz ciemniowej rewersji P_{fr} do P_r , Cph1 pozwala przypuszczać, że również organizmy prokariotyczne, dzięki posiadanym barwnikom mają zdolność do określania kierunku działania światła, jak i percepcji fotoperiodycznej. By w pełni zrozumieć mechanizm fotorecepcji u *Synechocystis* należy zidentyfikować endogenne składniki chromoforowe Cph1.

IV. Podsumowanie

Wyniki opublikowanych ostatnio, a omówionych powyżej prac pozwalają wyciągnąć wiele wniosków dotyczących ewolucji fitochromu oraz mechanizmów percepcji światła przez roślinne organizmy pro- i eukariotyczne. Biorąc jako przykład obie sinice, tj. *Fryemyella diplosiphon* [6-7] i *Synechocystis sp.* [9] zauważyć można, że pierwsza z nich, pomimo obecności białka przypominającego fitochrom, nie posiada zdolności wiązania grup chromoforowych (gdyż brak w nim odpowiedniej reszty cysteinowej). Fotoreceptor drugiej z sinic przypomina już swymi właściwościami fitochrom. Widać stąd, że nawet w tej samej, choć niejednorodnej grupie organizmów nazywanych sinicami ewolucja fitochromu mogła zatrzymać się na różnych etapach tego procesu.

Wykrycie u sinic regulowanych przez światło kinaz histydynowych ma bardziej ogólne znaczenie. Jak stwierdzono w ostatnich latach, podobnego typu sys-



Ryc. 3. Mechanizm działania fitochromopodobnego barwnika w komórkach sinicy *Synechocystis sp.* Dalszy opis w tekście. Na podstawie [10], zmodyfikowane.

temy transdukcji sygnałów występują również u roślin wyższych. Biorą one udział w mechanizmie działania dwóch fitohormonów — etylenu [9] i cytokinin [13]. Może to oznaczać, że ewolucja systemów transdukcji sygnałów u zwierząt oraz roślin miała odmienny charakter. Te pierwsze wykształciły jedno- i trójskładnikowe systemy transdukcyjne [12], podczas gdy u roślin zachowany został pierwotny, dwuskładnikowy system odbioru i wzmacniania sygnałów, który ciągle z dużym powodzeniem funkcjonuje u bakterii [8, 12].

Opisane powyżej odkrycia można nazwać kamieniem milowym w badaniach nad ewolucją, budową i mechanizmem działania fitochromów u roślin. Pierwszym tego dowodem było ukazanie się krótkiej notatki w jednym z zeszłorocznych numerów *Nature* [14]. Jej autorzy za pomocą odpowiedniego wektora wprowadzili do komórek *Escherichia coli* odcinek DNA *Synechocystis* kodujący gen *cph1*. W wyniku tego zabiegu w komórkach bakterii doszło do akumulacji olbrzymich ilości (50% wszystkich białek) polipeptydu Cph1, który miał zdolność do autokatalitycznego przyłączania egzogennie podawanych grup chromoforowych [14]. Już w najbliższym czasie otrzymane zostaną kryształy białka Cph1, które poddane będą analizie rentgenowskiej. Na podstawie tych badań określona zostanie bardzo dokładna budowa przestrzenna wspomnianego polipeptydu. Wyniki tych badań pozwolą na wyciąganie wniosków odnośnie molekularnej budowy fitochromu.

Artykuł otrzymano 16 października 1997 r.
Zaakceptowano do druku 12 lutego 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Tretyn A, Wiśniewska J (1996) *Post Biochem* **42**: 57-64
2. Tretyn A, Wiśniewska J, Jaworski K (1997) *Post Biol Kom* **25**: 225-250
3. Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D (1995) *Science* **268**: 675-680
4. Furuya M, Sächfer E (1996) *TIPS*, **1**: 301-307
5. Quail PH (1997) *Bio-Essays* **19**: 571-579
6. Kehoe DM, Grossman AR (1996) *Science* **273**: 1049-1411
7. Kehoe DM, Grossman AR (1997) *J Bacteriol* **179**: 3914-3921
8. Parkinson JS (1993) *Cell* **73**: 857-871
9. Chang C (1996) *TIBS* **25**: 129-134

10. Kaneko T, Sato S, Kotani H et al. (1996) *DNA Res* 3: 109-136
11. Yeh K - C, Wu S - H, Murphy JT, Lagarias JC (1997) *Science* 277: 1505-1508
12. Palme K, Redhead C, Kristoffeersen P (1997) W:

- Conn PM, Melmed S (red) *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*. Humana Press Inc, New York, str 153-164
13. Kakimoto T (1996) *Science* 274: 982-985
14. Hughens J, Lamparter T, Mittmann F et al. (1997) *Nature* (Lond) 386: 663

Szczepionki DNA

DNA VACCINES

EDYTA GENDASZEWSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Przewaga immunizacji DNA nad klasycznymi szczepionkami
- III. Wektory i ich konstrukcja
- IV. Sposoby dostarczania DNA
- V. Praktyczne zastosowanie szczepionek genetycznych
 - V-1. Ochrona przed infekcjami wirusowymi i bakteryjnymi
 - V-2. Szczepionki DNA a choroby o podłożu autoagresyjnym
 - V-3. Immunostymulacja w leczeniu chorób nowotworowych
- VI. Bezpieczeństwo szczepionek DNA — potencjalne efekty uboczne

Contents:

- I. Introduction
- II. Advantages of DNA immunization over conventional vaccines
- III. Vectors and their construction
- IV. Modes of DNA delivery
- V. Practical applications of DNA vaccines
 - V-1. Protection against viral and bacterial infections
 - V-2. DNA vaccines and autoimmune diseases
 - V-3. Immunostimulation in cancer treatment
- VI. Safety of DNA vaccines — potential side-effects

Wykaz stosowanych skrótów: AAV — wirus adenosatelitarny; MHC — główny układ zgodności tkankowej; HCMV — ludzki cytomegalowirus; IgG — przeciwciało klasy IgG; IgA — przeciwciało klasy IgA; IFN — interferon; HSV-1 — wirus opryszczki zwykłej typu 1; HIV — ludzki wirus niedoboru odporności immunologicznej; HBsAg — antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B; AIDS — zespół nabytego niedoboru odporności; IL — interleukina; GM-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów; TNF — czynnik martwicy nowotworów; MDR — geny oporności wielolekowej; gp — glikoproteina; EAE — doświadczalne, autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego; SM — stwardnienie rozsiane; MBP — podstawowe białko mieliny; TGF — transformujący czynnik wzrostu; RAC — Doradczy Komitet ds. Rekombinowanego DNA; NIH — Narodowe Instytuty Zdrowia (USA).

I. Wstęp

W ostatnich latach terapia genowa stała się przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków naukowo-medycznych. Jej rozwój jest bezpośrednio związany

z osiągnięciami inżynierii genetycznej, a w szczególności z ciągłym doskonaleniem technologii wprowadzania genów do komórek eukariotycznych. Terapia genowa oparta jest na dostarczaniu DNA do komórek somatycznych i jego ekspresji tak, aby wprowadzona informacja genetyczna spowodowała usunięcie niepożądanego cechy lub wywołanie prawidłowej. Obszerne omówienie metod transferu genów do komórek zostało przedstawione w numerze 1/96 *Postępów Biochemii* [1].

Transfer genów może mieć zastosowanie nie tylko w przywracaniu prawidłowych funkcji komórek, ale także w nadawaniu im zupełnie nowych właściwości (np. odporności na infekcje wirusowe lub bakteryjne). Wynika to z faktu, że produkt wprowadzonego genu (o ile jest to „obcy” gen) jest rozpoznawany przez komórki układu immunologicznego. W związku z tym naturalną konsekwencją rozwoju terapii genowej stała się próba modulowania odpowiedzi immunologicznej poprzez dostarczenie DNA kodującego białka antygenów wirusowych lub bakteryjnych w celu ochrony organizmu przez późniejszą infekcją. Otrzymane w ten sposób szczepionki, oparte na immunizacji plazmidowym DNA (tzw. szczepionki DNA lub genetyczne)

* Mgr, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

Tabela 1.

Porównanie właściwości różnych klas szczepionek

	Szczepionki zawierające atenuowane bakterie lub wirusy	Szczepionki zawierające inaktywowane bakterie lub wirusy oraz szczepionki podjednostkowe	Szczepionki DNA
Indukcja odpowiedzi immunologicznej związanej z prezentacją antygeny w kontekście MHC klasy I (aktywacja cytotoksycznych limfocytów T)	Tak	Nie	Tak
Indukcja odpowiedzi immunologicznej związanej z prezentacją antygeny w kontekście MHC klasy II (aktywacja pomocniczych limfocytów T)	Tak	Tak	Tak
Indukcja odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego	Tak	Tak	Tak
Bezpieczeństwo	Nie	Prawdopodobnie	Prawdopodobnie
Ryzyko powrotu mikroorganizmu lub wirusa do stanu patogenności	Tak	Nie	Nie
Przydatność w uodpornianiu niemowląt	Nie	Nie	Tak
Łatwość przygotowania	Nie	Nie	Tak
Termostabilność	Nie	Nie	Tak
Koszt	Wysoki	Wysoki	Stosunkowo niski

mogą być obiecującym narzędziem w wywoływaniu odporności przeciwwakażnej z pominięciem wielu wad preparatów stosowanych obecnie. Efektywna odpowiedź immunologiczna jest w tym przypadku uzależniona od ekspresji wprowadzonego genu i prezentacji powstałego produktu białkowego komórkom układu immunologicznego.

II. Przewaga immunizacji DNA nad klasycznymi szczepionkami

Porównanie szczepionek DNA z konwencjonalnymi preparatami przedstawiono w tabeli 1. Należy zwrócić uwagę, że konwencjonalne szczepionki, zawierające atenuowane wirusy, takie jak np. szczepionka Jennera przeciwko czarnej ospie czy Pasteura przeciwko wściekliznie reprezentują podejście wykorzystujące bezpośrednie dostarczenie i ekspresję genu *in vivo*, czyli immunizację DNA w jej najbardziej prymitywnej formie. Skuteczność tych szczepionek jest dowodem, że podanie materiału genetycznego może chronić przed późniejszą infekcją. Metoda transferu genów daje więc potencjalne możliwości stymulacji układu immunologicznego do rozpoznawania i eliminowania komórek zainfekowanych patogenami, a także komórek zmienionych nowotworowo.

Bezpośrednie szczepienie plazmidowym DNA z odpowiednimi eukariotycznymi sygnałami transkrypcji i translacji powinno powodować *in vivo* syntezę białek o konformacji i modyfikacjach potranslacyjnych identycznych w stosunku do tych, które znajdują się

w białkach wywołujących infekcję. Synteza endogenego białka naśladuje infekcję wirusową, pozwalając na prezentowanie obcego antygeny limfocytom T przez cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy I (ang. *Major Histocompatibility Complex*). Komórki wykazujące ekspresję antygeny białkowego są niszczone w wyniku rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej i efektu cytotoksycznego, uwalniając w ten sposób antygen, który może być następnie pobrany przez lokalne komórki prezentujące antygen i związany z cząsteczkami MHC klasy II. Dzięki tej metodzie w komórkach gospodarza zostaje zsyntetyzowany antygen białkowy o odpowiedniej strukturze trzeciorzędowej niezbędnej dla indukcji konformacyjnie specyficznych przeciwciał, jak również rozwoju odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego.

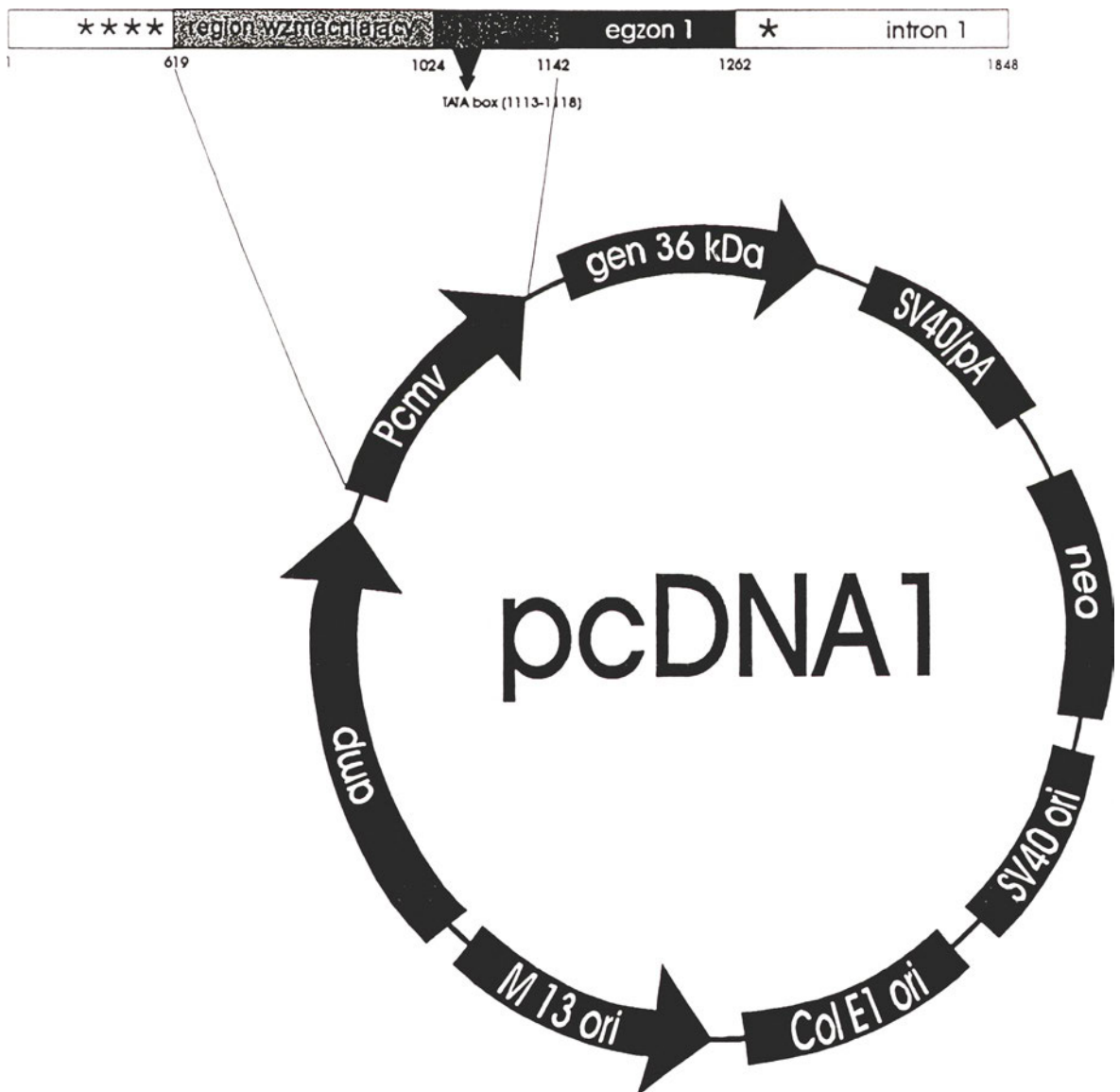
Szczepionki DNA mogą być użyteczne w immunizacji niemowląt posiadających jeszcze przeciwciała matki. Odporność noworodków charakteryzuje się dwiema cechami: obniżonym poziomem odpowiedzi immunologicznej oraz zwiększoną zdolnością wytworzenia stanu tolerancji. Ogranicza to skuteczność szczepionek konwencjonalnych m.in. w wyniku wiązania przez immunoglobuliny matki dostarczanych w szczepionce drobnoustrojów i zahamowania ich namnażania. Przeciwciała nie potrafią jednak rozpoznać plazmidowego DNA i dlatego synteza kodowanych przez plazmid białek oraz indukcja odpowiedzi immunologicznej mogą odbywać się bez przeszkód. Koncepcję tę potwierdzono doświadczalnie — porównano efekt

immunizacji dorosłych myszy oraz mysich noworodków za pomocą plazmidowego DNA [2]. Zastosowano w tym przypadku DNA kodujący nukleoproteinę wirusa grypy. Wynik tego doświadczenia wskazuje, że zarówno u noworodków, jak i u osobników dorosłych podanie szczepionki DNA indukuje odpowiedź immunologiczną na podobnym poziomie. Strategia immunizacji genetycznej może więc być potencjalnie wykorzystana u noworodków i dzieci w przypadku małej skuteczności preparatów konwencjonalnych.

Szczepionki DNA nie zawierają patogenów, adjuwantów i wektorów replikacyjnych; powinny więc być bezpieczniejsze niż preparaty zawierające atenuowane szczepy. DNA jest stosunkowo tani, termostabilny oraz z założenia podatny na manipulacje genetyczne (rekombinacja), co stwarza możliwość dostarczania w jednej szczepionce różnych sekwencji kodujących immunogenne białka.

III. Wektory i ich konstrukcja

W większości prac nad szczepionkami DNA wykorzystuje się plazmidy zawierające terapeutyczny gen będący pod kontrolą promotora z ludzkiego cytomegalowirusa (ang. *human cytomegalovirus* — *HCMV*) (Ryc. 1), gdyż funkcjonuje on w wielu typach komórek ssaków i indukuje ekspresję genów na wysokim poziomie [3-5]. Badania z transgenicznymi myszami wykazały, że poziomy ekspresji genów pozostających pod kontrolą promotora HCMY różnią się w poszczególnych tkankach do 100 000 razy [6]. Jednocześnie nadal trwają prace, mające na celu zwiększenie poziomu ekspresji wprowadzanych genów poprzez zmiany w regionie 5' końca tego promotora (Ryc. 1) [7]. Istnieją również doniesienia o próbach wykorzystania do konstrukcji szczepionek DNA promotorów z tzw.



Ryc. 1. Konstrukcja szczepionki genetycznej chroniącej organizm przed gruźlicą. Fragment DNA, pochodzący z prątków *Mycobacterium leprae*, kodujący antygen o m. cz. 36 kDa został wklonowany do plazmidu pcDNA (firmy Invitrogen) i poddany kontroli promotora HCMV [4]; Pcmv — region zawierający promotor HCMV; SV 40 pA — sygnał poliadenylacji wirusa SV 40; neo — gen oporności na neomycynę; SV 40 ori — miejsce startu replikacji (orogin) wirusa SV 40; Col E1 ori — miejsce startu replikacji plazmidu Col E1; M 13 ori — miejsce startu replikacji faga M13; amp — gen oporności na ampicylinę.

U góry przedstawiono strukturę 5'-końca genu HCMV (na podstawie danych z banku genów: nr dostępu X03932); * — miejsca wiążące czynnik jądrowy NF-1; P — promotor polimerazy II

genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*) [4, 8].

Charakter kodowanych antygenów może być różny. W większości badań wykorzystuje się białka o pełnej długości, dobrze poznane z immunologicznego punktu widzenia. Zmiany kodowanych sekwencji przez dodanie lub delecję różnych sygnałów dają, przynajmniej na razie, znikome efekty [3]. Wykazano jednak, że do wywołania odporności przeciwwakacyjnej nie zawsze konieczna jest znajomość pełnej sekwencji DNA genu patogenu. Nawet ekspresja fragmentu genu jednego z antygenów *Mycobacterium pulmonis* może chronić przed późniejszą infekcją [9].

IV. Sposoby dostarczania DNA

Odpowiedź immunologiczna może być indukowana przez wstrzyknięcie DNA rozpuszczonego w roztworze soli fizjologicznej [4, 10, 11], DNA skomplexowanego z lipidami [3] lub poprzez dostarczenie materiału genetycznego w postaci mikroskopijnych kulek złota opłaszczonych DNA [12-14], a także w postaci aerozolu bądź kropli do nosa [15, 16].

Najszerzej stosowaną metodą jest obecnie bezpośrednia iniekcja DNA rozpuszczonego w roztworze soli (tzw. „nagiego” DNA) do mięśni szkieletowych. Wynikiem tego jest ekspresja genu w mięśniu w pobliżu miejsca iniekcji. Stwierdzono, że wstrzyknięcie DNA do mięśnia, który był uprzednio uszkodzony w wyniku potraktowania toksynami, zwiększa około 10-krotnie liczbę komórek mięśniowych wykazujących ekspresję genu i wzmacnia odpowiedź immunologiczną [15]. Nie jest jasne, czy wzmożenie odpowiedzi immunologicznej jest związane ze wzrostem ekspresji antygeny w regenerujących się komórkach mięśniowych, czy też następuje w wyniku chemotaksji komórek prezentujących antygen do miejsca uszkodzenia tkanki.

Większość badań dotyczących szczepionek DNA obejmuje iniekcje domięśniowe i śródskórne. W świetle ostatnich badań, najbardziej korzystną drogą podania szczepionek genetycznych wydaje się być skóra. Jest ona bowiem łatwo dostępna i ma rozwinięty system immunologiczny. Śródskórne wstrzyknięcie DNA może indukować antygenowo specyficzną odpowiedź i długotrwałą ochronę. Poza tym śródskórna immunizacja wymaga dla wywołania takiego samego efektu znacznie mniejszej ilości DNA (1/250-1/500) niż w przypadku iniekcji domięśniowej [15]. Co więcej, szybki obrót metaboliczny komórek naskórka może prowadzić do usunięcia nadmiernej ilości DNA, łagodząc w ten sposób ewentualne niepożądane skutki ekspresji genu.

W porównaniu z tzw. „nagim” DNA, kompleksy DNA-lipid wykazują obniżoną ekspresję przy podaniu domięśniowym, znacznie jednak zwiększoną po podaniu dożylnym. Poza tym, dożylne dostarczenie DNA prowadzi do ekspresji genu w wielu narządach

(zwłaszcza w śledzionie) [17].

Ostatnio coraz częściej zwraca się uwagę na możliwość podawania DNA do dróg oddechowych w postaci aerozolu. Dotyczy to nie tylko szczepionek genetycznych [15, 16], ale również np. oligonukleotydów antysensowych wobec mRNA [18]. Dominującą rolę odgrywa w tym przypadku układ immunologiczny związany z błonami śluzowymi, składający się z rozproszonych w błonach śluzowych i podśluzowych skupisk grudek limfatycznych. Przykładem skutecznej szczepionki DNA dostarczanej tą drogą jest szczepionka przeciwko grypie, zawierająca gen kodujący hemaglutyninę wirusa [19]. Powodowała ona przeżycie 67-95% immunizowanych w ten sposób myszy, którym podano śmiertelną dawkę wirusa. Jednakże najlepsze wyniki (95% przeżywalności) uzyskano w tym doświadczeniu po podaniu do komórek naskórka kulek złota opłaszczonych DNA (tzw. metoda „gene gun”). Należy zaznaczyć, że podawanie DNA do dróg oddechowych ma największe szanse powodzenia w przypadku chorób atakujących właśnie drogi oddechowe. Donosowe podanie myszom DNA, kodującego glikoproteinę B wirusa opryszczki *Herpes simplex* typu 1 (HSV-1), indukowało powstanie charakterystycznych dla śluzówki przeciwciał klasy IgA, których miano zwiększało się, gdy szczepionkę DNA łączono z równoczesnym podawaniem toksyny cholery [20]. Dla porównania, domięśniowa iniekcja takiego samego DNA stymulowała powstawanie przeciwciał klasy IgG obecnych głównie w surowicy krwi. Należy podkreślić, iż w przypadku opryszczki, która nie jest chorobą dróg oddechowych, donosowe podanie kwasu nukleinowego okazało się mniej skuteczne niż iniekcja domięśniowa.

Równolegle prowadzone są wciąż badania mające na celu zwiększenie skuteczności działania DNA jako szczepionki. Stwierdzono np., że efektywniejsze jest równoczesne dostarczenie genów kodujących IL-2 i antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) [21]. Również domięśniowe wstrzyknięcie plazmidowego DNA w transfekowanych komórkach dendrytycznych prowadzi do wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej organizmu, a tym samym odporności na infekcję [22, 23]. Dla porównania, efektu takiego nie obserwowano w przypadku podania transfekowanych makrofagów [23], komórki dendrytyczne są bowiem podstawowymi komórkami prezentującymi antygen.

V. Praktyczne zastosowanie szczepionek genetycznych

Domięśniowa iniekcja DNA powodując ekspresję obcych genów indukuje specyficzną antygenowo odpowiedź immunologiczną. Podanie kontrolnego plazmidu („pustego”) nie kodującego białka wirusowego lub bakteryjnego nie wywołuje żadnego efektu. Udowodniono, że w przypadku wielu chorób immunizacja

DNA jest wysoce skuteczna i szczepionki DNA indukują odpowiedź immunologiczną chroniąc przed późniejszą infekcją m.in. w przypadku zapalenia wątroby typu B i C, AIDS, opryszczki, grypy, wścieklizny oraz brodawczaka u różnych gryzoni, bydła i naczelnych, a także w przypadku chorób pasożytniczych np. *Plasmodium*, wywołującymi malarię czy *Leishmania* [15].

V-1. Ochrona przed infekcjami wirusowymi i bakteryjnymi

Znaczna część aktualnie prowadzonych badań dotyczy szczepionek DNA chroniących przed gruźlicą. Stosowana obecnie konwencjonalna szczepionka BCG zawiera żywy, atenuowany szczep prątka bydłęcego *Mycobacterium bovis*. W wielu przypadkach nie jest ona w pełni skuteczna i bezpieczna. O potrzebie skonstruowania nowego typu szczepionki przeciwko gruźlicy może świadczyć fakt, że wciąż z powodu tej choroby umiera rocznie około 3 milionów ludzi. Problem ten staje się coraz groźniejszy, zwłaszcza w obliczu wzrostu zakażeń chorobą AIDS oraz stale rosnącej liczby izolowanych od pacjentów prątków *Mycobacterium tuberculosis* wykazujących nadekspresję genów oporności wielolekowej MDR (ang. *Multiple Drug Resistance*). Ponieważ patogen ten posiada około 4000 genów, kodujących białka o potencjalnej funkcji antygenów, do tej pory nie stwierdzono, które z nich mogą wywoływać najsilniejszą i najskuteczniejszą odpowiedź immunologiczną organizmu. Prace dotyczą więc szczepionek genetycznych, kodujących różne białka mykobakteryjne, m.in. białko szoku termicznego o m.c. 65 kDa, antygen o m.c. 36 kDa (Ryc. 1), czy białko sekrecyjne wchodzące w skład kompleksu o m.c. 85 kDa. W badaniach tych myszom podawano domięśniowo lub śródskórnie plazmidy kodujące antygeny mykobakteryjne. Skuteczność szczepień sprawdzano m.in. pobierając surowicę i badając, czy pojawiły się w niej odpowiednie przeciwciała (test ELISA) lub pobierając od immunizowanych myszy komórki śledzione i kontrolując poziom produkowanych przez nie cytokin, tj. IFN- γ , IL-2, GM-CSF, TNF- α (zwiększony poziom) oraz IL-4 i IL-10. Wreszcie ostatecznym testem było podanie szczepionym zwierzętom prątków *Mycobacterium tuberculosis* w celu wywołania ewentualnego stanu chorobowego. Kontrolą było podanie „pustego” plazmidu. We wszystkich przypadkach obserwowano ochronę porównywalną z otrzymaną przy użyciu konwencjonalnej szczepionki BCG, nawet w przypadku wstrzyknięcia DNA kodującego tylko jeden antygen mykobakteryjny [4, 11].

Inną, bardzo ważną zaletą szczepionek DNA jest możliwość wywoływania odporności przeciwko różnym szczepom tego samego wirusa lub bakterii. Niska skuteczność niektórych szczepionek konwencjonalnych wynika z faktu, że indukują one prawie wyłącznie odpowiedź immunologiczną typu humoralnego skie-

rowaną przeciwko antygenom powierzchniowym patogenu. W przypadku wielu wirusów, np. grypy lub HIV, głównym problemem jest ogromna różnorodność i zmienność białek otoczki, zarówno w obrębie różnych szczepów, jak i między poszczególnymi cząstkami wirusowymi. W celu określenia, czy indukowana odpowiedź immunologiczna może wywołać odporność przeciwko różnym szczepom wirusowym, wykorzystano model wirusa grypy typu A [10]. Stosowana obecnie szczepionka przeciwko grypie, zawierająca inaktywowany chemicznie wirus, jest skuteczna dopóki nie ulegną zmianie determinanty antygenowe białek powierzchniowych. W przeciwieństwie do tych białek, białka wewnętrzne są bardziej konserwatywne, rzadko ulegają mutacjom i dlatego mogłyby wywoływać odporność przeciwko różnym szczepom wirusowym. Do opracowania szczepionki wykorzystano DNA kodujący wewnętrzną nukleoproteinę wirusa grypy. Myszom BALB/c podano domięśniowo plazmidowy DNA kodujący białko pochodzące z tzw. szczepu Puerto Rico VI. Iniekcja ta spowodowała powstanie odporności zarówno typu humoralnego jak i komórkowego i co więcej, chroniła przed infekcją szczepem wirusa grypy A/HK/68, który zaobserwowano dopiero 34 lata później. W eksperymencie tym około 90% myszy, u których zastosowano szczepionkę, przeżyło podanie śmiertelnej dawki wirusa grypy powodującej zgon w ciągu 2 tygodni, podczas gdy w grupie kontrolnej taki eksperyment przeżyło tylko 20% myszy. Szczepienie plazmidowym DNA, kodującym antygenowe białko wirusowe, może więc być skutecznym sposobem wywoływania odporności przeciwko różnym szczepom wirusowym. Na przykładzie wirusa grypy ustalono także, iż szczepionki DNA są równie skuteczne, jak preparaty zawierające żywy, atenuowany wirus [24] oraz stwierdzono, że istnieje bezpośrednia korelacja między ilością podanego kwasu nukleinowego, a mianem powstających przeciwciał [25]. Co więcej, w przypadku myszy, do syntezy skutecznej terapeutycznie liczby przeciwciał wystarczy podanie od 100 ng do 1 μ g DNA, kodującego hemaglutyninę lub nukleoproteinę wirusa grypy, natomiast w przypadku naczelnych — około 10 μ g [25]. Wyniki te wskazują, że do wywołania odporności przeciwko grypie wystarczą małe dawki DNA podawane domięśniowo.

Odkąd przekonano się, że szczepionki DNA mogą chronić przed infekcją wirusową, wiele grup badawczych podjęło prace nad szczepionkami genetycznymi, które mogłyby zapobiegać chorobie AIDS. Przeprowadzono szereg doświadczeń z wykorzystaniem DNA kodującego różne fragmenty białka wirusa HIV np. białka otoczki (gp120 i jej prekursor gp160) oraz białka regulatorowe (Rev, Nef). Stosując różne modele zwierzęce, m.in. myszy, króliki i naczelne (makaki, szympansy) wykazano, że szczepionki genetyczne indukują powstanie zarówno swoistych cytotoksycznych limfocytów T, jak i ochronnej odpowiedzi immunologicznej, zależnej od neutralizujących przeciw-

ciał klasy IgG [26-32]. Sukcesem, jak na razie, okazała się szczepionka zawierająca DNA kodujący białka Env, Rev i Gag/Pol wirusa HIV-1. U zaszczepionych szympanów rozwinęła się odpowiedź immunologiczna typu humoralnego i komórkowego, która powstrzymała inwazję wszczepionego zwierzętom wirusa HIV. Po 48 tygodniach od zainfekowania, małpy nie wykazały objawów zakażenia [32]. Dla porównania, w grupie kontrolnej, po upływie tego samego czasu, stężenie cząstek wirusa było bardzo duże. Wyniki te stwarzają szansę opracowania tego typu szczepionki dla ludzi.

V-2. Szczepionki DNA a choroby o podłożu autoagresji

Szczepionki DNA mogą być skuteczne nie tylko w przypadku infekcji wirusowej czy bakteryjnej. Coraz częściej podkreśla się możliwość ich zastosowania w przypadku chorób autoimmunologicznych lub nowotworowych.

Przykładem stanu chorobowego o podłożu autoimmunologicznym jest stwardnienie rozsiane (SM — *sclerosis multiplex*). Zaobserwowano w tej chorobie pojawianie cząsteczek MHC klasy II na astrocytach i oligodendrocytach, które to zjawisko nie ma miejsca w zdrowym organizmie. Doświadczalnym modelem stwardnienia rozsianego, stosowanym u myszy i szczurów jest syndrom EAE (ang. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*). W patogenezie tej choroby pojawiają się autoreaktywne limfocyty T, których receptory rozpoznają białka mielinowych osłonek neuronów. Podczas rozwoju EAE u myszy w pierwszym etapie autoreaktywne limfocyty T przełamują barierę krew — mózg i rozpoznają autoantygeny na komórkach nerwowych. Po takiej stymulacji limfocyty T zaczynają produkować czynniki zapalne t.j. IFN- γ i TNF- α . Cytokiny te aktywują kolejne komórki do ekspresji cząsteczek MHC, co z kolei nasila stan zapalny. Ostatecznie w wyniku działania cytotoksycznych cytokin, autoprzeciwciał oraz komórek takich jak limfocyty T i B, makrofagi i granulocyty następuje uszkodzenie osłonki mielinowej neuronów. W patogenezie EAE uczestniczy kilka białek o właściwościach autoantygenów rozpoznawanych przez receptory autoreaktywnych limfocytów T. Są to składniki mieliny takie jak MBP (ang. *Myelin Basic Protein*), PLP (ang. *Proteolipid Protein*), MAG (ang. *Myelin-Associated Glycoprotein*) i MOG (ang. *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*) [33, 34]. Większość badań nad odpowiedzią autoreaktywnych limfocytów T w SM dotyczy białka MBP, gdyż zostało ono najlepiej poznane.

Obecnie terapia stwardnienia rozsianego polega przede wszystkim na ogólnym osłabieniu odpowiedzi immunologicznej, mającym na celu zatrzymanie postępującego niszczenia tkanki, poprzez podawanie m.in. transformującego czynnika wzrostu TGF- β , IL-10 czy też rozpuszczalnych receptorów dla takich

cytokin jak IL-1, IFN- γ lub TNF- α . Druga metoda leczenia opiera się na próbie specyficznego „wyłączenia” autoreaktywnych limfocytów T (np. poprzez immunizację inaktywowanymi limfocytami T lub ich receptorami [33, 35-37]. W oparciu o to drugie podejście skonstruowano szczepionkę DNA, chroniącą przed rozwojem EAE u myszy [38]. Szczepionka z plazmidowego DNA kodującego gen V β 8.2, którego produktem jest peptyd Ac1-20, stanowiący fragment receptora autoreaktywnych limfocytów T reagujących z białkiem MBP, chroniła myszy przed wywoływaniem eksperymentalnie EAE. Efekt ten uzyskiwano najprawdopodobniej poprzez obniżenie poziomu cytokin takich jak IL-2 i IFN- γ biorących udział w rozwoju stanu chorobowego oraz poprzez wzrost poziomu supresyjnej IL-4. Tak istotnej zmiany profilu produkowanych przez limfocyty T cytokin, będącej podstawą ochrony przed EAE, nie obserwowano w przypadku immunizacji genetycznej skierowanej przeciwko bakteriom lub wirusom.

V-3. Immunostymulacja w leczeniu chorób nowotworowych

Terapia genowa budzi największe nadzieje w związku z leczeniem chorób nowotworowych. Szczepionki genetyczne dają bowiem możliwość wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw nowotworowi.

Istnieje kilka strategii wykorzystujących szczepionki DNA nie tylko do ochrony przed rozwojem stanu chorobowego, ale również do ewentualnego leczenia nowotworów. Jedną z nich polega na lokalnym dostarczaniu, wraz z komórkami nowotworowymi, różnych cytokin i ich rozpuszczalnych receptorów, np. wprowadzanie genu IL-6 oraz genu rozpuszczalnej formy jej receptora (sIL-6R) do komórek czerniaka złośliwego [39]. Przykładem innej strategii jest podawanie komórkom nowotworowym genu kodującego silnie immunizujący antygen (np. allogeniczne główne antygeny zgodności tkankowej [3]), na skutek czego antygeny nowotworowe, które wcześniej nie były rozpoznawane przez układ odpornościowy, teraz mogą być prezentowane w kontekście głównych antygenów zgodności tkankowej. Tego rodzaju podejście stało się podstawą do opracowania protokołów klinicznych, które zostały zatwierdzone przez Doradczy Komitet ds. Rekombinowanego DNA Amerykańskich Instytutów Zdrowia [ang. *Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) of the National Institutes of Health (NIH)*]. Pierwsza próba kliniczna polegała w tym przypadku na dostarczaniu genu MHC klasy I pacjentowi z dającym przerzuty czerniakiem [3]. Jeszcze innym przykładem zastosowania szczepionek genetycznych jest wykorzystanie DNA kodującego białkowe produkty onkogenów w celu wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej przeciw tym białkom, np. terapia raka piersi poprzez domięśniową lub śródskórną inie-

kcję DNA onkogenu *neu*, którego produktem jest białko p185. Powstałe w wyniku podania takiego DNA przeciwciała klasy IgG, skierowane przeciwko białku p185, powodowały m.in. zahamowanie *in vitro* wzrostu nowotworowej linii komórkowej SKBR3 (rak gruczołowy płuca) [40].

Mimo że szczepionki DNA, w porównaniu z konwencjonalnymi metodami leczenia nowotworów (leczenie chirurgiczne, chemioterapia, radioterapia), zapewne jeszcze długo nie będą terapią wiodącą, mogą przyczynić się do ograniczenia objawów ubocznych obserwowanych w terapii prowadzonej metodami standardowymi.

VI. Bezpieczeństwo szczepionek DNA — potencjalne efekty uboczne

Przegląd zagrożeń terapii genowej i metod minimalizowania wynikających z nich efektów ubocznych został przedstawiony w numerze 1/96 *Postępów Biochemii* [41]. Niektóre z nich, przynajmniej teoretycznie, mogą towarzyszyć immunizacji za pomocą szczepionek genetycznych. Podawanie do organizmu DNA, którego białkowy produkt powinien wywołać odpowiedź immunologiczną może również wywoływać szereg efektów ubocznych. Mianowicie:

— po pierwsze, nie jest jeszcze poznany efekt długoterminowej ekspresji antygeny *in vivo*. W pewnych warunkach może on być pozytywny, tzn. długo utrzymująca się ekspresja DNA będzie prowadziła do silnej, długotrwałej odpowiedzi immunologicznej bez potrzeby stosowania kilkakrotnych iniekcji. Z drugiej strony stałe utrzymywanie się w organizmie obcego antygeny może być niebezpieczne i prowadzić do powstania stanów zapalnych, zaburzeń autoimmunologicznych czy chorób wywołanych zbyt wysokim poziomem kompleksów immunologicznych. Istnieją jednak dane wskazujące, że immunizacja DNA nie indukuje powstawania autoprzeciwciał skierowanych przeciwko podawanemu DNA lub komórkom mięśniowym, w których ma miejsce synteza obcego antygeny [42]. Żadna z badanych dotychczas szczepionek nie stymulowała powstawania takich przeciwciał, ani nie powodowała uszkodzenia tkanki mięśniowej. Immunizacja kwasem nukleinowym nie nasilała również istniejącego już stanu chorobowego o podłożu autoagresji. Szczepionki genetyczne nie powinny więc stymulować rozwoju lub nasilenia chorób autoimmunologicznych, a co więcej, mogą być pomocne w ich leczeniu [37].

— po drugie, pojawia się coraz więcej doniesień [43], że bakteryjny DNA może powodować silną odpowiedź immunologiczną. Z drugiej strony powstanie takiej odpowiedzi immunologicznej nie wymagałoby dodatkowego podawania adjuwantów, stosowanych w konwencjonalnych szczepionkach.

— po trzecie, istnieje, przynajmniej teoretyczna, możliwość wbudowania plazmidowego DNA do genomu komórki gospodarza. Przypadkowe miejsce takiej in-

Tabela 2.

Prowadzone próby kliniczne dotyczące szczepionek DNA.

Ośrodek	Choroba
John Hopkins University	Grypa
Naval Medical Research Institute	Malaria
University of Alabama	Rak okrężnicy
University of Cincinnati	Zapalenie wątroby typu B
University of Pennsylvania	AIDS
University of Washington	Opryszczka
University of Wisconsin	Zapalenie wątroby typu B

tegracji stwarza niebezpieczeństwo transformacji komórki w wyniku mutagenyzy insercyjnej. Jakkolwiek trudno wykluczyć taką możliwość, sądzi się, że w przypadku plazmidowego DNA ryzyko jest mniejsze niż ryzyko spontanicznej mutacji [3]. Wyniki badań prowadzonych w laboratorium firmy Merck, mających na celu określenie ryzyka potencjalnej integracji DNA dostarczonego w szczepionce do genomu gospodarza nie wykazały takiego zjawiska [44].

Mimo tych wątpliwości, do tej pory nie udokumentowano żadnego negatywnego zjawiska związanego z immunizacją zwierząt za pomocą DNA. Opracowano kilka protokołów klinicznych, mających na celu zbadanie bezpieczeństwa i skuteczności immunizacji plazmidowym DNA. Obecnie weszły one w I fazę prób klinicznych i dotyczą chorób o tak odmiennej etiologii, jak AIDS, malaria czy białaczka (Tab. 2) [3, 45, 46].

Od momentu ukazania się pierwszej pracy, wykazującej możliwość stymulowania układu immunologicznego przez szczepionki DNA [10], pojawiło się bardzo wiele informacji na ten temat. Najnowsze z nich można uzyskać pod internetowym adresem: <http://www.genweb.com/Dnavax/dnavax.html>.

Artykuł otrzymano 28 lipca 1997 r.

Zaakceptowano do druku 2 marca 1998 r.

Piśmiennictwo

- Huminiński Ł (1995) *Post Biochem* **41**: 230-236
- Bot A, Bot S, Garcia-Sastre A, Bona C (1996) *Viral Immunol* **9**: 207-210
- Nabel GJ, Felgner PL (1993) *Trends Biotech* **11**: 211-215
- Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB (1996) *Nature Med* **2**: 888-892
- Barry MA, Barry ME, Johnston SA (1994) *Biotechniques* **16**: 616-620
- Furth PA, Hennighausen L, Baker C, Beatty B, Woychick R (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 6205-6208
- Chapman BS (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 3979-3986
- Gautier C, Mehtali Lathe R (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 83-89
- Barry MA, Lai WC, Johnston SA (1995) *Nature (Lond)* **377**: 632-635
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Hawe LA, Lean-

- der KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DL, Liu MA (1993) *Science* **259**: 1745-1749
11. Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, Orme IM, Baldwin S, D'Souza C, Drowart A, Lozes E, Vandenbussche P, Van Vooren JP, Liu MA, Ulmer J (1996) *Nature Med* **2**: 893-898
 12. Tang DC, DeVit M, Johnston SA (1992) *Nature (Lond)* **356**: 152-154
 13. Gregoriadis G, Saffie R, de Souza JB (1997) *FEBS Lett* **402**: 107-110
 14. Johnston SA (1990) *Nature (Lond)* **346**: 776-777
 15. Hassett DE, Whitton JL (1996) *Trends Microbiol* **4**: 307-312
 16. Cohen J (1993) *Science* **259**: 1691-1692
 17. Zhu N, Liggitt D, Liu Y, Debs R (1993) *Science* **261**: 209-211
 18. Nyce JW, Metzger WJ (1997) *Nature (Lond)* **385**: 721-725
 19. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes IR, Santoro JC, Robinson HL (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11478-11482
 20. Kuklin N, Daheshia M, Kareem K, Manickan E, Rouse BT (1997) *J Virol* **71**: 3138-3145
 21. Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH (1997) *J Virol* **71**: 169-178
 22. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD (1996) *Nature Med* **2**: 1122-1128
 23. Manickan E, Kanangat S, Rouse RJ, Yu Z, Rouse BT (1997) *J Leukoc Biol* **61**: 125-132
 24. Rota PA, De BK, Shaw MW, Black RA, Gamble WC, Kendal AP (1990) *Virus Res* **16**: 83-93
 25. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA (1994) *Vaccine* **12**: 1541-1544
 26. Shiver JW, Perry HC, Davies ME, Freed DC, Liu MA (1995) *Ann N Y Acad Sci* **772**: 198-208
 27. Okuda K, Bukawa H, Hamajima K, Kawamoto S, Sekigawa K, Yamada Y, Tanaka S, Ishii N, Aoki I, Nakamura M (1995) *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**: 933-943
 28. Asakura Y, Hamajima K, Fukushima J, Mohri H, Okubo T, Okuda K (1996) *Am J Hematol* **53**: 116-117
 29. Shiver JW, Davies ME, Perry HC, Freed DC, Liu MA (1996) *J Pharm Sci* **85**: 1317-1324
 30. Boyer JD, Wang B, Ugen KE, Agadjanyan M, Javadian A, Frost P, Dang K, Carrano RA, Ciccarelli R, Coney L, Williams WV, Weiner DB (1996) *J Med Primatol* **25**: 242-250
 31. Tsuji T, Fukushima J, Hamajima K, Ishii N, Aoki I, Bukawa H, Ishigatsubo Y, Tani K, Okubo T, Dorf ME, Okuda K (1997) *Immunology* **90**: 1-6
 32. Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bogarazzi ML, Chattergoon M, Frost P, Javadian A, Williams WV, Rafaei Y, Ciccarelli RB, McCallus D, Coney L, Weiner DB (1997) *Nature Med* **3**: 526-532
 33. Hohlfeld R, Meinl E, Weber F, Zipp F, Schmidt S, Sotgiu S, Goebels N, Voltz R, Spuler S, Iglesias A, Wekerle H (1995) *Neurology* **45**: 33-38
 34. Smith R (1992) *J Neurochem* **59**: 1589-1608
 35. Oksenberg JR, Panzara MA, Begovich AB, Mitchell D, Erlich HA, Murray RS, Shimonkevitz R, Sherritt M, Rothbard J, Bernard CC, Steinman L (1993) *Nature (Lond)* **362**: 68-70
 36. Vandenbark AA, Hashim G, Offner H (1989) *Nature (Lond)* **341**: 541-544
 37. Zhang J, Medaer R, Stinissen P, Hafler D, Raus J (1993) *Science* **261**: 1451-1454
 38. Waisman A, Ruiz PJ, Hirschberg DL, Gelman A, Oksenberg JR, Brocke S, Mor F, Cohen IR, Steinman L (1996) *Nature Med* **2**: 899-905
 39. Mackiewicz A (1996) XXXII Zjazd PTBioch 17-20 września, Kraków
 40. Concetti A, Amici A, Petrelli C, Tibaldi A, Provinciali M, Venanzi FM (1996) *Cancer Immunol Immunother* **43**: 307-315
 41. Huminiecki Ł (1996) *Post Biochem* **42**: 14-21
 42. Mor G, Singla M, Steinberg AD, Hoffman SL, Okuda K, Klinman DM (1997) *Hum Gene Ther* **8**: 293-300
 43. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) *Nature (Lond)* **374**: 546-549
 44. Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ (1995) *Ann N Y Acad Sci* **772**: 30-39
 45. Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA (1996) *Curr Opin Biotechnol* **7**: 653-658
 46. Taubes G (1997) *Science* **278**: 1711-1714

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

Obecny adres:

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

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

Strategia antysensownych oligonukleotydów — nowe trendy

Antisense strategy — new trends

MARIA KOZIOŁKIEWICZ*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Właściwości antysensownych oligonukleotydów
- III. Zasady doboru sekwencji antysensownych oligonukleotydów
- IV. Oporność antysensownych oligonukleotydów na działanie nukleaz
- V. Transport oligonukleotydów przez błony
- VI. Oddziaływania tiofosforanowych oligonukleotydów z białkami
- VII. Badania terapeutycznych właściwości antysensownych oligonukleotydów
- VIII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: PS-oligonukleotydy — tiofosforanowe analogi oligodeoksyrybonukleotydów; RNaza H — rybonukleaza H; PAI-1 — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu pierwszego; t-PA — tkankowy aktywator plazminogenu; u-PA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego; T_m — temperatura mięknienia dwuniciowych fragmentów kwasów nukleinowych; DOPE — dioleilofosfatydyloetanoloamina (kationowy lipid); DOTMA — chlorek dioleiloksypropylotrimetyloamonowy (kationowy lipid); $d[(C_{PS})_{2,7}C]$ — tiofosforanowy analog oligonukleotydu dC_{28} ; aFGF — kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów; bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; PDGF — czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego; IC_{50} — stężenie wywołujące 50%-ową inhibicję; SELEX — metoda selekcji ligandów; HUVEC — ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej; EA.hy 926 — nowotworowo zmienione komórki śródbłónka; RT PCR — reakcja powielania DNA poprzedzona odwrotną transkrypcją; LD_{50} — dawka powodująca śmierć 50% zwierząt doświadczalnych; CMV — cytomegalowirus; ICAM — glikoproteina obecna na powierzchni komórki, należy do tzw. adresyn komórkowych, jest odpowiedzialna za adhezję komórek (ang. *intercellular adhesion molecule*); PKC — kinaza białkowa C.

I. Wstęp

Badania nad zastosowaniem syntetycznych oligodeoksyrybonukleotydów w terapii chorób nowotworowych oraz chorób wywoływanych przez wirusy prowadzone są już od kilkunastu lat. Oligonukleotydy komplementarne (lub mówiąc inaczej: antysensowne) wobec fragmentów DNA lub RNA mogą z nimi

Contents:

- I. Introduction
- II. Properties of antisense oligonucleotides
- III. Evaluation of sequences of antisense oligonucleotides
- IV. Resistance of antisense oligonucleotides against nucleolytic enzymes
- V. Transport of oligonucleotides across the plasma membranes
- VI. Interaction of phosphorothioate oligonucleotides with proteins
- VII. Studies on therapeutic properties of antisense oligonucleotides
- VIII. Conclusions

hybrydyzować, hamując ekspresję genów odpowiednich białek (tzw. *strategia antysensownych oligonukleotydów*). Właściwości antysensownych oligonukleotydów oraz ich udział w regulacji przemian komórkowych są tematem licznych prac przeglądowych [1-6]. W ciągu ostatnich 4-5 lat ukazało się także wiele oryginalnych prac potwierdzających skuteczność działania tych związków w badaniach *in vivo* [7-16]. Wciąż jednak pewne problemy dotyczące mechanizmu działania antysensownych oligonukleotydów oraz możliwości ich zastosowania w terapii wymagają rozwiązania. Niektóre z nich zostaną przedstawione w niniejszej pracy.

II. Właściwości antysensownych oligonukleotydów

Zahamowanie biosyntezy białek przez krótkie jednoniciowe fragmenty DNA jest możliwe, jeśli owe fragmenty posiadają zdolność wnikania do komórek, są odporne na działanie enzymów nukleolitycznych oraz mogą hybrydyzować z komplementarnymi fragmentami DNA lub mRNA.

Antysensowne oligonukleotydy są odporne na działanie nukleaz tylko wówczas, gdy zawierają elementy struktury zmodyfikowane w stosunku do naturalnego DNA. Najbardziej bezpieczną wydaje się modyfikacja otoczenia atomu fosforu w pozycjach niemostrkowych, czyli zamiana jednego z dwóch atomów tlenu internukleotydowej grupy fosforanowej na atom siarki lub grupę metylową [17-20]. Tak zmodyfikowane oligonukleotydy są określane, odpowiednio, jako tiofosforanowe bądź metanofosfonianowe analogi DNA

* Dr, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej, PAN ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

(Ryc. 1). Ponieważ nagromadzone dotychczas informacje o działaniu antysensownych oligonukleotydów dotyczą przede wszystkim analogów tiofosforanowych, dalsze rozważania zawarte w niniejszym artykule będą poświęcone właśnie tej klasie analogów.

Oligo(nukleozydotiofosforany) (PS-oligonukleotydy) zawierające w każdym wiązaniu internukleotydowym zamiast atomu tlenu atom siarki stanowią tzw. antysensowne oligonukleotydy pierwszej generacji. Podobnie jak naturalne oligonukleotydy są one polianionami. Obecność tiofosforanowych funkcji internukleotydowych znacznie zwiększa ich oporność na działanie nukleaz [21-22], a tylko nieznacznie obniża zdolność hybrydyzacji z komplementarnymi fragmentami RNA [23]. Mechanizm, dzięki któremu tiofosforanowe oligonukleotydy wnikają do komórek, nie został dotychczas dokładnie wyjaśniony [24, 25]. Niewykluczone, że ich transport do cytoplazmy ułatwiają niektóre białka błonowe. Wiele danych świadczy o tym, że oligonukleotydy wnikają do komórek na drodze endocytozy [1]. Tiofosforanowe oligonukleotydy, podobnie jak naturalne fragmenty DNA, mogą hybrydyzować z komplementarnymi fragmentami RNA i tworzyć dwuniciowe struktury mRNA-DNA. Kompleksy takie są rozpoznawane jako substraty przez RNazę H, która degradując związany fragment mRNA uniemożliwia jego udział w syntezie odpowiednich białek [23]. Ponadto proces translacji może być zahamowany ze względu na zawadę przestrzenną, której przyczyną są PS-oligonukleotydy związane z mRNA [1].

Oligonukleotydy tiofosforanowe mogą również hybrydyzować z komplementarnymi fragmentami DNA. Odpowiednio zaprojektowana sekwencja oligonukleotydu pozwala na jego trwałe wiązanie się z dwuniciowym DNA i tworzenie trójniciowych form DNA (tzw. trypleksów) (ang. *triplex DNA*). Teoretycznie, takie struktury mogą powodować zahamowanie ekspresji genów już na poziomie DNA. Obszerne informacje na ten temat można znaleźć w pracach Sz k l a r c z y k a i K w i n k o w s k i e g o [4, 26].

Pierwsza chemiczna synteza tiofosforanowych analogów została przeprowadzona w 1984 r. [17], zaś pierwsze próby ich wykorzystania w strategii antysensownych oligonukleotydów datują się od roku 1987 [27]. Niebagatelne znaczenie ma fakt, iż opracowano bardzo efektywne metody chemicznej syntezy PS-oligonukleotydów. Umożliwiają one otrzymywanie tych związków nawet w ilościach kilogramowych. O postępie prac nad zastosowaniem tiofosforanowych oligonukleotydów w terapii może świadczyć fakt, iż kilka z nich jest obecnie przedmiotem badań klinicznych [3].

III. Zasady doboru sekwencji antysensownych oligonukleotydów

Warunkiem skuteczności antysensownych oligonukleotydów jest ich zdolność do specyficznego rozpo-

nawania komplementarnej sekwencji mRNA i hybrydyzacji. Podstawowe znaczenie przy wyborze potencjalnie terapeutycznego PS-oligonukleotydu ma zatem zdefiniowanie jego długości i sekwencji zasad. Optymalna długość oligonukleotydu antysensownego to 15-25 nukleotydów [28]. Z kolei jego sekwencja zależy od sekwencji zasad docelowego fragmentu mRNA. Często jest to fragment mRNA, który zawiera kodon AUG i od którego rozpoczyna się proces translacji, choć czasami może to być inny fragment mRNA, nawet w jego części nie kodującej sekwencji białka. Ważne jest jednak, aby był to fragment o strukturze jednoniciowej [29]. Dostępne obecnie bazy danych pozwalają przewidzieć na podstawie sekwencji zasad strukturę II-rzędową odpowiedniego fragmentu mRNA. Zazwyczaj wybór optymalnej sekwencji antysensownego oligonukleotydu wymaga doświadczalnego sprawdzenia kilku lub kilkunastu różnych oligonukleotydów komplementarnych wobec określonych fragmentów tego samego mRNA.

Takie postępowanie zastosowano poszukując oligonukleotydu skutecznie hamującego biosyntezę inhibitora aktywatorów plazminogenu typu I (PAI-1) [30-32]. Spośród trzech oligonukleotydów komplementarnych wobec różnych fragmentów mRNA dla PAI-1, wybrano do dalszych badań dwa 24-mery (oligonukleotydy 1 i 4 w tabeli 1). Ponieważ 16-mer otrzymany po „skróceniu” jednego z tych 24-merów (oznaczony jako 6) okazał się 5-krotnie bardziej aktywny w hamowaniu biosyntezy białka PAI-1 niż jego 24-nukleotydowy prekursor, został on docelowo wybrany do badań *in vitro* oraz *in vivo* (oligonukleotyd ten będzie określany w dalszej części tej pracy jako PS 16H). Badania te miały na celu opracowanie metody hamowania aktywności PAI-1, co w konsekwencji może doprowadzić do nowego leku o działaniu trombolitycznym [30-32].

Inhibitor aktywatorów plazminogenu jest glikoproteiną o masie 50 kDa syntetyzowaną głównie przez komórki śródbłonna oraz komórki wątroby i komórki naczyń mięśni gładkich. Neutralizuje on czynne cząsteczki tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i aktywatora typu urokinazowego (u-PA) [33]. Normalnie PAI-1 występuje we krwi w bardzo małych ilościach, ale pod wpływem wielu substancji następuje znaczne podwyższenie ekspresji tego białka, co przyczynia się do powstania stanów patologicznych. Wzrost poziomu PAI-1 obserwowany jest w przypadku zapalenia mięśnia sercowego, zakrzepic czy miażdżycy [33]. Oczekiwano, że zahamowanie ekspresji białka PAI-1 przez antysensowne oligonukleotydy ułatwi efektywną aktywację plazminogenu, co z kolei doprowadzi do podwyższonego poziomu plazminy, która degradowuje niepożądane zakrzepy. Prace nad oligonukleotydem PS 16H o aktywności anty-PAI-1 będą niejednokrotnie cytowane w niniejszym artykule dla zilustrowania pewnych problemów związanych ze strategią antysensownych oligonukleotydów.

Tabela 1.

Hamowanie biosyntezy białka PAI-1 przez tiofosforanowe analogi oligonukleotydów.

Oligonukleotyd	Sekwencja 5' → 3'	lokalizacja kodonów w mRNA PAI-1	IC ₅₀ [μM]
1	GAG GCG GGG CAG CCT GGT CAT GTT	265—272 ^a	4.0
2	GAG GCG GGG CAG CCT GGT CAT	265—271 ^a	21.6
3	GCG GGG CAG CCT GGT CAT GTT	266—272 ^a	16.6
4	GAG GGC TGG AGA CAT CTG CAT CCT	-24—-17 ^b	5.6
5	G AGA CAT CTG CAT CCT	-21—-17 ^b	2.0
6	GAG GGC TGG AGA CAT C	-24—-14 ^b	0.9
7	GC TGG AGA CAT CTG CA	-22—-15 ^b	4.0

^a lokalizacja w sekwencji kodującej białko PAI-1^b lokalizacja w sekwencji peptydu sygnałowego

Komórki śródbłonka żyły pępowinowej hodowano w obecności każdego z oligonukleotydów 1-7. Wartość współczynnika IC₅₀ podana dla każdego z tych oligomerów oznacza wartość stężenia oligonukleotydu powodującego 50%-owe zahamowanie biosyntezy białka PAI-1 przez komórki.

Długość oraz sekwencja antysensownego oligonukleotydu decydują o termodynamicznej stabilności dwuniciowej struktury DNA-mRNA powstającej przy udziale oligonukleotydu. Stabilność tę określa się na podstawie pomiaru temperatury mięknienia (*T_m*) hybrydy utworzonej przez PS-oligonukleotyd oraz komplementarny wobec niego, syntetyczny oligorybonukleotyd. Pomiar temperatury mięknienia są istotnym elementem badań nad właściwościami każdej nowej klasy antysensownych oligonukleotydów, ponieważ niektóre chemiczne modyfikacje oligonukleotydów znacznie zmieniają stabilność odpowiednich hybryd DNA-RNA. W przypadku PS-oligonukleotydów stabilność owych hybryd jest nieco mniejsza od stabilności odpowiednich struktur dwuniciowych utworzonych z udziałem naturalnych oligonukleotydów o takiej samej sekwencji zasad, jednak w warunkach fizjologicznych (temp. 37°C) tworzą one nadal formy dwuniciowe (Tab. 2).

IV. Oporność antysensownych oligonukleotydów na działanie nukleaz

Warunkiem skutecznego działania antysensownych oligonukleotydów jest także, jak już wspomniano, ich oporność na działanie nukleaz. Choć, generalnie tiofosforanowe analogi są znacznie bardziej stabilne niż ich niemodyfikowane prekursorzy, to jednak nukleazy obecne w osoczu oraz w ekstraktach komórkowych są

zdolne do powolnej hydrolizy tiofosforanowych wiązań internukleotydowych. Z tego powodu okres półtrwania tiofosforanów w warunkach *in vivo* wynosi zwykle 12-24 godziny [27]. Co więcej, wiadomo, że niektóre nukleazy wykazują *stereospecyficzność* wobec tiofosforanowych analogów oligonukleotydów, tzn. degradują tylko jeden typ wiązań internukleotydowych — o konfiguracji R_p albo o konfiguracji S_p [34-37].

Różnice w położeniu atomu siarki w tiofosforanowych wiązaniach internukleotydowych o konfiguracji R_p albo S_p przedstawia rycina 1. Stosowane powszechnie chemiczne metody syntezy PS-oligonukleotydów dają jako końcowy produkt mieszaninę diastereoizomerów różniących się położeniem atomu siarki w każdym tiofosforanowym wiązaniu internukleotydowym. Najkrótszy fragment DNA — dinukleotyd jest mieszaniną tylko dwóch izomerów, tzn. izomeru R_p i izomeru S_p, w cząsteczkach których występują wiązania internukleotydowe o konfiguracji, odpowiednio R_p oraz S_p. W przypadku dłuższych oligonukleotydów zawierających *n* wiązań internukleotydowych, produkt syntezy jest mieszaniną 2ⁿ diastereoizomerów. Zjawisko to jest określane jako polidiastereoizomerizm.

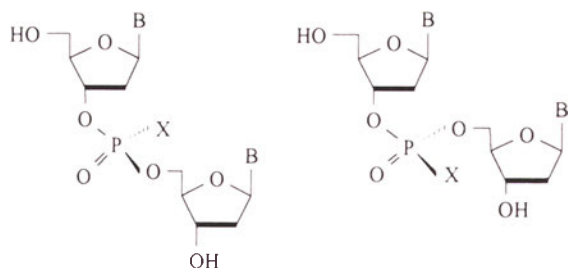
Wspomniana wyżej stereospecyficzność niektórych nukleaz może mieć poważne konsekwencje ponieważ izomery z przewagą wiązań o konfiguracji R_p albo S_p mogą wykazywać w warunkach fizjologicznych różnicowaną trwałość. Tiofosforanowe wiązania internukleotydowe o konfiguracji R_p są degradowane przez

Tabela 2.

Wartości temperatur mięknienia [°C] hybryd DNA-RNA utworzonych z udziałem odpowiednich oligonukleotydów.

	d[AAGGGCTTCTTCCTTA]	d[AACGTTGAGGGGCAT]	d[AGATGTTTGAGCTCT]
PO-oligonukleotyd	62.0	69.0	59.0
PS-oligonukleotyd (mieszanina izomerów)	52.5	51.0	47.0
izomer R _p	58.0	55.0	52.0
izomer S _p	49.0	48.0	44.0

Pomiar temperatury mięknienia przeprowadzono w buforze zawierającym 10 mM kakodylan sodu (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 70 mM NaCl w przedziale temperatur 5-75°C stosując 2 μM stężenie badanego oligonukleotydu oraz komplementarnego wobec niego fragmentu RNA.



$X=S^-$: tiofosforan o konfiguracji	S_p	R_p
$X=CH_3$: metanofosfonian o konfiguracji	R_p	S_p

Ryc. 1. Położenie atomu siarki lub grupy metylowej w tiofosforanowych albo metanofosfonianowych wiązaniach internukleotydowych o konfiguracji, odpowiednio, S_p i R_p na atomie fosforu. Przypisanie konfiguracji absolutnych na atomie fosforu dokonano według reguł Cahn, Ingolda i Preloga w oparciu o zasadę starszeństwa podstawników [89]. **B** oznacza jedną z czterech zasad Ade, Gua, Cyt lub Thy.

tw. R_p -specyficzne nukleazy, takie jak fosfodiesteraza z jadu węża oraz endonukleaza z *Serratia marcescens* [34-36]. Z kolei S_p -specyficzne nukleazy (nukleaza S1 oraz nukleaza P1) degradowały wiązania o konfiguracji S_p [37].

Polidiastereoizomerizm PS-oligonukleotydów oraz ewentualne skutki stereoselektywnego działania nukleaz są na ogół niedoceniane. Ostatnie badania wykazały, że antysensowne PS-oligonukleotydy podlegają w osoczu jak i wewnątrz komórek działaniu R_p -specyficznych 3'-egzonukleaz [21-22]. Zarówno 3'-egzonukleaza z osocza, jak i egzonukleaza komórkowa degradowały tylko tiofosforanowe wiązania internukleotydowe o konfiguracji R_p . Dlatego, pomimo zmodyfikowania wiązań internukleotydowych przez wprowadzenie do każdego z nich atomu siarki, wiązania o konfiguracji R_p położone na 3'-końcu oligonukleotydu podlegają stosunkowo szybkiej hydrolizie. Skutecznym zabezpieczeniem tiofosforanowego oligonukleotydu przed działaniem tych enzymów jest wprowadzenie na jego 3'-koniec 1-2 wiązań o konfiguracji S_p [21].

Możliwość syntezy oligonukleotydów tiofosforanowych o z góry zaplanowanej konfiguracji absolutnej na atomie fosforu każdego wiązania internukleotydowego oferuje tzw. metoda oksatiofosforanowa [36-38]. Stosując tę metodę (zwaną metodą Steca) zsyntetyzowano tzw. stereoregularne izomery oligonukleotydu PS 16H, tzn. izomer R_p zawierający wyłącznie wiązania o konfiguracji R_p , izomer S_p zawierający wyłącznie wiązania o konfiguracji S_p oraz izomer $R_p/2S_p$ zawierający obok 13 tiofosforanowych wiązań o konfiguracji R_p dwa wiązania o konfiguracji S_p położone na 3'-końcu oligonukleotydu.

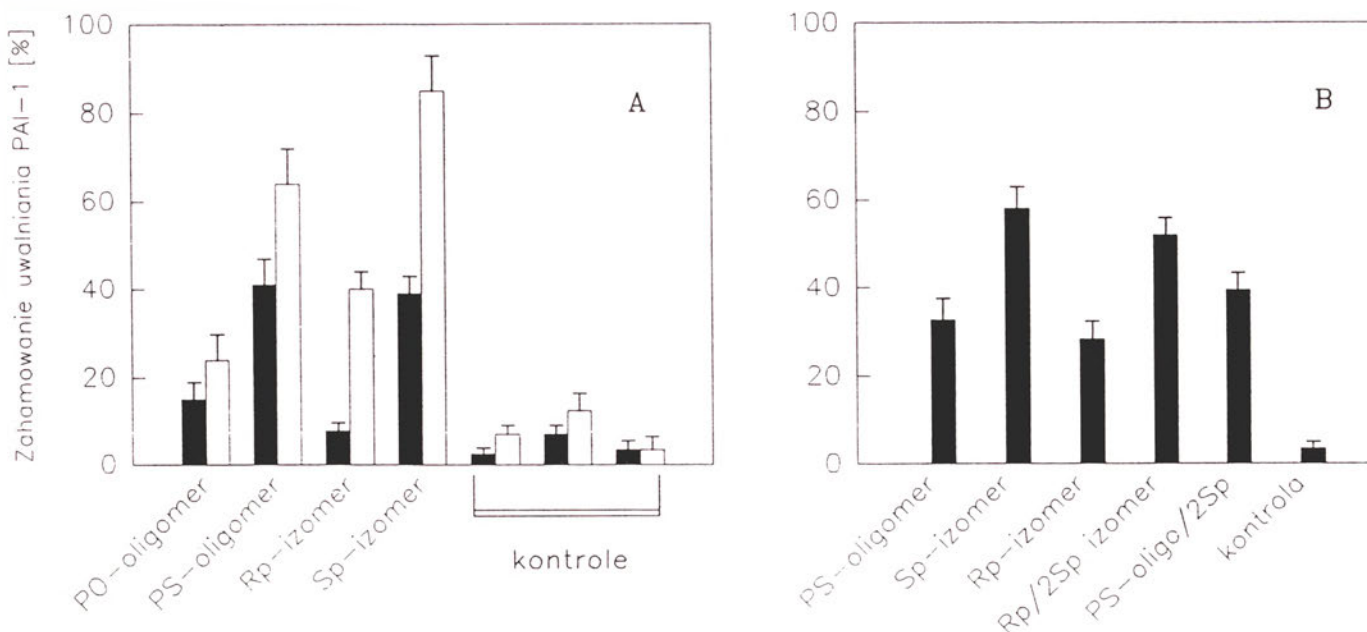
Spośród pięciu form oligonukleotydu PS 16H izomer $R_p/2S_p$ okazał się bardziej aktywny niż izomer R_p , a najbardziej aktywny w hamowaniu biosyntezy PAI-1 izomer S_p [31]. Można przypuszczać, że tiofosforano-

we wiązania internukleotydowe o konfiguracji S_p chroniły izomer S_p oraz izomer $R_p/2S_p$ przed działaniem wewnątrzkomórkowych nukleaz, natomiast izomer R_p podlegał częściowej degradacji i dlatego wykazywał niższą aktywność antysensowną w doświadczeniach wykonanych na hodowlach komórkowych (Ryc. 2). Chociaż izomery PS-oligonukleotydów zawierające wyłącznie wiązania internukleotydowe o konfiguracji R_p wykazują większe powinowactwo do komplementarnego mRNA (wyrażone wyższą wartością T_m odpowiednich hybryd) oraz lepiej aktywują RNazę H niż izomery S_p [23], to jednak ich podatność na działanie R_p -specyficznych egzonukleaz może powodować obniżenie ich aktywności antysensownej w porównaniu z aktywnością, jaką mają izomery S_p . Nie jest to jednak reguła: badania prowadzone na innych liniach komórkowych z udziałem stereoregularnych oligonukleotydów o innych sekwencjach zasad wykazały wyższą aktywność antysensowną izomerów R_p [39-40].

Należy podkreślić, że chociaż badania prowadzone z wykorzystaniem tzw. stereoregularnych PS-oligonukleotydów pozwalają lepiej zrozumieć mechanizm działania tiofosforanowych oligonukleotydów i przemiany, jakim podlegają one w warunkach *in vivo*, to jednak powszechnie stosowane PS-oligonukleotydy są mieszaniną wszystkich możliwych diastereoizomerów, ponieważ są otrzymywane jako produkt niestereospecyficznej syntezy, np. metodą amidofosforynową [17].

V. Transport oligonukleotydów przez błony

Chociaż w przypadku kilku antysensownych PS-oligonukleotydów badania weszły już w fazę kliniczną, nadal poszukuje się metod ułatwienia transportu tiofosforanów do komórek. Z badań przeprowadzonych przy użyciu naturalnych oraz tiofosforanowych oligonukleotydów związanych kowalencyjnie z fluoresceiną wynika, że wchodzą one do komórek i gromadzą się w cytoplazmie zamknięte w pęcherzykach endosomalnych [24, 25]. Nie stwierdzono ich obecności w jądrach komórkowych. Dla ułatwienia transportu antysensownych oligonukleotydów przez błony komórkowe zaproponowano modyfikowanie ich cząsteczek związkami o charakterze lipofilowym. Zamiast fluoresceiny stosuje się np. cholesterol lub alkohole z długimi łańcuchami alifatycznymi [42, 43]. Tak zmodyfikowane oligonukleotydy zastosowano również w badaniach nad inhibitorami biosyntezy białka PAI-1. Dwa oligonukleotydy antysensowne wobec białka PAI-1 (PS 16H oraz jego niemodyfikowany prekursor, PO-16H) związane z takimi ligandami jak: cholesterol, heptadekanol, borneol i mentol [32]. Zbadano następnie wpływ tych koniugatów na poziom białka PAI-1 w hodowlach komórkowych. Wyniki były nieoczekiwane, ponieważ najwyższą aktywność w hamowaniu biosyntezy PAI-1 (wyższą w porównaniu z oligonukleotydem PS 16H) wykazały



Ryc. 2. Wpływ izomerów tiofosforanowego oligonukleotydu PS 16H antysensownego wobec białka PAI-1 na uwalnianie tego białka przez komórki śródbłonna żyły pępowinowej: A: Komórki inkubowano w obecności 2.5 μM oligonukleotydu odpowiednio przez 4 godz. (pełny kwadrat — ■) oraz 24 godz. (pusty kwadrat — □). B: Komórki inkubowano w obecności 0.625 μM oligonukleotydu przez 24 godz. „kontrola” oznaczają kontrolne oligonukleotydy tiofosforanowe.

PO-oligonukleotydy związane z mentolem albo heptadekanolem. Przyczyny wysokiej aktywności antysensownej tych oligonukleotydów nie są jeszcze znane, ale podjęto szczegółowe badania ich aktywności zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Zastosowanie w tym konkretnym przypadku koniugatów PO-oligonukleotydów pozwoliłoby zrezygnować z podawania ich analogów tiofosforanowych.

Dla ułatwienia transportu antysensownych oligonukleotydów proponowano także ich połączenie z dodatnio naładowanymi cząsteczkami (np. polilizyna) po to, aby zneutralizować ujemny ładunek tiofosforanowych wiązań internukleotydowych i ułatwić kontakt oligonukleotydów z ujemnie naładowaną błoną komórkową [43, 44]. Proponowano także podawanie do hodowli komórek oligonukleotydów „zamkniętych” w liposomach. Z doniesień literaturowych wynika, że takie podejście bardzo podwyższa efektywność wnikanania oligonukleotydów do komórek, a także w znacznym stopniu chroni je przed działaniem nukleaz [45, 46]. Zwiększenie efektywności transportu oligonukleotydów obserwowano także po podaniu ich do hodowli komórek łącznie z lipofektyną, która jest mieszaniną dwóch kationowych lipidów: dioleilofosfatydyloetanolaminy (DOPE) oraz chlorku dioleiloksypropylotrimetyloamonowego (DOTMA) [47]. Jednakże powyżej pewnego stężenia (różnego dla różnych linii komórkowych) lipofektyna oraz inne kationowe lipidy mogą wykazywać efekt cytotoksyczny.

Nie sposób tutaj wymienić wszystkich propozycji dotyczących usprawnienia transportu antysensownych oligonukleotydów do komórek. Wyniki badań są często niejednoznaczne, ponieważ w pracach nad transportem oligonukleotydów wykorzystuje się różne linie komórkowe, różne rodzaje lipidów kationowych

oraz oligonukleotydy o różnej długości i sekwencji zasad [3, 48]. O ostatecznych wynikach decyduje także rodzaj podłoża do hodowli komórek, gęstość komórek w hodowli oraz to, czy komórki rosną w zawieszynie czy przytwierdzone do podłoża.

W ostatnich latach zidentyfikowano szereg białek błonowych wiążących oligonukleotydy, jednakże ich udział w transporcie fragmentów DNA do komórek nie został dotychczas udowodniony [49-52]. Interpretację wyników eksperymentalnych utrudnia m.in. fakt, że PS-oligonukleotydy mogą się wiązać do białek surowicy będącej składnikiem podłoża do hodowli komórek. Geselowitz i Neckers twierdzą, że białko membranowe o masie ok. 75 kDa, obecne na powierzchni wielu różnych komórek i wiążące oligonukleotydy, jest w rzeczywistości albuminą pochodzącą z surowicy dodawanej do podłoża [52]. W warunkach eksperymentalnych możliwe jest stosowanie podłoża pozbawionego surowicy i jej białek, ale obecność albuminy we krwi może mieć wpływ na wnikanie oligonukleotydów do komórek w warunkach *in vivo*. Nie można wykluczyć, że białka o wysokim powinowactwie do oligonukleotydów nie tylko nie ułatwiają ich transportu do cytoplazmy, ale wręcz go utrudniają. Obecnie trudno jest o jednoznaczne wnioski na temat udziału białek w procesie wnikanania oligonukleotydów do komórek.

VI. Oddziaływania tiofosforanowych oligonukleotydów z białkami

Pojawiające się co najmniej od 8 lat doniesienia na temat oddziaływań tiofosforanowych oligonukleotydów z różnymi białkami sprawiły, że zaczęto się zastanawiać, do jakiego stopnia biologiczne efekty

wywoływane przez PS-oligonukleotydy są uwarunkowane ich sekwencją i oddziaływaniami z mRNA, a w jakim stopniu zależą od interakcji z białkami? Z jakimi białkami wiążą się PS-oligonukleotydy i jaki jest ich wpływ na funkcjonowanie tych białek?

Wiadomo, że powinowactwo tiofosforanowych oligonukleotydów do białek jest o 1-3 rzędy wielkości wyższe niż powinowactwo oligonukleotydów niemodyfikowanych [53]. Różnica ta wynika prawdopodobnie z faktu, że szybkość dysocjacji kompleksu białko-PS-oligonukleotyd jest znacznie niższa niż szybkość dysocjacji kompleksu utworzonego z udziałem niemodyfikowanego oligonukleotydu. Inaczej mówiąc, zarówno PO- jak i PS-oligonukleotydy wiążą się z białkami, ale kompleksy utworzone z udziałem PO-oligonukleotydów ulegają bardzo szybkiej dysocjacji [53].

W 1989 r. Majumdar i wsp. zwrócili uwagę, że tiofosforanowy oligonukleotyd $d[(C_{PS})_{27}C]$ wiąże się z odwrotną transkryptazą wirusa HIV, hamując jej aktywność 200-krotnie silniej niż odpowiadający mu naturalny oligonukleotyd użyty w tym samym stężeniu [54]. Odwrotna transkryptaza jest enzymem uczestniczącym w metabolizmie kwasów nukleinowych i z tego powodu może wykazywać powinowactwo do związków o strukturze oligo- lub polinukleotydów. Jak się jednak okazało, PS-oligonukleotydy wiążą się również z wieloma białkami, które w normalnych warunkach nie rozpoznają kwasów nukleinowych i nie wiążą się z nimi. Są to m.in. kwaśny i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF, bFGF), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF) [55] oraz receptor CD4 [56], fosfolipaza A2 [57] i kinaza białkowa C [58]. Tiofosforany tworząc trwale kompleksy z czynnikami wzrostu utrudniają ich wiązanie się z odpowiednimi receptorami na powierzchni komórek, co może częściowo wyjaśniać obserwację, iż PS-oligonukleotydy o przypadkowej sekwencji hamowały w warunkach *in vivo* rozwój czerniaka [59].

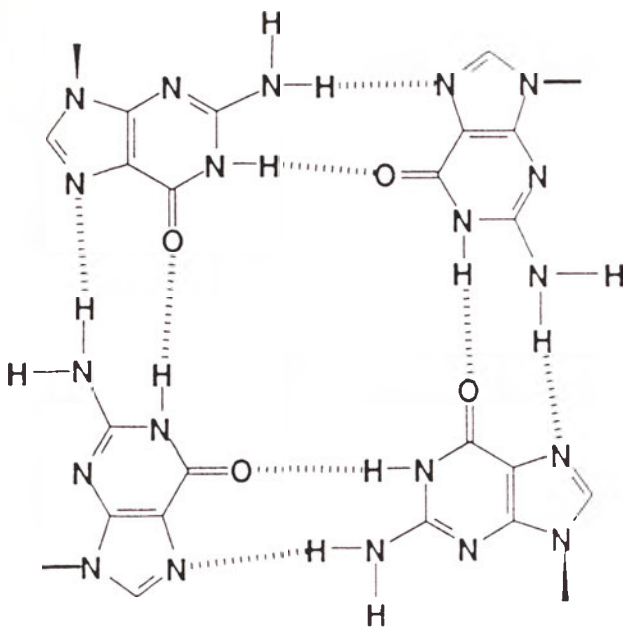
Wiązanie się tiofosforanowych oligonukleotydów z wymienionymi białkami oraz, być może, z wieloma innymi, nie zależy od sekwencji zasad. Uważa się, że jest ono spowodowane obecnością w cząsteczce oligonukleotydu znacznej ilości tiofosforanowych wiązań internukleotydowych. Aby więc uniknąć trudnych do przewidzenia skutków niespecyficznego wiązania się tiofosforanowych oligonukleotydów z białkami, zaproponowano ostatnio nowy rodzaj antysensownych oligonukleotydów [3]. W ich cząsteczkach zmodyfikowano siarką tylko kilka terminalnych (od 3'- oraz od 5'-końca) wiązań internukleotydowych, natomiast środkowy fragment łańcucha oligonukleotydowego pozostał niemodyfikowany [3]. Obecność kilku tiofosforanowych wiązań chroni oligonukleotyd przed działaniem 3'-egzonukleaz, ale nie zwiększa w widoczny sposób jego powinowactwa do białek. Trwają próby wykorzystania tych oligonukleotydów o tzw. miesz-

nym szkielecie fosforanowocukrowym w strategii antysensownej.

Ostatnio opisano także inne interesujące analogi oligonukleotydów. W ich cząsteczkach występują zamiast 3'-5' tiofosforanowych wiązań internukleotydowych, internukleotydowe wiązania tiofosforanowe 2'-5' [60]. Oligonukleotydy o takiej strukturze wiążą się z komplementarnymi fragmentami RNA, ale utworzone w ten sposób struktury dwuniciowe nie są substratem RNazy H. Co jednak ważniejsze, pomimo obecności atomu siarki w każdym wiązaniu internukleotydowym, (2'-5')-PS-oligonukleotydy nie wiążą się trwale z białkami. Zaproponowano więc stosowanie oligonukleotydów tiofosforanowych zawierających na swych końcach fragmenty z wiązaniami 2'-5', podczas gdy środkowa część łańcucha oligonukleotydowego zawiera wiązania internukleotydowe 3'-5'. Oligonukleotydy o takiej strukturze hamowały biosyntezę 5 α reduktazy steroidowej w komórkach jajowych chomika [60]. Przyczyna niskiego powinowactwa (2'-5')-PS-oligonukleotydów do białek jest jeszcze nieznana, ale ta nowa klasa antysensownych związków wydaje się obiecująca i trwają badania nad jej właściwościami.

Jednakże nie tylko obecność 3'-5' tiofosforanowych wiązań internukleotydowych jest przyczyną oddziaływań PS-oligonukleotydów z białkami. Ich interakcje z białkami mogą być także uwarunkowane obecnością określonych sekwencji zasad, takich jak tetramer d[GGGG] lub tetramer d[AGGG] [53]. Pochodzące z ostatnich lat wyniki prac nad strukturą II-rzędową kwasów nukleinowych świadczą, że takie sekwencje zasad mogą być zaangażowane w tworzenie struktur czteroniciowych zwanych *tetrapleksami* [61]. Warunkiem powstawania tych struktur jest obecność tzw. *tetrad G* (ang. *G tetrads*) utworzonych przez cztery reszty deoksyguanozyny należące do czterech różnych cząsteczek oligonukleotydu i stabilizowanych wiązaniami wodorowymi typu Hoogsteena (Ryc. 3) [62]. Możliwość tworzenia takich struktur przez PO- oraz PS-oligonukleotydy w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*, a także ich ewentualna rola są przedmiotem intensywnych badań [63, 64]. Jest to o tyle ważne, że antysensowne PS-oligonukleotydy zawierają dość często w swej strukturze motyw d[GGGG] lub motyw d[AGGG], np. będący przedmiotem badań klinicznych oligomer antysensowny wobec onkogenu *c-myc* [3].

Obecność tetramery d[GGGG] w sekwencji tiofosforanowego oligonukleotydu znacznie zwiększa jego powinowactwo do zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów, do glikoproteiny gp 120 wirusa HIV oraz do fosfolipazy A2 [53, 65]. Oligonukleotydy zawierające tetramer d[GGGG] wykazują także wysokie powinowactwo do niektórych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, np. do lamininy oraz fibronektyny ($IC_{50} = 100$ nM) [66]. Białka te, zawierając w swej strukturze miejsce wiążące heparynę, wiążą także PS-oligonukleotydy pozbawione tego tetramery



Ryc. 3. Tetrada G utworzona przez cztery reszty deoksyguanozyny należące do czterech różnych cząsteczek oligonukleotydu i stabilizowana wiązaniami wodorowymi typu Hoogstena [62].

($IC_{50} = 4 \mu M$), ale różnica wartości współczynnika IC_{50} świadczy o tym, że obecność fragmentu d[GGGG] w cząsteczce PS-oligonukleotydu wpływa na jego oddziaływanie z tymi białkami [68]. Interakcje PS-oligonukleotydów z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej mogą znacznie zmieniać właściwości komórek. Stwierdzono, że pod wpływem tiofosforanowych oligonukleotydów zachodzą zmiany w procesie adhezji komórek do podłoża [67]. PS-oligonukleotydy hamują wiązanie się lamininy do jej naturalnego ligandu, jakim jest siarczan galaktozyloceramidu. Z kolei ich oddziaływanie z fibronektyną blokuje jej wiązanie się do odpowiedniego receptora na powierzchni komórek [66].

Określona sekwencja zasad antysensownego oligonukleotydu może także wywoływać inne efekty, np. tiofosforanowe oligonukleotydy zawierające dinukleotyd CpG mają silne działanie immunostymulujące [68]. Przy obecnym stanie wiedzy, na podstawie analizy sekwencji zasad, nie można przewidzieć wszystkich (także „nie-antysensownych”) efektów biologicznych, jakie może wywołać oligonukleotyd podany w dużym stężeniu (10-20 μM).

Ostatnio pojawia się coraz więcej informacji o wyselekcjonowaniu oligonukleotydów wykazujących z racji kształtu swych cząsteczek niezwykle silne powinowactwo do określonych białek [69]. Często są to białka nie związane bliżej z metabolizmem kwasów nukleinowych (np. trombina lub selektyny) [70, 71]. Oligonukleotydowe ligandy doskonale dopasowane do kształtu cząsteczek białka (tzw. *aptamery*) otrzymywane są metodą selekcji ligandów (ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* — *SELEX*) [69, 72]. Polega ona na izolowaniu z puli oligonukleotydów o zróżnicowanej sekwencji niewielkiej frakcji cząsteczek wykazujących podwyższone

powinowactwo do określonego białka (etap selekcji). Cząsteczki oligonukleotydów wykazujących najwyższe powinowactwo do białka są poddawane reakcji PCR (etap powielania). Otrzymany w wyniku reakcji PCR preparat podlega kolejnym reakcjom selekcji i powielania. W ten sposób otrzymano m.in. aptamery trombiny, selektyn, odwrotnej transkryptazy wirusa ptasiej białaczki oraz integrazy wirusa HIV [70-73]. Aptamery, jako związki silnie hamujące aktywność wybranych białek mogą mieć w przyszłości znaczenie terapeutyczne. Wykorzystując metodę selekcji ligandów można, teoretycznie, wyselekcjonować aptamer dla niemal każdego białka [74]. Należy więc uwzględnić taką możliwość, że antysensowny oligonukleotyd zastosowany w celu zahamowania biosyntezy określonego białka poprzez hybrydyzację z odpowiednim mRNA i degradację tegoż RNA, okaże się aptamerem dla zupełnie innego białka. W pewnych przypadkach aptameryczny efekt działania oligonukleotydu może wzmacniać jego działanie antysensowne, ale może też powodować zdecydowanie negatywne skutki, szczególnie przy długotrwałym podawaniu antysensownego specyfiku.

Generalnie, trudno jest w sposób zdecydowany oddzielić efekt niespecyficznych (niezależnych od sekwencji zasad) oddziaływań PS-oligonukleotydów z białkami od skutków ich interakcji z RNA determinowanych przez sekwencję zasad tychże oligonukleotydów. Do jakiego stopnia można więc traktować PS-oligonukleotydy jako czynniki antysensowne? Odpowiedź zawarta w pracy przeglądowej *Stena* [53] brzmi, że 100%-owy efekt antysensowny (tzn. zależny tylko od sekwencji zasad i od interakcji z komplementarnym RNA) jest mało prawdopodobny, ale wykorzystując stosunkowo krótkie oligonukleotydy (15-17-mer) w stężeniach poniżej 5 μM (najlepiej poniżej 1 μM) można zminimalizować skutki wynikające z oddziaływań antysensownego oligonukleotydu z molekułami innymi niż komplementarny fragment RNA [53]. To zalecenie tłumaczy, dlaczego ważna jest optymalizacja transportu oligonukleotydów do komórek, dlaczego wciąż poszukuje się analogów oligonukleotydów bardziej specyficznych w swym działaniu, a więc bardziej bezpiecznych, niż analogi tiofosforanowe. Zainteresowanie takimi związkami jak: amidofosforanowe pochodne oligonukleotydów [75], (2'-5')-PS oligonukleotydy, chimery o mieszanym szkieletcie fosforanowo-cukrowym oraz peptydowe analogi oligonukleotydów [47] wynika przede wszystkim z faktu, że nie wiążą się one z białkami. Wśród wymienionych analogów oligodeoksyrybonukleotydów poszukuje się więc kolejnej generacji antysensownych oligonukleotydów.

VII. Badania terapeutycznych właściwości antysensownych oligonukleotydów

Wstępną ocenę skuteczności antysensownych oligo-

nukleotydów umożliwiają badania na liniach komórkowych. W odniesieniu do oligonukleotydów, których zadaniem jest hamowanie replikacji wirusa, ich działanie ocenia się na podstawie spadku liczby komórek zainfekowanych wirusem oraz na podstawie stężenia odpowiednich antygenów wirusowych obecnych w podłożu. W przypadku oligonukleotydów antysensownych wobec określonych komórkowych mRNA ocenie podlega poziom odpowiedniego mRNA oraz poziom białka kodowanego przez ten RNA. Konieczne jest także zbadanie ewentualnego efektu cytotoksycznego stosowanych oligonukleotydów. Cytotoksyczne działanie antysensownych oligonukleotydów w odniesieniu do komórek prawidłowych wyklucza możliwość ich wykorzystania w dalszych badaniach, a tym bardziej w terapii oraz może świadczyć o istnieniu dodatkowego, nie-antysensownego mechanizmu ich działania. Od rodzaju stosowanych komórek zależy stężenie, przy którym antysensowny oligonukleotyd wykazuje swą aktywność. W przypadku komórek zainfekowanych wirusem zależy ono również od tego, czy oligonukleotyd został podany do komórek przed czy po zainfekowaniu ich wirusem. Aktywność antysensowna oligonukleotydu zależy także od sposobu podawania go do komórek. Mikroiniekcja oligonukleotydu do komórek lub obecność odpowiednich lipidowych nośników zwiększają skuteczność działania oligonukleotydu. Niekiedy jednak zasadność stosowania takich metod jest kwestionowana, ponieważ nie zawsze można je stosować w warunkach *in vivo*.

Modulatorami antysensownej aktywności oligonukleotydów w hodowlach komórkowych są także białka surowicy, która jest bardzo często składnikiem podłoża. Obecne w surowicy albuminy wiążą niespecyficznie tiofosforanowe oligonukleotydy, a ponadto surowica zawiera 3'-egzonukleazę, która dokonuje częściowej ich degradacji. Co prawda, procedura przygotowania surowicy przed dodaniem do podłoża obejmuje jej 30-minutową inkubację w temp. 65°C, ale nie gwarantuje pełnej inaktywacji enzymu. Wysunięto sugestie, że nie-antysensowny efekt działania oligonukleotydów może również wynikać z obecności w podłożu nukleotydowych produktów ich degradacji przez 3'-egzonukleazę [3].

W badaniach nad oligonukleotydami antysensownymi wobec mRNA białka PAI-1 wykorzystano ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (komórki HUVEC) oraz zmienione nowotworowo komórki śródbłonna (linia EA.hy 926) [30-32]. Efekt działania oligonukleotydów badano w zakresie stężeń od 0 do 2.5 µM poprzez pomiar stopnia zahamowania aktywności tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA). Ponadto oznaczano poziom mRNA PAI-1, wykorzystując w tym celu metodę powielania DNA otrzymanego w wyniku odwrotnej transkrypcji tegoż mRNA (RT PCR). Z komórek HUVEC inkubowanych w podłożu zawierającym odpowiednie oligonukleotydy oraz z komórek kontrolnych izolowano mRNA, następnie prze-

prowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji oraz reakcję powielania tak otrzymanego cDNA (PCR). W przypadku RNA z komórek traktowanych oligonukleotydem analiza elektroforetyczna wykazała brak prążka odpowiadającego produktowi reakcji PCR, co było spowodowane brakiem odpowiedniej matrycy dla odwrotnej transkryptazy, tzn. brakiem mRNA białka PAI-1. Kontrolny eksperyment przeprowadzony w analogiczny sposób dla mRNA dehydrogenazy 3'-fosforanu aldehydu glicerynowego wykazał obecność oczekiwanego produktu reakcji PCR. Oznaczało to, że poziom mRNA tego enzymu nie zmienił się pod wpływem oligonukleotydów antysensownych wobec mRNA PAI-1 [32]. Tym samym potwierdzono specyficzność działania tych oligonukleotydów.

We wszystkich eksperymentach z wykorzystaniem oligonukleotydu PS 16H, jego stereoregularnych izomerów oraz lipofilowych koniugatów stosowano dwa oligonukleotydy kontrolne, tzn. PS-oligonukleotydy o takiej samej długości, ale o zmienionej sekwencji zasad w stosunku do sekwencji oligomeru PS 16H. Sekwencja jednego z nich różni się tylko dwoma zasadami od sekwencji oligonukleotydu PS 16H, natomiast sekwencja drugiego jest zupełnie inna, ale procentowy udział zasad pozostaje taki sam jak dla oligomeru PS 16H. Każdy z tych dwóch oligonukleotydów w minimalnym stopniu hamował biosyntezę białka PAI-1, co potwierdziło antysensowny mechanizm działania oligonukleotydu PS 16H. Podobne kontrolne oligonukleotydy są stosowane we wszystkich badaniach nad zahamowaniem biosyntezy białka przez antysensowne oligonukleotydy [77].

Pozytywne wyniki eksperymentów prowadzonych na wybranych liniach komórkowych stanowią zazwyczaj przesłankę do rozpoczęcia badań *in vivo*. Badania te umożliwiają przede wszystkim ocenę terapeutycznych właściwości PS-oligonukleotydów, ale pozwalają także na prześledzenie ich dystrybucji w tkankach, metabolizmu, oraz farmakokinetyki [3]. Opisano dotychczas wyniki badań prowadzonych na myszach [78, 79], szczurach [80-82] i małpach [83, 84], którym podawano w różny sposób (dożylnie, śródskórnym, dootrzewnowo oraz podskórnym) PS-oligonukleotydy o różnej długości i sekwencji. Sposób podawania oraz dawka mają wpływ na metabolizm oligonukleotydu oraz szybkość wydalania go z organizmu. Okazało się, że tiofosforanowe oligonukleotydy wywołują u zwierząt dodatkowe efekty uboczne, których ze zrozumiałych względów nie obserwowano wcześniej w hodowlach komórkowych. Chociaż PS-oligonukleotydy są dobrze tolerowane przez zwierzęta doświadczalne i posiadają wartość LD₅₀ na poziomie 500 mg/kg wagi ciała, to jednak ich podawanie powoduje u myszy i szczurów wzrost poziomu aminotransferaz [85], powiększenie śledziony oraz obniżenie liczby płytek krwi. W przypadku małp podawanie PS-oligonukleotydów powoduje dodatkowe efekty uboczne, nie obserwowane u mniejszych

zwierząt: zmiany ciśnienia krwi, spadek liczby leukocytów oraz aktywację dopełniacza i wydłużenie czasu krzepnięcia krwi [86]. Badaniom *in vivo* poddano także opisany wcześniej oligonukleotyd PS 16H podając go szczurom [31]. Wykorzystano w tym celu 3 grupy zwierząt. Jednej z nich podano dożylnie oligonukleotyd PS 16H, natomiast pozostałym dwóm grupom podano oligonukleotydy kontrolne w dawkach 1.5, 3.0 i 5.0 mg na zwierzę. W pobranych próbkach krwi zbadano poziom białka PAI-1. Otrzymane wyniki potwierdziły wcześniejsze obserwacje, że oligonukleotyd PS 16H hamuje biosyntezę białka PAI-1 i jest to efekt jego wiązania się z komplementarnym fragmentem mRNA oraz, prawdopodobnie, degradacji tegoż mRNA. Przeciwwkrzepowe działanie oligonukleotydu PS 16H wykazano także podając go w dawce 1.5 mg szczurom z wywołaną eksperymentalnie zakrzepicą tętniczą. U zwierząt, którym podawano oligonukleotyd PS 16H, zakrzepy będące skutkiem doświadczenia pojawiły się znacznie później niż u szczurów, którym podano jeden z dwóch oligonukleotydów kontrolnych [31].

VIII. Uwagi końcowe

Poszukiwania oligonukleotydowych terapeutyków to obecnie przedmiot zainteresowań wielu ośrodków naukowych oraz firm biotechnologicznych [3,87]. Ze względu na różny mechanizm działania, wyróżniono cztery klasy potencjalnych leków oligonukleotydowych:

- 1) oligonukleotydy antysensowne — wiążą się z komplementarnymi fragmentami RNA, aktywują RNAzę H i w konsekwencji hamują translację;
- 2) oligonukleotydy antygenowe — wiążą się z dwuniciowym DNA, tworzą struktury trójniciowe i hamują transkrypcję;
- 3) oligonukleotydy katalityczne — oligorybonukleotydy degradujące RNA (syntetyczne rybozymy);
- 4) aptamery, które wiążą się bezpośrednio z określonymi białkami i hamują ich funkcjonowanie.

Tabela 3.

Stan badań klinicznych z zastosowaniem tiofosforanowych oligonukleotydów [3, 87].

Sekwencja	Gen docelowy	Stan badań
GCG TTT GCT CTT CTT GCG	CMV	Faza III
CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T	HIV gag	Faza I II
GCC CAA GCT GGC ATC GGT CA	ICAM	Faza II
GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA	PKC	Faza I
TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC	<i>c-myb</i>	Faza I
TCC CGC CTG TGA CAT GCA TT	<i>c-raf</i>	Faza I

Celem I fazy badań klinicznych jest określenie farmakokinetyki leku, jego toksyczności oraz maksymalnej dawki tolerowanej przez pacjenta. II faza badań ma na celu określenie efektywności leku (efektu terapeutycznego) w stosunku do schorzenia wywołanego przez gen docelowy. Celem III fazy jest porównanie efektywności badanego preparatu w stosunku do innych, uznanych już leków [88].

Oligonukleotydy antygenowe i katalityczne są dotychczas tylko przedmiotem badań *in vitro*. Najkrótszą historię (5-7 lat) mają badania nad otrzymywaniem i zastosowaniem aptamerów. Natomiast najbardziej zaawansowane są badania nad oligonukleotydami antysensownymi wobec mRNA. Przynajmniej sześć takich oligonukleotydów podlega obecnie badaniom klinicznym (Tab. 3) [3, 87]. Dwa z nich hamują replikację wirusów (cytomegalowirusa oraz wirusa HIV). Kolejne oligonukleotydy wykazują aktywność antysensowną wobec mRNA kinazy białkowej C oraz onkogenów *c-myb* oraz *c-raf*. Białkowe produkty tych genów są związane z etiologią chorób nowotworowych (m.in. ostrej i przewlekłej białaczki). W II fazie badań klinicznych znajduje się oligonukleotyd, który hamuje ekspresję białka ICAM-1 (ang. *intracellular adhesion molecule*) odpowiedzialnego m.in. za adhezję komórek. Istnieje szansa, że będzie on stosowany w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów, łuszczycy, zapalenia okrężnicy oraz choroby Crohna [87]. Rozpoczęcie badań klinicznych z udziałem antysensownych oligonukleotydów jest dowodem istotnego postępu w pracach nad ich zastosowaniem w medycynie. Nadal jednak istnieje wiele wątpliwości co do specyficzności i skuteczności ich działania. Można oczekiwać, że wiele tych wątpliwości uda się wyjaśnić w toku prowadzonych obecnie prac. Niezależnie jednak od ich ostatecznych wyników, już dziś można powiedzieć, że zastosowanie antysensownych oligonukleotydów w badaniach biomedycznych znakomicie wzbogaciło naszą wiedzę o molekularnych podstawach wielu procesów biologicznych.

*Artykuł otrzymano 1 grudnia 1997 r.
Zaakceptowano do druku 2 marca 1998 r.*

Podziękowania

Dziękuję prof. Wojciechowi J. Stecowi za inspirację i liczne dyskusje, pomocne w opracowaniu niniejszego przeglądu.

Ze względu na ograniczenie objętości pracy wymieniono tylko wybrane pozycje piśmiennictwa.

1. Crooke ST, Lebleu B (1993) *Antisense Research and Applications*, CRC Press
2. Zamecnik PC (1996) W: Agrawal S (red) *Antisense Therapeutics*, Humana Press, str. 1-11
3. Agrawal S (1996) *Trends Biotechnol* **14**: 376-387
4. Szklarczyk A (1993) *Post Biochem* **39** (4): 221-227
5. Szklarczyk A (1994) *Post Biochem* **40** (3): 166-174
6. Szklarczyk A, Kaczmarek L (1997) *Neurochem Int* **31**: 413-423
7. Offensperger WB, Offensperger S, Walter E, Teubner K, Igloi G, Blum HE, Gerok W (1993) *EMBO J* **12**: 1257-1262
8. Leonetti C, D'Agnano I, Lozupone F, Valentini A, Geiser T, Zon G, Calabretta B, Citro GC, Zupi G (1996) *J Natl Cancer Inst* **88**: 419-429
9. Simons M, Edelman ER, De Keyser JL, Langer R, Rosenberg RD (1992) *Nature (Lond)* **359**: 67-70
10. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Oghihara T, Dzau VJ (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8474-8478
11. Simons M, Edelman ER, Rosenberg RD (1994) *J Clin Invest* **93**: 2351-2356
12. Ratajczak MZ, Kant JA, Luger SM, Hijiya N, Zhang J, Zon G, Gewirtz AM (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11823-11827
13. Skórski T, Nieborowska-Skórska M, Nicolaidis NC, Szczylik C, Iverson P, Iozzo RV, Zon G, Calabretta B (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4504-4508
14. Hijiya N, Zhang J, Ratajczak MZ, Kant JA, DeRiel K, Herlyn M, Zon G, Gewirtz AM (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4499-4503
15. Szczylik C, Skórski T, Nicolaidis NC, Manzella L, Malaguarnera L, Venturelli D, Gewirtz AM, Calabretta B (1991) *Science* **253**: 562-565
16. Abe JI (1994) *Biochem Biophys Res Comm* **198**: 16-24
17. Stec WJ, Zon G, Egan W, Stec B (1984) *J Am Chem Soc* **106**: 6077-6079
18. Koziolkiewicz M, Uznański B, Stec WJ, Zon G (1986) *Chem Scr* **26**: 252-260
19. Zon G, Stec WJ (1991) W: Eckstein F (red) *Oligonucleotides and Analogues*. IRL Press, Oxford, str 87-108
20. Miller PS, Ts' O POP, Hogrefe RI, Reynolds MA, Arnold IJ (1993) W: Crooke ST, Lebleu B (red) *Antisense Research and Applications*. CRC Press, str 189-203
21. Koziolkiewicz M, Wójcik M, Kobylańska A, Karwowski B, Rębowska B, Guga P, Stec WJ (1997) *Antisense and Nucl Acids Drug Dev* **7**: 43-48
22. Koziolkiewicz M, Gendaszewska E, Maszewska M (1997) *Nucleosides and Nucleotides* — praca w druku
23. Koziolkiewicz M, Krakowiak A, Kwinkowski M, Boczkowska M, Stec WJ (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 5000-5005
24. Łaski J (1994) *Biotechnologia* **4**: 41-49
25. Wyroba E, Pawłowska Z, Kobylańska A, Pluskota E, Maszewska M, Stec WJ, Cierniewski CS (1996) *Biol Cell* **87**: 37-43
26. Kwinkowski M (1994) *Biotechnologia* **4**: 69-78
27. Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen JS, Brodes S (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7706-7711
28. Herschlag D (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6921-6925
29. Wagner RW, Mateucci MD, Lewis JG, Gutierrez AJ, Moulds C, Froehler BC (1993) *Science* **260**: 1510-1513
30. Cierniewski CS, Babińska A, Świątkowska M, Wilczyńska M, Okruszek A, Stec WJ (1995) *Eur J Biochem* **227**: 494-499
31. Stec WJ, Cierniewski CS, Okruszek A, Kobylańska A, Pawłowska Z, Koziolkiewicz M, Pluskota E, Maciaszek A, Rębowska M, Stasiak M (1997) *Antisense and Nucl Acids Drug Dev* — praca w druku
32. Buczek W, Cierniewski CS, Kobylańska A, Koziolkiewicz M, Okruszek A, Pawłowska Z, Pluskota E, Stec WJ (1997) *Pharmacology and Therapeutics* — praca w druku
33. Świątkowska M, Wilczyńska M, Cierniewski CS (1991) *Post Biochem* **37** (3/4): 139-145
34. Bryant RF, Benkovic SJ (1979) *Biochemistry* **18**: 2825-2830
35. Meiss G, Friedhoff P, Hahn M, Gimadudinow O, Pingoud A (1995) *Biochemistry* **34**: 11979-11988
36. Stec WJ, Grajkowski A, Karwowski B, Kobylańska A, Koziolkiewicz M, Misiura K, Okruszek A, Wilk A, Guga P, Boczkowska M (1995) *J Am Chem Soc* **117**: 12019-12029
37. Potter BVL, Connolly BA, Eckstein F (1983) *Biochemistry* **22**: 1369-1374
38. Stec WJ, Grajkowski A, Koziolkiewicz M, Uznański B (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 5883-5888
39. Saison-Behomaras E — dane nie publikowane
40. Fearon K — dane nie publikowane
41. Letsinger RL, Zhang G, Sun DK, Ikeuchi T, Sarin PS (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6553-6556
42. Boiziau C, Toulme JJ (1991) *Biochimie* **73**: 1403-1408
43. Stevenson M, Iverson PL (1989) *J Gen Virol* **70**: 2673-2682
44. Degols G, Leonetti JP, Gagnor C, Lemaite M, Lebleu B (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 9341-9350
45. Leonetti JP, Machy P, Degols G, Lebleu B, Lesherman L (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2448-2451
46. Thierry AR, Ditschilo A (1992) *Nucl Acids Res* **20**: 5691-5698
47. Colige A, Sokolov BP, Nugent P, Baserga R, Prockop DJ (1993) *Biochemistry* **32**: 7-11
48. Vlassov VV, Balakireva LA, Yakubov LA (1994) *Biochem Biophys Acta* **1197**: 95-108
49. Loke SL, Stein CA, Zhang XH, Mori K, Nakaniishi M, Subashinge C, Cohen JS, Neckers LM (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3474-3478
50. Yakubov L, Deeva E, Zarytova V (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6454-6458
51. Yao GQ, Corrias S, Cheng YC (1996) *Biochem Pharmacol* **51**: 431-436
52. Geselowitz DA, Neckers LM (1995) *Antisense Res and Dev* **5**: 213-217
53. Stein CA (1996) *Trends Biotechnol* **14**: 147-149
54. Majumdar C, Stein CA, Cohen JS, Broder S, Wilson SH (1989) *Biochemistry* **28**: 1340-1346
55. Guvakova MA, Yakubov LA, Vlodayvsky I, Tonkinson JL, Stein CA (1995) *J Biol Chem* **270**: 2670-2672
56. Stein CA, Cheng YC (1993) *Science* **261**: 1004-1012
57. Bennett CF, Chiang MY, Wilson-Lingardo L, Wyatt J (1994) *Nucl Acids Res* **22**: 3202-3209
58. Yakubov L, Khaled Z, Zhang L-M, Truneh A, Vlassov V, Stein CA (1993) *J Biol Chem* **268**: 18818-18823
59. Jansen B, Wadl H, Inoue SA, Trulzsch B, Selzer E, Duchene M, Eichler HG (1995) *Antisense Res Dev* **5**: 271-277
60. Bhan P, Bhan A, Hong M, Hartwell JG, Saunders JM, Hoke GD (1997) *Nucl Acids Res* **25**: 3310-3317
61. Sen D, Gilbert W (1992) *Biochemistry* **31**: 65-70
62. Jin R, Breslauer KJ, Jones RA, Gaffney BL (1990) *Science* **250**: 543-546
63. Basu S, Wickstrom E (1997) *Nucl Acids Res* **25**: 1327-1332
64. Tamura I, Iwatani W, Shoji Y, Shimada J, Mizushima Y (1995) *Nucl Acids Res Symp Ser* **34**: 93-94
65. Wyatt J, Vickers TA, Robertson JL, Buckheit RW, Klimkait T, DeBaets E, Davis PW, Rayner B, Imbach JL, Ecker DJ (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1356-1360
66. Khaled Z, Benimetskaya L, Khan T, Zetzer R, Sharma H, Narayanan R, Stein CA (1996) *Nucl Acids Res* **24**: 737-745
67. Maltese J-Y, Sharma H, Vassilev L, Narayanan R (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 1146-1151
68. Krieg A, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) *Nature (Lond)* **374**: 546-549

69. Burke JM, Berzal-Herranz A (1993) *The FASEB Journal* **7**: 106-112
70. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ (1992) *Nature (Lond)* **308**: 820-826
71. Jennings S, Fitzwater T, Han H-L, Varki N, Albinana I, Willis MC, Varki A, Parma D (1996) *J Clin Invest* **98**: 2688-2692
72. Chen H, Gold L (1994) *Biochemistry* **33**: 8746-8756
73. Mazumder A, Neamati N, Ojwang JO, Sunder S, Rando SF, Pommier Y (1996) *Biochemistry* **35**: 13762-13771
74. Kenan DJ, Tsai DE, Keene JD (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 57-64
75. Gryaznov SM, Chen J-K (1994) *J Am Chem Soc* **116**: 3143-3144
76. Egholm M, Burchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE (1993) *Nature* **365**: 566-570
77. Stein CA, Krieg AM (1994) *Antisense Res Dev* **4**: 67-69
78. Agrawal S, Tamsamani J, Tang J-Y (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7595-7599
79. Sands H, Gorey-Feret LJ, Cocuzza AJ, Hobbs FW, Chidester D, Trainor GL (1994) *Mol Pharmacol* **45**: 932-943
80. Zhang R, Lu Z, Zhao H, Zhang X, Diasio RB, Habus I, Jiang Z, Iyer RP, Yu D, Agrawal S (1995) *Biochem Pharmacol* **49**: 929-939
81. Cossum PA, Sasmor H, Dillinger D, Truong L, Cummins L, Owens SR (1993) *J Pharm Exp Ther* **267**: 1181-1190
82. Iverson PL (1992) *Anticancer Drug Dev* **6**: 531-538
83. Agrawal S, Tamsamani J, Galbraith W, Tang J-Y (1995) *Clin Pharmacol* **28**: 7-16
84. Srinivasan SK, Iverson P (1995) *J Clin Lab Anal* **9**: 129-137
85. Sarmiento UM, Perez JR, Becker JM, Narayanan R (1994) *Antisense Res Dev* **4**: 99-107
86. Galbraith WM, Hobson WC, Giclas PC, Schechter PJ, Agrawal S (1994) *Antisense Res Dev* **4**: 201-206
87. Glaser V *Genetic Engineering News* February 1996
88. Schwartzmann G, Winograd B, Pinedo HM (1988) *Radiotherapy and Oncology* **12**: 301-313
89. Cahn Rs (1964) *J Chem Educ* **41**: 116-121

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

Gdańsk (Poland)
14—18 September, 1999

Organized for ESSPPMM

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

Chairman of the Organizing Committee: Prof. Dr Wiesław Makarewicz

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

Information and inquiries:

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

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

Transportery ABC w komórkach człowieka

ABC transporters in human cells

GRZEGORZ BARTOSZ*

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Co to są transportery ABC?
- III. Transportery błon plazmatycznych komórek człowieka
 - III-1. Eksportery ksenobiotyków i fosfolipidów
 - III.1-1. Glikoproteina P — białko oporności wielolekowej (MDR1)
 - III.1-2. Glikoproteina P — MDR3 (= MDR2)
 - III.1-3. Siostra glikoproteiny P (SPGP)
 - III.1-4. Białko 1 związane z opornością wielolekową (MRP1)
 - III.1-5. Białko 2 związane z opornością wielolekową (MRP2)
 - III.1-6. Białka 3-6 związane z opornością wielolekową (MRP3-6)
 - III.1-7. Typ krótki białka związanego z opornością wielolekową (SMRP)
 - III-2. Kanaly jonowe, regulatory kanałów
 - III.2-1. Białko mukowiscydozy (CFTR)
 - III.2-2. Nabłonkowy regulator przenikania chlorków (EBCR)
 - III.2-3. Receptor sulfonilomoczników (SUR)
 - III-3. Transportery o niejasnej jeszcze funkcji
 - III.3-1. Transporter ABC1
 - III.3-2. Transporter ABC2
 - III.3-3. Transporter ABC3
 - III.3-4. Transporter ABC-C
 - III.3-5. Siatkóvkowy transporter ABC (ABCR)
- IV. Transportery błon wewnątrzkomórkowych
 - IV-1. Transportery błon peroksysomów
 - IV.1-1. Główny transporter peroksysomalny (PMP70)
 - IV.1-2. Białko adrenoleukodystrofii (ALDP)
 - IV.1-3. Białko związane z adrenoleukodystrofią (ALDRP)
 - IV.1-4. Transporter PMP69
 - IV-2. Transportery uczestniczące w procesie prezentacji antygenów
 - IV.2-1. Transportery peptydów antygenowych (TAP)
 - IV-3. Transportery metabolitów?
 - IV.3-1. Transporter ABC8
 - IV-4. Transportery ksenobiotyków?
 - IV.4-1. Białko związane z opornością na antracykliny (ARA)
 - IV-5. Transportery o niejasnej jeszcze funkcji
 - IV.5-1. Transporter ABC7
 - IV.5-2. Transporter EST45597
- V. Niektóre kierunki badań transporterów ATP

Contents:

- I. Introduction
- II. What are ABC transporters?
- III. Transporters of plasma membranes of human cells
 - III-1. Exporters of xenobiotics and phospholipids
 - III.1-1. P glycoprotein, multidrug resistance protein (MDR1)
 - III.1-2. P glycoprotein MDR3 (= MDR2)
 - III.1-3. Sister of P glycoprotein (SPGP)
 - III.1-4. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)
 - III.1-5. Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)
 - III.1-6. Multidrug resistance-associated proteins 3-6 (MRP3-6)
 - III.1-7. Short type of multidrug resistance-associated protein (SMRP)
 - III-2. Ion channels, ion channel regulators
 - III.2-1. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)
 - III.2-2. Epithelial basolateral chloride conductance regulator (EBCR)
 - III.2-3. Sulfonilurea receptor (SUR)
 - III-3. Transporters of still unclear functions
 - III.3-1. ABC1 transporter
 - III.3-2. ABC2 transporter
 - III.3-3. ABC3 transporter
 - III.3-4. ABC-C transporter
 - III.3-5. Retinal ABC transporter (ABCR)
- IV. Transporters of intracellular membranes
 - IV-1. Transporters of peroxisomal membranes
 - IV.1-1. Peroxisomal membrane protein (PMP70)
 - IV.1-2. Adrenoleukodystrophy protein (ALDP)
 - IV.1-3. Adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP)
 - IV.1-4. Putative peroxisomal membrane protein (PMP69)
 - IV-2. Transporters engaged in antigen presentation
 - IV.2-1. Transporters of antigenic peptides (TAP)
 - IV-3. Metabolite transporters?
 - IV.3-1. ABC8 transporter
 - IV-4. Transporters of xenobiotics?
 - IV.4-1. Anthracycline resistance-associated protein (ARA)
 - IV-5. Transporters of still unclear functions
 - IV.5-1. ABC7 transporter
 - IV.5-2. EST45597 transporter
- V. Some lines of studies of ABC transporters

Wykaz stosowanych skrótów: ABC — kasetta wiążąca ATP (*ATP-binding cassette*); AM — ester acetometoksymetylowy; BCECF — 2',7'-bis(2-karboksyetylo)-5(6)-karboksyluoresceina; CoA — koenzym A; M_r — względna masa cząstecz-

kowa; TNF — czynnik martwicy guzów α ; VLCFA — kwasy tłuszczowe o bardzo długich łańcuchach.

I. Wprowadzenie

Istotny nurt badań błon komórkowych dotyczy obecnie struktury, właściwości i funkcji biologicz-

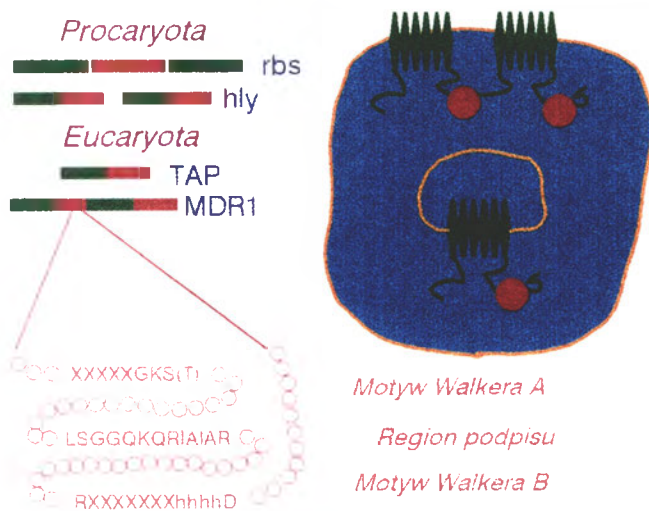
* Prof. dr hab., Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. S. Banacha 12/16 90-237 Łódź; E-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl lub (dom)gbartosz@wizdew.net

nych szczególnej grupy białek błonowych — transporterów ABC.

Lektura nawet najnowszych dostępnych na polskim rynku księgarskim podręczników biochemii czy biofizyki pozostawia wrażenie, że pierwotny aktywny transport polega na przemieszczaniu przez błony komórkowe, kosztem hydrolizy ATP przez pompy jonowe, małych jonów nieorganicznych. Mogą to być jony takie jak Na^+ i K^+ (które przenosi pompa sodowo-potasowa) czy Ca^{2+} (które transportuje pompa wapniowa); przez błonowy gradient stężenia tych jonów może dopiero napędzać transport metabolitów do komórki. Taki obraz aktywnego transportu jest prawdziwy, ale o tyle nieaktualny, że fragmentaryczny. Badania ostatnich lat wykazały, że krąg substratów pierwotnie aktywnego transportu jest znacznie szerszy. Obejmuje on m.in. fosfolipidy będące substratami flipazy¹ ale przede wszystkim wiele metabolitów pobieranych przez bakterie ze środowiska i szereg ksenobiotyków aktywnie eksportowanych z komórek eukariotycznych. Nowym substratom aktywnego transportu odpowiadają nowe aktywne transportery; analiza ich struktury sprawiła, że zgrupowano je w dużą nadrodzinę białek określaną mianem nadrodziny transporterów zawierających domenę wiążącą ATP (ang. *ATP Binding Cassette*) czyli transporterów ABC. W toku badań okazało się, że transportery ABC są bardzo heterogenne funkcjonalnie: tylko niektóre białka z tej rodziny pełnią funkcję aktywnych transporterów, inne prawdopodobnie funkcjonują jako kanały jonowe lub regulatory kanałów, zaś funkcje jeszcze innych oczekują na wyjaśnienie.

II. Co to są transportery ABC?

Obecnie znana jest sekwencja kilkuset białek zaliczanych do nadrodziny białek ABC występujących zarówno u prokariotów jak i u eukariotów. O ile transportery ABC prokariotów są złożone z kilku osobno syntetyzowanych podjednostek, białka te występują w komórkach eukariotów jako pojedyncze łańcuchy polipeptydowe zawierające zawsze pewne elementy strukturalne [1]. Jednym z nich jest właśnie domena (kaseta) wiążąca ATP, w skład której wchodzi m.in. charakterystyczne elementy sekwencji określane jako motywy Walkera A i B oraz region podpisu (*signature region*) zwany niekiedy motywem Walkera C [2] (Ryc. 1). Drugim elementem struktury transporterów ABC jest rejon przez błonowy, w skład którego wchodzi odcinki przebijające dwuwarstwę lipidową błony. Początkowo wydawało się, że odcinków takich musi być sześć; nowsze dane sugerują możliwe wyjątki od tej reguły. Transportery ABC zawierające jedną domenę wiążącą ATP i jeden rejon przez błonowy („hemitransportery”) występują w błonach wewnątrz-

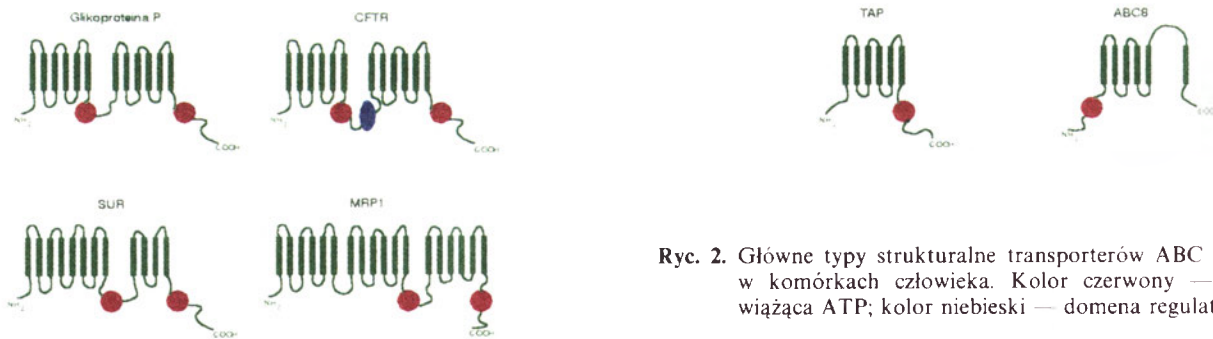


Ryc. 1. W komórkach prokariotycznych transportery ABC występują w postaci kilku odrębnych podjednostek, w komórkach eukariotycznych w postaci jednego długiego łańcucha polipeptydowego. „Pełne”, powstałe wskutek duplikacji genu transportery ABC obecne są w wewnątrzkomórkowych błonach plazmatycznych komórek eukariotycznych (np. białko MDR1), a „połówekowe” (hemitransportery) w błonach wewnątrzkomórkowych (np. TAP). Hemitransporter zawiera jedną domenę wiążącą ATP (czerwona) i rejon przez błonowy. W skład domeny wiążącej ATP wchodzi: sekwencje Walkera A i B oraz region podpisu; h — aminokwas hydrofobowy.

nych komórek eukariotycznych. W błonie plazmatycznej tych komórek obecne są natomiast transportery ABC, których cząsteczki są dwukrotnie większe i zawierają dwie domeny wiążące ATP i dwa rejony przez błonowe (Ryc. 2). Niewątpliwie powstały one drogą duplikacji czyli fuzji genów hemitransporterów ABC. Wskazuje na to homologia sekwencji obu „połówek”. Wydaje się, że „pełne” transportery ABC działają jako monomery, natomiast hemitransportery aktywne są jako homo- czy (raczej) heterodimery (znane są przykłady funkcjonowania homodimerów hemitransporterów ABC w komórkach bakterii, jednak w komórkach ssaków, jak dotychczas, znamy jedynie przykłady funkcjonalnych heterodimerów). Ogólnie, podobieństwo sekwencji pomiędzy różnymi transporterami ABC jest niskie (z wyjątkiem rejonów wiążących ATP). Wydaje się, że wiele kombinacji reszt aminokwasowych o odpowiedniej hydrofobowości może wytworzyć wystarczająco podobne regiony przez błonowe transporterów, konserwatyzm sekwencji tych regionów nie był więc ewolucyjnie konieczny.

Transportery ABC pełnią różnorodne funkcje. W komórkach bakterii transportery ABC uczestniczą w pobieraniu substancji odżywczych występujących w małych stężeniach w otoczeniu (cukrów, aminokwasów, jonów metali i witamin) i w eksporcie białek (hemolizyny A i kolicyny V z komórek *Escherichia coli*, proteaz z komórek *Erwinia*, cyklotizyny z komórek *Bordetella pertussis*) [3]. Transporter STE6 eksportuje feromon płciowy a z komórek *Saccharomyces cerevisiae* [4]. W komórkach eukariotycznych nie znaleziono transporterów ABC, które byłyby zaangażowane

¹ Ł. Pułaski: Flipazy — białka transportujące fosfolipidy. *Post. Bioch* 41 (1995) 131-138



Ryc. 2. Główne typy strukturalne transporterów ABC obecnych w komórkach człowieka. Kolor czerwony — domena wiążąca ATP; kolor niebieski — domena regulatorowa.

w pobieranie metabolitów z otoczenia, natomiast uwagę badaczy skupiają głównie transportery aktywnie transportujące substancje (przeważnie ksenobiotyki) na zewnątrz komórek: glikoproteina P i białko związane z opornością wielolekową (MRP) [5].

Całkowicie zsekwencjonowany genom drożdży *S. cerevisiae* zawiera 29 genów odpowiadających transporterom ABC [6]. Należy przypuszczać, że genom człowieka zawiera ich znacznie więcej. Dotychczas w komórkach człowieka zidentyfikowano geny co najmniej 34 takich transporterów [7] (Tab. 1); należy oczekiwać postępującego wydłużania się tej listy.

III. Transportery błon plazmatycznych komórek człowieka

III.1. Eksportery ksenobiotyków i fosfolipidów

III.1.1. Glikoproteina P — białko oporności wielolekowej (MDR1)²

M _r	170 000
Wielkość cząsteczki	1280 reszt aminokwasowych
Identyfikacja sekwencji pomiędzy obiema połówkami cząsteczki	43% [9]
Wykazuje największe podobieństwo do:	proV <i>Salmonella typhimurium</i> (transporter glicyny, betainy i L-proliny), PMD1 (czynnik oporności na leptomycynę B) <i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Już w końcu lat 60-tych zaobserwowano, że komórki odporne na daunorubicynę gromadzą mniej tego leku niż komórki, które są na niego wrażliwe [55]. W błonie plazmatycznej komórek opornych na kolchicynę wykryto potem znacznie wyższą zawartość glikoproteiny, która — jak sądzono — zmniejsza przepuszczalność błony dla tej substancji (i innych związków cytotoksycznych) [56]. Białko to nazwano glikoproteina P, od pierwszej litery słowa *permeability* (przepuszczalność). Następne badania wykazały wzmoczoną ekspresję glikoproteiny P w błonach komór-

rek nowotworowych wykazujących szerokie spektrum oporności na wiele leków przeciwnowotworowych o różnorodnej strukturze (oporność wielolekową) [57]. Dla przykładu, komórka neuroblastomatycznej linii BE(2)-C oporna na aktynomycynę D zawiera około $2,1 \cdot 10^6$ cząsteczek glikoproteiny P, podczas gdy komórka linii wyjściowej około $5,4 \cdot 10^4$ cząsteczek tego białka [58].

Glikoproteina P występuje również w normalnych komórkach niektórych typów, głównie na apikalnych powierzchniach komórek tkanek pełniących funkcje wydzielnicze (kora nadnerczy, jelito, nabłonek kanałków proksymalnych nerek). Niższym poziomem ekspresji tego białka cechują się komórki śródbłonna kapilar mózgu i jąder, łożyska, płuc, prostaty i żołądka, nabłonek pęcherza moczowego, komórki NK CD-56⁺, komórki macierzyste szpiku kostnego CD34⁺, cytotoksyczne komórki T CD8⁺ i chondrocyty [8, 11, 59].

Glikoproteina P aktywnie eksportuje z komórek ksenobiotyki, wśród nich leki. Jej początkowo hipotetyczną funkcję transportową potwierdziły doświadczenia, w których wykazano zależne od ATP gromadzenie substratów w wyciowanych pęcherzykach i proteoliposomach zawierających rekonstruowaną glikoproteina P [60]. Białko wykazuje aktywność ATP-azową, stymulowaną przez transportowe substraty [61-63]. Glikoproteina P może zużywać nawet 12% całej puli ATP w komórkach, w których zachodzi jej silna nadekspresja [64]. W przeciwieństwie do ATPazy typu P, w cyklu aktywności białka nie powstaje ufosforylowany intermedial [65]. Mimo to, *ortho*-wanadan silnie hamuje aktywność transportową i ATP-azową glikoproteiny P [65]. Obie domeny wiążące ATP wydają się być niezbędne dla funkcji białka, choć podział ich ról w procesie transportu nie jest jasny [8]. Glikozylacja nie ma wpływu na funkcję glikoproteiny P [10, 66]. Część doniesień wskazuje na możliwość regulacji aktywności glikoproteiny P przez kinazy białkowe, zwłaszcza kinazę białkową C- α [67, 68], choć ta kwestia wciąż budzi kontrowersje [69].

Szereg obserwacji sugeruje, że glikoproteina P aktywuje kanał chlorkowy w błonie plazmatycznej uczestniczący w regulacji objętości komórki [70-72] (początkowo przypisywano nawet samej glikoproteinie P funkcję kanału chlorkowego [73, 74]).

Współczesna wizja mechanizmów obrony komórki przed ksenobiotykami obejmuje nie tylko modyfikację

² Patrz też B. Grzelakowska-Sztabert: Oporność wielolekowa komórek nowotworowych. *Post Bioch* 35: 513-541 (1989)

Tabela 1.

Transportery ABC komórek człowieka.

Nazwa	Nazwa angielska	Skrót	Lokalizacja chromosomalna genu	Funkcja	Podstawowe odnośniki
Glikoproteina P	P glycoprotein	MDR1	7q21.1	Eksport ksenobiotyków	[8-11]
Glikoproteina P MDR3	MDR3 P-glycoprotein	MDR3	7q21-22	Transport fosfatydylocholiny	[12-14]
Siostra glikoproteiny P	Sister of P glycoprotein	SPGP		?	[15]
Białko 1 związane z opornością wielolekową	Multidrug Resistance-associated Protein 1 (Multispecific Organic Anion Transporter)	MRP1 (MOAT)	16p13.13-13.12	Eksport koniugatów ksenobiotyków	[16, 17]
Białko 2 związane z opornością wielolekową	Multidrug Resistance-associated Protein 2 (canalicular Multispecific Organic Anion Transporter)	MRP2 (cMRP, cMOAT)	10q24	Eksport koniugatów ksenobiotyków	[18-22]
Białka 3-6 związane z opornością wielolekową	Multidrug Resistance-associated Proteins 3-6	MRP3 MRP4 MRP5 MRP6	17 13 3 16p13.11		[23]
Krótki typ białka związanego z opornością wielolekową	Short type of Multidrug Resistance Protein	SMRP	3q27		[24]
Białko mukowiscydozy	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	CFRT	7q31	Kanał chlorkowy	[25-28]
Nabłonkowy regulator przenikania chlorków	Epithelial Basolateral Chloride Conductance Regulator	EBCR		Resorpcja Cl ⁻ ?	[29]
Receptor sulfonilomoczników	Sulfonilurea Receptor	SUR	11p15.1	Udział w regulacji uwalniania insuliny z komórek β trzustki	[30-32]
Transporter ABC1	ABC1 transporter	ABC1	9q22-31	Sekrecja białek nie posiadających sekwencji sygnałnej? Udział w usuwaniu ciałek apoptycznych? Kanał chlorkowy?	[33-36]
Transporter ABC2	ABC2 transporter	ABC2	9q34	?	[35]
Transporter ABC3	ABC3 transporter	ABC3	16p13.3	?	[35]
Transporter ABC-C	ABC-C transporter	ABC-C	16p13.3	Eksport ksenobiotyków?	[37, 38]
Siatkówkowy transporter ABC	Retina-specific ABC transporter	ABCR	1p13-p21	Transport (kwasów tłuszczowych? witaminy E?) do komórek siatkówki	[39]
Główny transporter peroksysomalny	70-kDa Peroxisomal Membrane Protein	PMP70	1	Transport białek lub metabolitów do peroksysomów	[40, 41]
Białko adrenoleukodystrofii	Adrenoleucodystrophy Protein	ALDP	Xq28	Transport białek lub metabolitów do peroksysomów	[42, 43]
Białko związane z adrenoleukodystrofią	Adrenoleucodystrophy Related Protein	ALDRP	12q11-q12	Transport białek lub metabolitów do peroksysomów	[44, 45]
Transporter PMP69	Putative Peroxisomal Membrane Protein	PMP69	14q24.3	Transport białek lub metabolitów do peroksysomów	[46]

Tabela 1 c.d.

Nazwa	Nazwa angielska	Skrót	Lokalizacja chromosomalna genu	Funkcja	Podstawowe odnośniki
Transportery peptydów antygenowych	Transporters of Antigenic Peptides	TAP1 (RING4, PSF1) TAP2 (RING11, PSF2)	6p21.3	Transport peptydów antygenowych do światła siateczki śródplazmatycznej	[47-50]
Transporter ABC7	ABC7 transporter	ABC7	Xq12-q13	Transport jonów metali ciężkich?	
Transporter ABC8	ABC8 transporter	ABC8	21q22.2-q22.3	Transport tryptofanu lub guaniny (?)	[51, 52]
Transporter EST45597	EST45597	EST45597	2	Transport jonów metali ciężkich	[7, 53]
Białko związane z opornością na antrycyliny	Anthracycline resistance-associated protein	ARA		Transport ksenobiotyków?	[54]

ksenobiotyku i jego koniugację z glutationem, glukuronianem lub siarczanem lecz także usuwanie z komórki ksenobiotyku w formie zmodyfikowanej lub niemodyfikowanej [75]. Glikoproteina P jest białkiem realizującym ten drugi mechanizm obrony (Ryc. 3). Jej nadekspresja stanowi jedną z głównych przyczyn niepowodzeń chemioterapii nowotworów [76]. Niewątpliwie musi pełnić jakieś funkcje fizjologiczne w normalnych komórkach, które nie są jednak jasne (z wyjątkiem uczestnictwa w barierach przepuszczalności typu bariery krew-mózg [77, 78] i krew-mocz [79]). Sugerowano udział tego transportera w transporcie steroidów [80] i cząsteczek białkowych nie mających sekwencji sygnałnej takich jak TNF- α , granzyny i perforyny [81]. Myszy transgeniczne pozbawione glikoproteiny P mają osłabioną barierę krew-mózg lecz nie stwierdzono u nich żadnych zaburzeń fizjologicznych [82, 83]. Wynik ten niekoniecznie wyklucza fizjologiczne role glikoproteiny P; być może jej funkcja jest częściowo dublowana przez funkcje innych transporterów. Wysoką ekspresję glikoproteiny P stwierdzono w chondrocytach znajdujących się w rejonach szkieletu ulegających mineralizacji [84]. Wysoka ekspresja glikoproteiny P w nabłonku pęcherza moczowego może chronić ten narząd przed karcynogenami wydalnymi w moczu [85].

Najbardziej intrygującą właściwością glikoproteiny P jest jej zdolność do transportu bardzo różnorodnych związków hydrofobowych, których cząsteczki nie mają ładunku elektrycznego lub są naładowane dodatnio (Tab. 2) [9, 75]. Klasyczne transportery cechują się

Ryc. 3. Dwie główne drogi obrony komórek zwierzęcych przed ksenobiotykami, dla których proponuję obrazowe nazwy. Droga „kaftana bezpieczeństwa” obejmuje wstępną modyfikację ksenobiotyku, np. hydroksylację (stadium I), sprzężanie z anionem organicznym (stadium II) i transport na zewnątrz komórki (stadium III). Droga „natychmiastowego wyrzucenia za drzwi” ogranicza się do aktywnego wypompowania ksenobiotyku z komórki. Wg [75], zmodyf.

znacznie większą specyficznością. Postulowano kilka hipotez mechanizmu działania glikoproteiny P (Ryc. 4). Pierwsza z nich zakłada, że białko to działa jako pompa podobna do znanych pomp jonowych [9]; na jej gruncie trudno wytłumaczyć brak specyficzności transportera. Inne hipotezy postulują, że glikoproteina P działa jak flipaza (przerzucając hydrofobowe, rozpuszczone w błonie substancje z cytoplazmatycznej połówki dwuwarstwy lipidowej błony do połówki ekstracytoplazmatycznej, skąd mogą dyfundować do przestrzeni pozakomórkowej) [86] bądź jako „odkurzacz molekularny”, wysysający z dwuwarstwy lipidowej błony ksenobiotyki i usuwający je na zewnątrz komórki [26]. Kolejna koncepcja oparta jest na danych świadcząc o aktywowaniu przez glikoproteinę P kanału chlorkowego i o podwyższaniu pH cytoplazmy komórek wykazujących nadekspresję tego białka. Zakłada ona, że glikoproteina P wcale nie jest aktywnym transporterem, a zmniejszenie wewnątrzkomórkowych stężeń ksenobiotyków w następstwie jej obecności w błonie wynika ze zmiany wewnątrzkomórkowego pH i potencjału błonowego [87], wpływających na podział tych substancji między wnętrze ko-

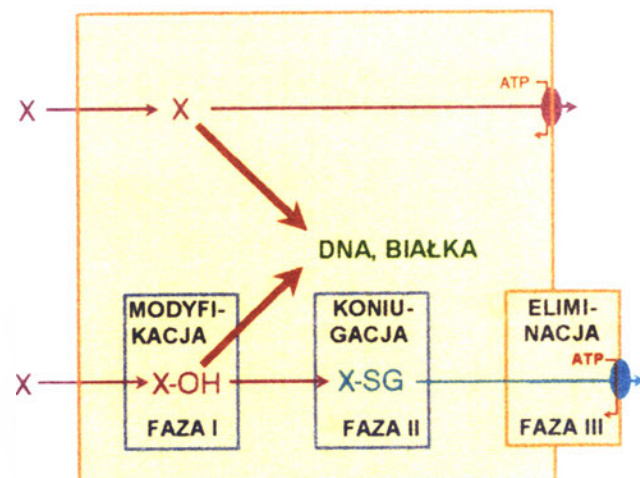


Tabela 2.

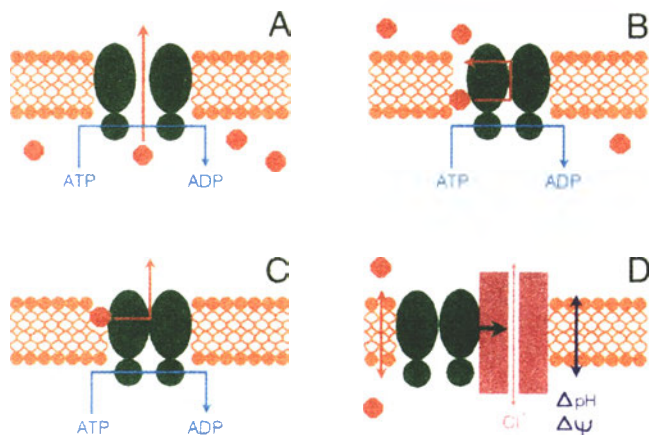
Niektóre substraty glikoproteiny P.

Adriamycyna [9]	Winblastyna [9]
Daunorubicyna [9]	Winkrystyna [9]
Idarubicyna [9]	Winorelbina [91]
Mitoksantron [9]	Amzakryna [91]
Aktynomycyna D [9]	Emetyna [9]
Mitomycyna C [9]	Etydyna [9]
Walinomycyna [9] [92]	Gramicydyna D [9]
Trimetrexat [91]	VP-16 (etopozyd) [9]
Topotekan [91]	Mitramycyna [91]
Rodamina 123 [93]	Hoechst 33342 [93]
Fura-2-AM (indykator Ca^{2+}) [93, 94]	Fluo-3-AM (indykator Ca^{2+}) [93, 95]
Tripeptyd N-acetylo-leucylo-leucylo-norleucyna [96]	Cyklosporyna [96]
Enkefaliny [96]	Iwermektyna [63]
BCECF-AM (indykator pH) [93]	DiOC ₂ (3) (indykator potencjału błonowego) [93]
Taksol [9]	Tetrafenylofosfonium (indykator potencjału błonowego) [97, 98]
Trifenylometrylofosfonium (indykator potencjału błonowego) [97]	Difenylodimetylofosfonium (indykator potencjału błonowego) [97]
Indo-1 AM (indykator Ca^{2+}) [94, 95]	Tetrapeptyd N-acetylo-leucylo-leucylo-norleucyna [99]
Kortyzol [100, 101]	Aldosteron [100]
Deksametazon [100]	Erytromycyna [102]
Rifampycyna [103]	Quin-2/AM [94]
Chinina [61]	Paklitaksel [104]
Puromycyna [104]	Etydyna [104]
Topotekan [104]	Cholesterol? [80]
^{99m} Tc-sestamibi [105, 106]	

mórki i środowisko pozakomórkowe [88-90].

Dla eksperymentatora ciekawa lecz niepokojąca może być zdolność glikoproteiny P do eksportu związków stosowanych jako indykatory pH, potencjału błonowego czy poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (Tab. 2). Może to rodzić artefakty w przypadkach porównywania odpowiednich wielkości w komórkach wykazujących nadekspresję glikoproteiny P i nie wykazujących nadekspresji tego białka mimo stosowania standardowych metod i standardowych warunków pomiaru.

Inną interesującą osobliwością glikoproteiny P, różniącą ją od większości białek błonowych, wydaje się



Ryc. 4. Różne koncepcje mechanizmu działania glikoproteiny P: białko to działa podobnie jak znane pompy jonowe (A), działa jako flipaza (B) czy odkurzacze molekularny (C) bądź też samo w ogóle nie transportuje ksenobiotyków, lecz zmienia ich stężenie w komórce poprzez wpływ na wewnątrzkomórkowe pH i potencjał błonowy (D).

być powinowactwo do domen błonowych o wyższej sztywności [107]. Zwiększenie płynności błony hamuje aktywność transportera [108].

III.1-2. Glikoproteina P — MDR3 (=MDR2)

M_r	170 000
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	białkiem MDR1 (76%)

Tkankowa ekspresja tego białka jest bardziej ograniczona w stosunku do glikoproteiny P. Najwyższą jego zawartością cechuje się wątroba, znacznie niższą nadnercza, serce, mięśnie szkieletowe, śledziona i migdałki [109]. Białko to, o sekwencji bardzo (jak na transportery ABC) podobnej do sekwencji glikoproteiny P czyli białka wielolekowej MDR1 i określane jako produkt genu MDR3 (MDR2), nie ma nic wspólnego z opornością na leki. Początkowo jego funkcja pozostawała zagadką. Potem okazało się, że działa ono jako translokaza fosfatydylocholiny, co jest szczególnie istotne w kanalikularnych regionach błon hepatocytów, umożliwiając wydzielanie tego lipidu w żółci [12, 13, 110]. Niedobór białka wywołuje jedną z postaci rodzinnej postępującej wewnątrzwątrobowej cholestazy [111]. Filipazowa aktywność białka MDR3 sugeruje, że również mechanizm działania glikoproteiny P może być analogiczny.

III. 1-3. Siostra glikoproteiny P (SPGP)

Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	białkiem MDR1 (sklonowany fragment: 61%)
--	--

W wątrobie świni i innych ssaków stwierdzono obecność białka podobnego do glikoproteiny P nazywanego siostrą glikoproteiny P. Jego ekspresja jest ograniczona do wątroby. Funkcja białka czeka na wyjaśnienie [15].

III. 1.4. Białko 1 związane z opornością wielolekową (MRP1)³

M _r	190 000
Wielkość cząsteczki	1531 reszt aminokwasowych
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	YCF1 (43%), YOR1 (33%), SUR (29%)

Komórki niektórych linii cechujące się opornością wielolekową nie przejawiają nadekspresji glikoproteiny P. W komórkach jednej z takich linii (drobno-komórkowej linii nowotworu płuca H69AR odpornej na doksorubicynę) zidentyfikowano inny transporter ABC, będący również pompą ksenobiotyków [7, 112]. Transporter ten nazwano białkiem związanym z opornością wielolekową (MRP); obecnie białko to jest określane jako MRP1. Białko 1 związane z opornością wielolekową występuje powszechnie w komórkach wszystkich badanych tkanek, w tym m.in. w erytrocytach [113]. Nadekspresja MRP1 powoduje, podobnie jak nadekspresja glikoproteiny P, oporność komórek na szereg leków stosowanych w terapii nowotworów (m.in. antracykliny, winkrystynę i etopozyd), a także (w przeciwieństwie do glikoproteiny P) na oksoaniony niektórych metali ciężkich (arsenu i antymonu) [114]. Stopień identyczności sekwencji MRP1 z glikoproteina P jest niski (15%) i odmienny wydaje się też być mechanizm działania obu białek. Stwierdzono, że MRP1 jest „pompą S-koniugatów glutationu” [75] transportując S-koniugaty glutationu i hydrofobowych ksenobiotyków [115-117] oraz utleniony glutation (disulfid glutationu) [118]. Substratami MRP1 są także siarczany i glukuroniany ksenobiotyków [119] [120], białko realizuje więc wszechstronnie końcowe komórkowe stadium detoksykacji ksenobiotyków w schemacie „kaftana bezpieczeństwa” (Ryc. 3). Największe podobieństwo sekwencji wiąże MRP1 z czynnikiem kadmowym 1 drożdży (*Yeast Cadmium Factor*, YCF1), białkiem transportującym S-koniugaty glutationu w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* [121] i czynnikiem oporności na oligomycynę (*Yeast Oligomycin Resistance*, YOR1), transporterem również podejrzewanym o transport S-koniugatów glutationu w tych komórkach [122].

Sugerowano, że MRP1 eksportuje antracykliny i inne leki przeciwnowotworowe w formie koniugatów z glutationem [117, 123]. Tworzenia takich koniugatów nie udało się jednak wykazać [120]. Być może ksenobiotyki są transportowane w formie nietrwałych niekowalencyjnych kompleksów z glutationem lub przenoszone na zasadzie symportu z glutationem [117, 124] (Ryc. 5), kwestia ta ciągle oczekuje rozstrzygnięcia. MRP1 transportuje S-koniugat glutationu i mykotoksyny aflatoksyny B₁, powstający w wyniku

metabolicznego utlenienia toksyny do epoksydów i sprzężenia 8,9-epoksydów aflatoksyny z glutationem. Białko transportuje również, choć znacznie mniej wydajnie, nieskoniugowaną aflatoksynę; szybkość tego transportu znacznie wzrasta w obecności glutationu [125]. Transport antracyklin przez MRP1 ulega znacznej stymulacji po dodaniu glutationu, a jego szybkość spada w następstwie obniżenia stężenia glutationu w komórkach [126]. Znane są wprawdzie substraty MRP1 (np. kalceina), których transport na pewno nie zależy od glutationu [127], są to jednak duże aniony organiczne, które mogą zajmować oba hipotetyczne miejsca wiążące w cząsteczce MRP1 (glutationowe i hydrofobowe; Ryc. 5). Głównym fizjologicznym substratem MRP1 wydaje się być leukotrien C₄, S-koniugat leukotrienu A₄ i glutationu, mediator zapalenia [75]. Myszy transgeniczne pozbawione MRP1 gorzej odpowiadają na bodźce zapalne [128]. Oczyszczone białko wykazuje aktywność ATPazową stymulowaną przez związki będące substratami transportu [129].

Struktura cząsteczki MRP1 była przedmiotem kontrowersji. Sugerowano, że odbiega ona od kanonu strukturalnego transporterów ABC: 6A6A (N-końiec-6 segmentów przezbłonowych-domena wiążąca ATP-6 segmentów przezbłonowych-domena wiążąca ATP-C-końiec) i odpowiada modelowi: 8A4A [112]. Nowsza interpretacja profilu hydrofobowości cząsteczki zakłada, że może on odpowiadać klasycznemu schematowi 6A6A z dodatkowym rejonem transbłonowym na N-końcu cząsteczki (czyli 6A6A; Ryc. 2)) [130] [131]. Podobnie jak w przypadku glikoproteiny P, glikozylacja nie wpływa na funkcje MRP1 [16]. Inhibitory kinazy białkowej C wydają się natomiast hamować aktywność MRP1 [132].

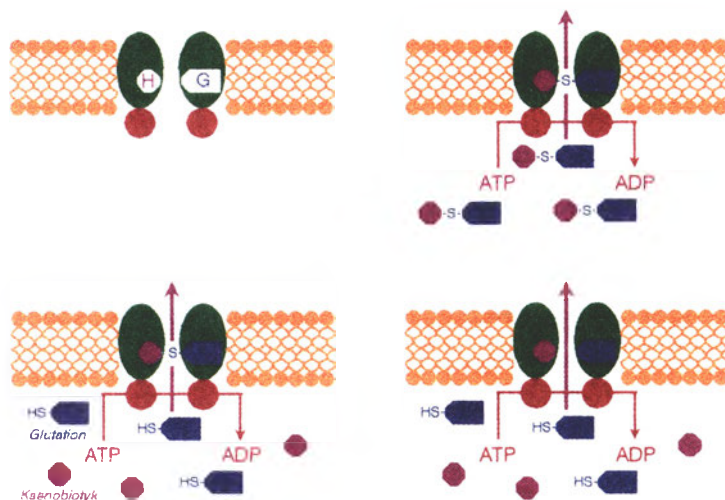
Ekspresja MRP1 w komórkach nowotworowych również często narasta w trakcie chemioterapii i to często przy niższych stężeniach leków niż w przypadku glikoproteiny P [133].

III. 1-5. Białko 2 związane z opornością wielolekową (MRP2)

M _r	190 000
Wielkość cząsteczki	1541 reszt aminokwasowych
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	MRP1 (48%), YCF1 (42%)

W wątrobie i nerkach występuje transporter MRP2 podobny do MRP1, dawniej określane również jako kanalikularny wielospecyficzny transporter anionów organicznych (*canalicular Multispecific Organic Anion Transporter*, cMOAT [21]. W wątrobie jest on zlokalizowany w regionach kanalikularnych błon hepatocytów i odpowiada za transport do żółci ksenobiotyków w formie koniugatów z kwasem glukuronowym i glutationem, a także dianionowych kwasów tłuszczowych i utlenionego glutationu [22]. Prawdopodobnie eks-

³ Patrz też: G. Bartosz: MRP: Nowy transporter wielolekowy. *Kosmos* 46: 129-136 (1997)



Ryc. 5. Różne koncepcje mechanizmu działania MRP1. Można przypuszczać (A), że białko to (podobnie jak S-transferazy glutationowe) ma dwa miejsca wiążące, oddziałujące z glutationem (G) i z hydrofobową resztą ksenobiotyku (H). Białko transportuje S-koniugaty glutationu (B) i może transportować niestabilne kompleksy ksenobiotyków z glutationem (C). Być może działa też na zasadzie symportu przenosząc ksenobiotyki razem z glutationem (D).

portuje również do żółci kompleksy niektórych metali (zwłaszcza kadmu) z glutationem [134], natomiast nie transportuje kwasów żółciowych, które są monoanionami [135]. W porównaniu z MRP1, MRP2 cechuje się większym powinowactwem do glukuronidów [136]. Skutkiem mutacji prowadzących do braku ekspresji tego transportera jest zespół Dubina-Johnsona, cechujący się podwyższoną zawartością glukuronianu bilirubiny w osoczu krwi i ciemnym (czarnym lub fioletowym) zabarwieniem wątroby [137]. Znane są dwie linie szczurów z analogicznym defektem [19-21]. W nerkach białko to występuje w apikalnych regionach komórek nabłonkowych kanalików proksymalnych; jego funkcją jest wydalanie koniugatów ksenobiotyków z krwi do moczu [138].

III. 1-6. Białka 3-6 związane z opornością wielolekową (MRP3-6)

Białko	% idynczności sekwencji 124 C-końcowych reszt z MRP1
MRP3	75
MRP4	60
MRP5	55
MRP6	58

Poszukiwania genów pokrewnych genom MRP1 doprowadziły do identyfikacji trzech nowych genów i odpowiadających im białek (MRP3-5). Najbardziej rozpowszechnione jest MRP5, którego ekspresję wykryto we wszystkich badanych tkankach, choć była ona na ogół niższa w porównaniu z MRP1. Najwyższą zawartość tego białka stwierdzono w mięśniach szkieletowych i w mózgu. Najwięcej MRP3 znaleziono w wątrobie, dwunastnicy, jelicie grubym i w nadnerczach. Poziom ekspresji MRP4 jest ogólnie niższy, wykryto je tylko w niektórych tkankach (płuca, nerki, pęcherz moczowy, pęcherzyk żółciowy, migdałki).

MRP6 jest białkiem złożonym z 1401 reszt aminokwasowych, wykazującym 45% idynczności sekwencji

z MRP1. Region 3' genu MRP6 jest prawie idynczny z genem kodującym hemitransporter ARA [54], który jest być może wariantem splajsingowym MRP6. Wydaje się, że białka MRP3-MRP6 mogą przyczyniać się do oporności wielolekowej i że mogą być eksporterami koniugatów ksenobiotyków [23].

III. 1-7. Typ krótki białka związanego z opornością wielolekową (SMRP)

Wielkość cząsteczki	946 reszt aminokwasowych
Wykazuje najwyższą idynczność sekwencji z:	YCF1 (40%)

W odpornej na cisplatynę linii komórek niedrobnokomórkowego raka płuc (PC-14/CDDP) zidentyfikowano krótszy homolog białka związanego z opornością wielolekową (*Short type of Multidrug Resistance Protein, SMRP*). Białko zawiera dwie domeny wiążące ATP i prawdopodobnie jest również pompą S-koniugatów glutationu. Cząsteczka SMRP ma 6 hydrofobowych regionów przezbłonowych pomiędzy oboma domenami wiążącymi ATP, lecz nie zawiera 12 N-końcowych regionów przezbłonowych dla MRP. Wysoką ekspresję białka stwierdzono w sercu, mózgu, jądrach i leukocytach krwi obwodowej [24].

III-2. Kanały jonowe, regulatory kanałów

III. 2-1. Białko mukowiscydozy (CFTR)⁴

Wielkość cząsteczki	1480 reszt aminokwasowych
Wykazuje najwyższą idynczność sekwencji z:	YCF1 (35%)

Mutacje genu kodującego to białko prowadzą do

⁴ Patrz też: J. B a l: Molekularne podłoże mukowiscydozy. *Post. Bioch* 37: 153 (1991); J. T y r a k o w s k i: Budowa i zaburzona funkcja kanału chlorkowego CFTR-biochemiczna analiza mukowiscydozy. *Post. Bioch.* 39: (1993).

mukowiscydozy [27]. Transporter zlokalizowany w apikalnych regionach komórek cechuje się bardzo długim (241 reszt aminokwasowych) rejonem łączącym, określanym jako domena regulatorowa (Ryc. 2) Białko to działa jako kanał chlorkowy o niskim przewodnictwie (5-8 pS), regulowany przez cAMP i ATP [25, 26, 28]. Otwarcie kanału wymaga fosforylacji domeny regulatorowej białka (R) przez kinazę białkową A. Hydroliza ATP przez jedną z domen wiążących ATP (N) jest konieczna do otwarcia kanału, podczas gdy wiązanie ATP do drugiego centrum wiążącego (C) stabilizuje kanał w stanie otwartym, a jego hydroliza prowadzi do zamknięcia kanału [139-141]. Fosforylacja przez kinazę białkową C jest również konieczna dla aktywacji kanału [142]. W myśl innej koncepcji sam CFTR nie jest kanałem, lecz reguluje aktywność kanału chlorkowego bądź też kanałów kationowych [143]. Podobieństwo CFTR do innych transporterów ABC zaangażowanych w aktywny transport substratów organicznych skłaniało wielu badaczy do przypuszczeń, że również CFTR aktywnie transportuje jakieś substancje [144], w szczególności mucynę [145] bądź ATP [146, 147]. Jedną z hipotez zakłada, że ATP eksportowany przez CFTR (i inne transportery ABC) aktywuje kanały chlorkowe (w czym mogą pośredniczyć receptory purynoergiczne) [148]. Takiego transportu ATP przez CFTR nie udało się jednak bezspornie wykazać [149]. Sugerowano również, że CFTR reguluje procesy egzo- i endocytozy, m.in. że jest konieczne dla zakwaszenia endosomów [143, 150].

III. 2-2. Nabłonkowy regulator przenikania chlorków (EBCR)

M _r	175 000
Wielkość cząsteczki	1564 reszty aminokwasowe
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	MRP1 (49%), CFTR (29%)

Białko to występuje w rejonach podstawno-bocznych komórek nabłonkowych segmentów nefronów zaangażowanych w resorpcję zwrotną chlorków, ale również jelita cienkiego i hepatocytów. W przeciwieństwie do CFTR nie ma domeny regulatorowej i konsensowej sekwencji substratowej dla kinazy białkowej A. Zaproponowany model topologiczny zakłada strukturę białka 8A4A. Nie jest jasne, czy białko samo jest kanałem chlorkowym czy też reguluje aktywność innego kanału [29]. Inna praca identyfikuje jednak EBCR z białkiem MRP2 [151]; być więc może od-

Ryc. 6. Kanał potasowy, którego częścią jest SUR, reguluje wydzielanie insuliny w komórkach β trzustki. Inhibicja kanału działaniem sulfonilomoczników prowadzi do depolaryzacji błony, co aktywuje kanał wapniowy umożliwiając napływ Ca^{2+} do komórki i stymuluje egzocytozę.

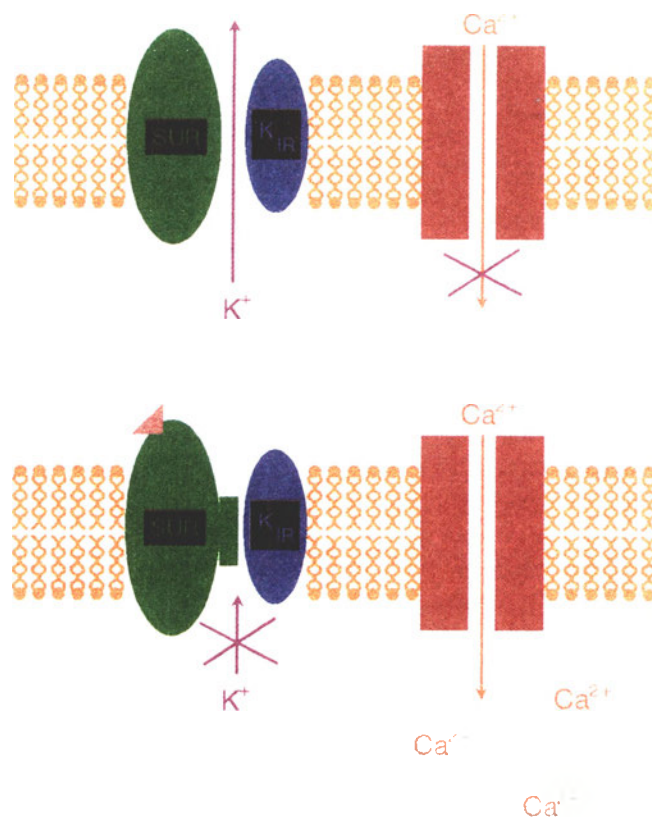
krywając EBCR poznano jedynie nową funkcję znanego już innego transportera ABC.

III. 2-3. Receptor sulfonilomoczników (SUR)

M _r	140 000—170 000
Lokalizacja genu	Chromosom 11p15.1

Wydaje się, że SUR jest podjednostką kanału potasowego regulowanego przez ATP obecnego w błonie plazmatycznej komórek β trzustki. Kanał ten kontroluje uwalnianie insuliny. Białko SUR jest kodowane przez gen zlokalizowany obok genu kodującego drugą podjednostkę kanału (białko $K_{IR}6.2$). Wartość potencjału spoczynkowego komórek β jest zbliżona do wartości odpowiadającej potencjałowi równowagi jonów K^+ (około -70 mV); podwyższenie stężenia glukozy indukuje zamknięcie kanału, depolaryzację błony plazmatycznej i otwarcie kanałów wapniowych. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} jest sygnałem do uwalniania insuliny drogą egzocytozy (Ryc. 6). Mutacje SUR prowadzą do hiperinsulinemicznej hipoglikemii niemowlęcej, choroby występującej zazwyczaj rzadko (średnio 1 przypadek na 50 000 osób), lecz częściej w niektórych populacjach arabskich (1 przypadek na 2 500 osób). Choroba przejawia się atakami ostrej hipoglikemii w kilka godzin po urodzeniu i czasami wymaga częściowej pankreatomii [30-32].

SUR wykazuje wysokie powinowactwo do sulfonilowych pochodnych mocznika, stosowanych w leczeniu cukrzycy insulinoniezależnej; w tym przypadku



blokowanie czynności kanału potasowego przez te związki jest korzystne, bowiem stymuluje uwalnianie insuliny i obniżenie stężenia glukozy we krwi [30]. Wydaje się, że struktura białka odpowiada modelowi 8A4A lub 9A4A [31].

III-3. Transportery o niejasnej jeszcze funkcji

III. 3-1. Transporter ABC1

M_r	230 000
Wykazuje wysoką identyczność sekwencji z:	produktem genu <i>ced-7</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>

Mysi odpowiednik transportera ABC1 człowieka występuje w embrionach szczególnie obficie w rejonach, w których zachodzi intensywna apoptoza. Blokowanie aktywności transportera przez przeciwciała upośledza fagocytozę makrofagów. Gen ABC1 wykazuje homologię sekwencji do genu *ced-7* nicienia *Caenorhabditis elegans*. Utrata funkcji genu *ced-7* upośledza usuwanie komórek ulegających apoptozie [152]. Być może transporter ten odgrywa więc rolę w usuwaniu ciałek apoptycznych [34]. Ekspresja ABC1 w oocytach *Xenopus laevis* wywołuje pojawienie się w błonach tych komórek funkcji transportera anionów, zależnej od cAMP i hamowanej przez sulfonilomoczniki [33]. Leki hamujące funkcję transportera ABC1 hamują również wydzielanie interleukiny β z monocytów i makrofagów, co sugeruje, że ABC1 może być odpowiedzialny za sekrecję białek nie posiadających sekwencji sygnałnej [36].

III. 3-2. Transporter ABC2

M_r	230 000
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	ABC1

Ulega ekspresji głównie w mózgu; jego funkcja jest nieznana [35].

III. 3-3. Transporter ABC3

Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	ABC1, ABC2 [37]
--	-----------------

Transporter ten wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z transporterami ABC1 i ABC2. Być może temu podobieństwu struktury odpowiada pokrewna funkcja, na razie czeka ona jednak na wyjaśnienie. Gen kodujący białko ABC3 znajduje się w sąsiedztwie genu, którego mutacje prowadzą do wielotorbielowej choroby nerki typu 1 (PKD1). Najwyższą jego ekspresję stwierdzono w płucach [37].

III. 3-4. Transporter ABC-C

Wielkość	1704 reszty aminokwasowe
Masa cząsteczkowa	191,36 kDa
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	ABC1 (myszy: 40%)

Gen kodujący ten transporter został wyizolowany z komórek C grasicy. Gen ten znajduje się w pobliżu genu MRP1; na tej podstawie sugerowano, że być może również rolą transportera ABC-C jest eksport ksenobiotyków. Najwyższą ekspresję transportera stwierdzono w płucach; stosunkowo wysoką także w mózgu, trzustce i mięśniach [38].

III. 3-5. Siatkóvkowy transporter ABC (ABCR)

M_r	240 000
Wielkość cząsteczki	2310 reszt aminokwasowych [153]
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	ABC1 (49% identyczności sekwencji) [153]

Mutacje tego białka prowadzą do choroby Stargarda — dziedzicznej recesywnej dystrofii plamki żółtej i zaniku widzenia centralnego u dzieci lub podobnej choroby siatkówki *fundus flavimaculatus*. Białko ABCR jest identyczne z białkiem obrzeża (*rim protein*) zlokalizowanego na obrzeżach zewnętrznych segmentów pręcików, o którym wiadomo, że ulega fosforylacji po naświetleniu komórek fotoreceptorowych [153]. Nie wiadomo, jaką funkcję pełni ono w siatkówce; przypuszczalnie transportuje jakieś cząsteczki do lub na zewnątrz komórek fotoreceptorowych [39]. W mysz innej sugestii ABCR moduluje poziom jonów Ca^{2+} w zewnętrznych segmentach pręcików [153].

IV. Transportery błon wewnątrzkomórkowych

IV-1. Transportery błon peroksysomów

IV. 1-1. Główny transporter peroksysomalny (PMP70)

M_r	70 000
Wielkość cząsteczki	659 reszt aminokwasowych
Masa cząsteczkowa	75,314 kDa
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	transporterami bakterii: HisP, MalK, OppD, PstB; glikoproteiną P[40]

Białko to jest jednym z głównych białek błon peroksysomów. Mutacje genu kodującego to białko prowadzą do zespołu Zellwegera, wrodzonego defektu

tworzenia peroksyosomów. Być może PMP70 bierze udział w imporcie białek do peroksyosomów; w myśl innej koncepcji jest aktywnym transporterem acylo-CoA [40, 41].

IV. 1-2. Białko adrenoleukodystrofii (ALDP)

M _r	70 000
Wielkość cząsteczki	745 reszt aminokwasowych
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	PMP70 (39%)

Mutacje genu kodującego to białko prowadzą do adrenoleukodystrofii (w dzieciństwie) lub adrenomieloneuropatii (u dorosłych), charakteryzujących się zaburzoną utlenianiem kwasów tłuszczowych o bardzo długich łańcuchach (ang. *very long chain fatty acids* – VLCFA, zwłaszcza kwasu heksakozanowego C26:0) w peroksyosomach i akumulacją tych kwasów. Na poziomie tkankowym skutkiem niedoboru ALDP jest demielinacja ośrodkowego układu nerwowego i niedoczynność nadnerczy [154]. Prawdopodobnie ALDP bierze udział w transporcie do peroksyosomów, nie wiadomo jednak, co transportuje; być może synteza ta VLCFA-CoA. Uważa się, że ALDP może tworzyć funkcjonalny dimer z PMP70 [42, 43].

Fibroblasty pochodzące od osób z adrenoleukodystrofią nie są w stanie utleniać VLCFA, jednak zdolność tę przywraca transfekcja genami ALDP lub PMP70 [155]. Nie obserwowano jednak ścisłej korelacji pomiędzy występowaniem mRNA dla ALDP i PMP70 w różnych regionach mózgu szczura podczas rozwoju zarodkowego [156], a i heterogenność objawów klinicznych braku ALDP sugerowała, że być może inne białka ABC oprócz PMP70 o ALDP mogą tworzyć funkcjonalne heterodimery pełniące istotne funkcje transportowe w błonach peroksyosomów. Białka takie rzeczywiście zostały znalezione (IV.1-3 — IV.1-4).

IV. 1-3. Białko związane z adrenoleukodystrofią (ALDRP)

Wielkość cząsteczki	740 reszt aminokwasowych
Masa cząsteczkowa	83,300 kDa
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	ALDP (ALDR myszy: 66% identyczności z ALDP)

To białko błon peroksyosomów występujące przede wszystkim w mózgu i mięśni sercowym, także w płucach, macicy, wątrobie, łożysku, grasicy, jelicie grubym, leukocytach lecz nie w fibroblastach może być partnerem ADLP w tworzeniu funkcjonalnego dimeru. Wydaje się, że poziom jego ekspresji może modyfikować kliniczny obraz adrenoleukodystrofii [44, 157].

IV. 1-4. Transporter PMP69

Wielkość cząsteczki	606 reszt aminokwasowych
Masa cząsteczkowa	68,6 kDa
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	Genem nr 1418480 <i>Caenorhabditis elegans</i> (38%); PMP 70 (28%), ALDP (26%)

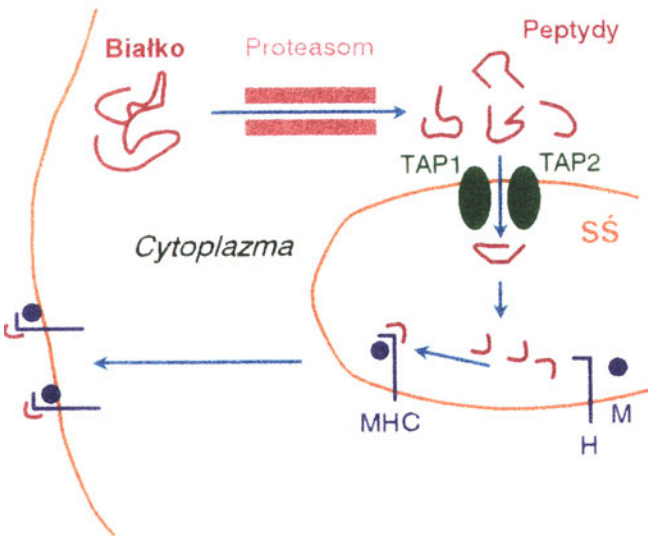
Białko to ulega ekspresji w wielu tkankach. Prawdopodobnie również ono może być partnerem heterodimerskim ALDP lub PMP70 [46].

IV-2. Transportery uczestniczące w procesie prezentacji antygenów

IV. 2-1. Transportery peptydów antygenowych (TAP)

Wielkość cząsteczki	TAP1: 808 reszt aminokwasowych [49] TAP2: 686 reszt aminokwasowych [50]
Masy cząsteczkowe	75 kDa (TAP1), 74 kDa (TAP2) [158, 159]
Wykazują najwyższą identyczność sekwencji z:	Transporterami MDL2 <i>S. cerevisiae</i> (36%) i CVAB <i>E. coli</i> (35%)

Cząsteczki głównych antygenów zgodności tkankowej klasy I (MHCI) prezentują antygeny peptydowe tworzone w wyniku degradacji części syntetyzowanych w komórce białek. Proces ten ma charakter konstytutywny i umożliwia komórkom T CD8⁺ eliminację komórek, w których zachodzi synteza nieprawidłowych białek (np. komórek zakażonych wirusami). Wiązanie peptydów antygenowych do cząsteczek MHCI ma miejsce w siateczce śródplazmatycznej, natomiast peptydy powstają w wyniku proteolizy zachodzącej w cytoplazmie. Konieczny więc jest ich transport do siateczki śródplazmatycznej, co jest udziałem TAP [160] (Ryc. 7). Transportery te zlokalizowane są w siateczce śródplazmatycznej i aparacie Golgiego. Dwa transportery TAP1 i TAP2 funkcjonują prawdopodobnie w formie heterodimerów. Oba występują w postaci kilku form allelicznych (TAP1 w czterech, a TAP2 w ośmiu) [161]. Transportują peptydy o długości 7-20 reszt aminokwasowych, choć mają największe powinowactwo do 8-14-peptydów [162]. Specyficzność TAP względem sekwencji peptydów jest cechą gatunkową; białka TAP człowieka cechuje mała wybiórczość [47]. Niedobór TAP prowadzi do poważnego upośledzenia odporności, jednym z jego następstw jest „zespół nagich limfocytów” charakteryzujący się brakiem cząsteczek MHCI na powierzchni komórek. Biosyntezę TAP indukuje interferon γ [163]. 88-aminokwasowe białko ICP47, którego biosyntezę wymusza wirus opryszczki



Ryc. 7. Funkcja białek TAP. TAP przenoszą do siateczki śródplazmatycznej (ŚŚ) peptydy powstające wskutek trawienia białek przez proteosomy. W świetle siateczki śródplazmatycznej peptydy ulegają dalszej obróbce, a następnie są przyłączane do cząsteczek głównego antygeny zgodności tkankowej (MHC) klasy I i w tej formie przenoszone na powierzchnię komórki; H — łańcuch ciężki MHC; M — β_2 -mikroglobulina.

ma wysokie powinowactwo do białek TAP i wiążąc się z nimi hamuje ich funkcję. Strategia ta ułatwia wirusowi rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza [164, 165].

Stwierdzono, że istnieje związek pomiędzy wzorem polimorfizmu TAP i zapadalnością na niektóre choroby takie jak choroba Gravesa [166], trąd i gruźlica [167]. Ostatnio zwrócono uwagę na nadekspresję TAP w komórkach niektórych linii nowotworowych wykazujących oporność wielolekową [168]. Czyżby transportery te mogły przyczyniać się do zjawiska oporności wielolekowej?

IV-3. Transportery metabolitów?

IV. 3-1. Transporter ABC8

M _r	72 000 [52]
Wielkość cząsteczki	638 reszt aminokwasowych [51]
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	transporterem White muszki <i>Drosophila</i> (34%) [52]

Oczy muszek owocowych *Drosophila* zawierają dwa rodzaje barwników: brązowe ommochromy, których prekursorem jest 3-hydroksykinurenina i czerwone lub żółte pterydiny, powstające z GTP. Prekursory tych barwników są transportowane przez białka ABC (*White*, *Brown* i *Scarlet*), które mają charakter hemitransporterów i funkcjonują jako dimery. Heterodimer *White/Brown* jest odpowiedzialny za import guaniny, a heterodimer *White/Scarlet* za transport tryptofanu [169]. Transporter ABC8 zidentyfikowany w komórkach u myszy i człowieka wykazuje homologię z biał-

kami transportującymi prekursor barwników *Drosophila*, szczególnie z transporterem *White*. Jego obecność stwierdzono w mózgu, grasicy, płucach, nadnerczach, śledzionie i makrofagach, lecz nie w wątrobie, nerkach, sercu i fibroblastach [51]. Funkcja transportera pozostaje zagadką, wydaje się jednak, że podobnie jak jego homolog *White* muszki owocowej może uczestniczyć w transporcie tryptofanu lub guaniny [52].

Transporter ABC8 ma odmienną od większości transporterów ABC strukturę: domena wiążąca ATP umiejscowiona jest w cząsteczce tego hemitransportera N-terminalnie w stosunku do regionu transbłonowego (struktura A6; Ryc. 2). Podobnie zbudowane są trzy hemitransportery prekursorów barwników wzrokowych *D. melanogaster* i transportery SNQ2 i PDR5 *S. cerevisiae* [51].

IV-4. Transportery ksenobiotyków?

IV.4-1. Białko związane z opornością na antracykliny (ARA)

Gen kodujący to białko zidentyfikowano w linii komórek białaczkowych (CCRF-CEM/E1000) wykazujących oporność wielolekową. Białko to wykazuje największe podobieństwo sekwencji do C-końcowej części MRP1, jednak w przeciwieństwie do MRP jest hemitransporterem, o masie cząsteczkowej 49,5 kDa w formie nieglikozylowanej; cząsteczka zawiera jedno potencjalne miejsce glikozylacji [54].

IV-5. Transportery o niejasnej jeszcze funkcji

IV. 5-1. Transporter ABC7

Wielkość cząsteczki	629 reszt aminokwasów
Wykazuje najwyższą identyczność sekwencji z:	HTM1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ATM1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Białko to ulega ekspresji w wielu tkankach (serce, mięśnie szkieletowe, trzustka, płuca, wątroba, łożysko; nie znaleziono go w mózgu). Funkcja transportera nie jest znana; homologia sekwencji z białkiem HTM1 warunkującym tolerancję *Schizosaccharomyces pombe* na metale ciężkie sugeruje, że on także może być związany z transportem jonów metali [53].

IV.5-2. Transporter EST45597

Ekspresja tkankowa tego hemitransportera odpowiada występowaniu transportera ABC7. Być może tworzy z nim heterodimery [53].

V. Niektóre kierunki badań transporterów ATP

Oczywistym nurtem badań transporterów ABC jest

identyfikacja nowych transporterów, określanie ich sekwencji, struktur wyższych rzędów, funkcji i właściwości. Badania transporterów ABC są przykładami badań, w których znacznie łatwiej uzyskać informację o sekwencji genów niż o funkcji kodowanych przez nie białek. Funkcje wielu transporterów oczekują dopiero wyjaśnienia. Uzyskane dane rodzą nowe pytania; molekularny mechanizm działania transporterów ABC pozostaje pasjonującą zagadką i oczekuje wyjaśnienia.

Zrozumiałe jest, że największe zainteresowanie budzą transportery ABC zaangażowane w oporność wielolekową. Prowadzone są intensywne badania zmierzające do stwierdzenia, czy pomiar poziomu ich ekspresji może mieć znaczenie prognostyczne [170] oraz do eliminacji czy osłabienia ich aktywności celem zwiększenia skuteczności terapii nowotworów [171-174]. Inny nurt badań dotyczy zwiększenia skuteczności działania leków kierowanych do ośrodkowego układu nerwowego [78]. Zahamowanie aktywności glikoproteiny P w jelicie winno zwiększać pochłanianie leków amfipatycznych, sugerowano więc podawanie takich leków razem z inhibitorami glikoproteiny P [82, 175]. Z drugiej strony, transfekcja przeszczepianych macierzystych komórek hemopoetycznych genami kodującymi eksportery ksenobiotyków P może umożliwić im przeżycie w organizmie dawcy poddanego chemioterapii [176].

Poszukiwanie homologów znanych transporterów ABC u innych organizmów ma znaczenie nie tylko dla zrozumienia dróg i mechanizmów ewolucji biochemicznej, lecz także aspekt praktyczny, bowiem białka te mogą mieć wkład w zjawiska oporności mikroorganizmów na leki [177, 178], a roślin na herbicydy [179, 180]. Transportery ABC budzą też zainteresowanie ekobiochemików zainteresowanych monitorowaniem skażeń chemicznych. Wzmoczenie aktywności białek ABC w zakresie transportu ksenobiotyków może być istotnym markerem ekspozycji organizmów na chemiczne skażenie środowiska [181].

Niewątpliwie w najbliższych latach możemy oczekiwać lawiny publikacji poświęconej tej fascynującej grupie białek.

Artykuł otrzymano 26 lutego 1998 r.
Zaakceptowano do druku 16 marca 1998 r.

Piśmiennictwo

- Ames GF-L (1986) *Annu Rev Biochem* **55**: 397-425
- Bakos E, Klein I, Welker E, Szabó K, Müller M, Sarkadi B, Váradi A (1997) *Biochem J* **323**: 777-783
- Dean M, Allikmets R (1995) *Curr Opin Genet Dev* **5**: 779-785
- Kuchler K, Sterne RE, Thorner J (1989) *EMBO J* **8**: 3973-3984
- Higgins CF (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113
- Decottignies A, Goffeau A (1997) *Nature Genet* **15**: 137-145
- Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M (1996) *Hum Mol Genet* **5**: 1649-1655
- Bellamy WT (1996) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 161-183
- Gottesman MM, Pastan I (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 385-427
- Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I (1995) *Annu Rev Biochem* **29**: 607-649
- Leveille-Webster CR, Arias IM (1995) *J Membrane Biol* **143**: 89-102
- Ruetz S, Gros P (1994) *Cell* **77**: 1071-1081
- van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G (1996) *Cell* **87**: 507-517
- Kere J, Ruutu T, Davies KA, Roninson IB, Watkins PC, Winqvist R, de la Chapelle A (1989) *Blood* **73**: 230-234
- Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V (1995) *Cancer Res* **55**: 2029-2034
- Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SPC, Deeley RG (1995) *Cancer Res* **55**: 102-110
- Cole SPC, Deeley RG (1993) *Science* **260**: 879
- Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama SI, Kuwano M (1996) *Cancer Res* **56**: 4124-4129
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, Bakker CTM, Otter M, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RPJ (1996) *Science* **271**: 1126-1128
- Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D (1996) *Biol Chem* **271**: 15091-15098
- Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu K, Shimizu T, Sugiyama Y (1997) *Am J Physiol* **272**: G16-G22
- Keppler D, König J (1997) *FASEB J* **11**: 509-516
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJT, Juijn JA, Baas F, Borst P (1997) *Cancer Res* **57**: 3537-3547
- Suzuki T, Nishio K, Sasaki H, Kurokawa H, Saito-Ohara F, Ikeuchi T, Tanabe S, Terada M, Saijo N (1997) *Biochem Biophys Res Comm* **238**: 790-794
- Bear CE, Li C, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR (1992) *Cell* **68**: 809-818
- Raviv Y, Pollard HB, Bruggemann EP, Pastan I, Gottesman MM (1990) *J Biol Chem* **265**: 3975-3980
- Tsui L-C (1992) *Hum Mutat* **1**: 197-203
- Welsh MI, Smith A, E Cell **73**: 1251-1254
- van Kujiack MA, van Aubel RAMH, Busch AE, Lang F, Russel FGM, Bindels RJM, van Os CH, Deen PMT (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5401-5406
- Aguilar-Bryan L, Bryan J (1996) *Diabetes Rev* **4**: 336-346
- Rajan AS, Aguilar-Bryan L, Nelson DA, Nichols CG, Wechsler SW, Lechago J, Bryan J (1993) *J Biol Chem* **268**: 15221-15228
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, IV, Boyd AE, III, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA (1995) *Science* **268**: 423-426
- Becq F, Hamon Y, Bajetto A, Gola M, Varrrier B, Chimini G (1997) *J Biol Chem* **272**: 2695-2699
- Luciani M-F, Chimini G (1996) *EMBO J* **15**: 226-235
- Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G (1994) *Genomics* **21**: 150-159
- Hamon Y, Luciani MF, Becq F, Varrrier B, Rubartelli A, Chimini G (1997) *Blood* **90**: 2911-2915
- Connors TD, van Raay TJ, Petry LR, Klinger KW, Landes GM, Burn TC (1997) *Genomics* **39**: 231-234
- Klugbauer N, Hofmann F (1996) *FEBS Lett* **391**: 61-65
- Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li Y, Anderson KL, Lewis RA, Nathans J, Lepert M, Dean M, Lupski JR (1997) *Nature Genet* **15**: 236-246
- Kamijo K, Taketani S, Yokota S, Osumi T, Hashimoto T (1990) *J Biol Chem* **265**: 4534-4540

41. Gartner J, Moser H, Valle D (1992) *Nature Genet* **1**: 16-23
42. Mosser J, Douar A-M, Sarde C-O, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka A-M, Mandel J-L, Aubourg P (1993) *Nature (Lond)* **361**: 726-730
43. Valle D, Gärtner J (1993) *Nature (Lond)* **361**: 682-683
44. Holzinger A, Kammerer S, Berger J, Roscher AA (1997) *Biochem Biophys Res Comm* **239**: 261-264
45. Savary S, Troffer-Charlier N, Gyapay G, Mattei M-G, Chimini G (1997) *Eur J Hum Genet* **5**: 99-101
46. Holzinger A, Kammerer S, Roscher AA (1997) *Biochem Biophys Res Comm* **237**: 152-157
47. Androlewicz MJ, Cresswell P (1996) *Immunity* **5**: 1-5
48. Lee JE, Loflin PT, Laud PR, Lu M, Reveille JD, Lawlor DA (1996) *Tissue Antigens* **47**: 117-121
49. Beck S, Kelly A, Radley E, Khurshid F, Alderton RP, Trowsdale J (1992) *J Mol Biol* **228**: 433-441
50. Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A (1990) *Nature (Lond)* **741**-744
51. Savary S, Denizot F, Luciani M-F, Mattei M-G, Chimini G (1996) *Mammalian Genome* **7**: 673-676
52. Croop JM, Tiller GE, Fletcher JA, Lux ML, Raab E, Goldenson D, Son D, Arciniegas S, Wu RL (1997) *Gene* **185**: 77-85
53. Savary S, Allikmets R, Denizot F, Luciani M-F, Mattei M-G, Dean M, Chimini G (1997) *Genomics* **41**: 275-278
54. Longhurst T, O'Neill GM, Harvie RM, Davey RA (1996) *Br J Cancer* **74**: 1331-1335
55. Kessel D, Botterill V, Vodinsky L (1968) *Cancer Res* **28**: 938-941
56. Juliano RL, Ling V (1976) *Biochim Biophys Acta* **455**: 152-162
57. Nooter K, Stoter G (1996) *Pathol Res Pract* **192**: 768-780
58. Levchenko A, Mehta BM, Spengler BA, Narkar AA, Fonti R, Biedler JL, Tsuruo T, Larson SM (1996) *Anal Biochem* **236**: 338-343
59. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS (1994) *Blood* **83**: 2451-2458
60. Ambudkar SV, Lelong IH, Zhang J, Cardarelli CO, Gottesman NM, Pastan I (1992) *Proc Natl Acad Sci* **89**: 8472-8476
61. Borgnia MJ, Eytan GD, Assaraf YG (1996) *J Biol Chem* **271**: 3163-3171
62. Shapiro AB, Ling V (1994) *J Biol Chem* **269**: 3745-3754
63. Schinkel AH, Smit JJ, Telligen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP (1994) *Cell* **77**: 491-502
64. Broxterman HJ, Pinedo HM, Kuiper CM, Schuurhuis GJ, Lankelma J (1989) *FEBS Lett* **247**: 405-410
65. Senior AE, Al-Shawi MK, Urbatsch IL (1995) *FEBS Lett* **377**: 285-289
66. Beck WT, Cirtain M (1982) *Cancer Res* **42**: 184-189
67. Ahmad S, Glazer RI (1993) *Mol Pharmacol* **43**: 858-862
68. Yang J-M, Chin K-V, Hait WN (1996) *Cancer Res* **56**: 3490-3494
69. Germann UA, Chambers TC, Ambudkar SV, Pastan I, Gottesmann MM (1995) *J Bioenergetics Biomembranes* **27**: 53-61
70. Thevenod F, Anderie I, Schulz I (1994) *J Biol Chem* **269**: 24410-24417
71. Valverde MA, Bond TD, Hardy SP, Taylor JC, Higgins CF, Altamirano J, Alvarez-Leefmans FJ (1996) *EMBO J* **15**: 4460-4468
72. Wu J, Zhang JJ, Koppel H, Jacob TJC (1996) *J Physiol* **491.3**: 743-755
73. Gill DR, Hyde SC, Higgins CF, Valverde MA, Mintenig GM, Sepulveda FV (1992) *Cell* **77**: 23-32
74. Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC, Higgins CF (1992) *Nature (Lond)* **355**: 830-833
75. Ishikawa T (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 463-468
76. Greenberger LM, Ishikawa Y (1994) *Trends Cardiovasc Med* **4**: 193-198
77. Tatsuta T, Naito M, Oh-hara T, Sugarawa I, Tsuruo T (1992) *J Biol Chem* **267**: 20383-20391
78. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CAAM, van Deemter L (1996) *J Clin Invest* **97**: 2517-2524
79. Ito S, Woodland C, Harper PA, Koren G (1993) *Life Sci* **53**: 25-31
80. Metherall JE, Li H, Waugh K (1996) *J Biol Chem* **271**: 2634-2640
81. Salmon SE, Dalton WS (1996) *J Rheumatol* **23, Suppl. 44**: 97-101
82. Borst P, Schinkel AH (1996) *Eur J Cancer* **32A**: 985-990
83. Borst P, Schinkel AH (1997) *Trends Genet* **13**: 217-222
84. Mangham DC, Cannon A, Komiya S, Gendron RL, Dunussi K, Gebhardt MC, Mankin HJ, Arceci RJ (1996) *Calcif Tissue Int* **58**: 186-191
85. Clifford SC, Neal DE, Lunec J (1996) *Carcinogenesis* **17**: 601-604
86. Higgins CF (1994) *Cell* **79**: 393-395
87. Roepe PD, Wei LY, Cruz J, Carlson D (1993) *Biochemistry* **32**: 11042-11056
88. Roepe PD (1994) *Trends Pharmacol Sci* **15**: 445-446
89. Roepe PD (1995) *Biochim Biophys Acta* **1241**: 385-406
90. Roepe PD, Wei LY, Hoffman MH, Fritz F (1996) *J Bioenerget Biomembranes* **28**: 541-555
91. Fisher GA, Lum BL, Hausdorff J, Sikic BI (1996) *Eur J Cancer* **32A**: 1082-1088
92. Eytan GD, Regev R, Assaraf YG (1996) *J Biol Chem* **271**: 3172-3178
93. Broxterman HJ, Lankelma J, Pinedo HM (1996) *Eur J Cancer* **32A**: 1024-1033
94. Homolya L, Holló Z, Germann UA, Pastan I, Gottesman MM, Sarkadi B (1993) *J Biol Chem* **268**: 21493-21496
95. Brezden CB, Hedley DW, Rauth AM (1994) *Cytometry* **17**: 343-348
96. Sarkadi BS, Müller M, Homoly Z, Holló Z, Sepordi J, Germann VA, Gottesman MM, Price EM, Baucher RC (1994) *FASEB J* **8**: 766-770
97. Gros P, Talbot F, Tang-Wai D, Bibi E, Kaback HR (1992) *Biochemistry* **31**: 1992-1998
98. Sharom RC, Inoue S, Roitelman J, Schimke RT, Simoni RD (1992) *J Biol Chem* **267**: 5731-5734
99. Sharom FJ, DiDiodato G, Yu X, Ashbourne JD (1995) *J Biol Chem* **270**: 10334-10341
100. Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R (1992) *J Biol Chem* **267**: 24248-24252
101. van Kalken CK, Broxterman HJ, Pinedo HM, Feller N, Dekker H, Lankelma J, Giaccone G (1993) *Br J Cancer* **67**: 284-289
102. Ford JM, Hait WN (1993) *Cytotechnology* **12**: 171-212
103. Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4001-4005
104. Gupta S (1995) *Clin Pharmacol* **7**: 19-29
105. Piwnica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Kronauge JF, Kramer RA, Croop JM (1993) *Cancer Res* **53**: 1-8
106. Luker GD, Fracasso PM, Dobkin J, Piwnica-Worms D (1997) *J Nucl Med* **38**: 369-372
107. Sharom FJ (1997) *Biochem Soc Trans* **25**: 1088-1095
108. Sinicrope FA, Dudeja PK, Bissonnette BM, Safa AR, Brasitus TA (1992) *J Biol Chem* **267**: 24995-25002
109. Smit JJM, Schinkel AH, Mol CAAM, Majoor D, Mooi WJ, Jongsma APM, Lincke CR, Borst P (1994) *Lab Invest* **71**: 638-649
110. Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, Ottenhoff R, van der Lugt NMT, van Rooon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P (1993) *Cell* **75**: 451-462
111. Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S, Bernard O, Hadchouel M (1996) *Hepatology* **23**: 904-908
112. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley RG (1992) *Science* **258**: 1650-1654
113. Pułaski Ł, Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Keppler D (1996) *Eur J Biochem* **241**: 644-648

114. Cole SCP, Sparks KE, Frasher K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG (1994) *Cancer Res* **54**: 5902-5910
115. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SPC, Deeley RG, Keppler D (1994) *J Biol Chem* **269**: 27807-27810
116. Müller M, Meijer C, Zaman GJR, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EGE, Jansen PLM (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 13033-13037
117. Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SPC (1996) *J Biol Chem* **271**: 9675-9682
118. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SPC, Deeley RG, Keppler D (1996) *Biochem J* **314**: 433-437
119. Loe DW, Almquist KC, Deeley RG (1996) *J Biol Chem* **271**: 9683-9689
120. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D (1996) *Cancer Res* **56**: 988-994
121. Li Z-S, Szczycka M, Lu Y-P, Thiele DJ, Rea PA (1996) *J Biol Chem* **271**: 6509-6517
122. Cui Z, Hirata D, Tsuchiya E, Osada H, Miyakawa T (1996) *J Biol Chem* **271**: 14712-14716
123. Versantvoort CHM, Broxterman HJ, Bagrij T, Scheper RJ, Twentyman PR (1995) *Br J Cancer* **72**: 82-89
124. Rappa G, Lorico A, Flavell RA, Sartorelli AC (1997) *Cancer Res* **57**: 5232-5237
125. Loe DW, Stewart RK, Massey TE, Deeley RG, Cole SP (1997) *Mol Pharmacol* **51**: 1034-1041
126. Twentyman PR, Versantvoort CHM (1996) *Eur J Cancer* **32A**: 1002-1009
127. Feller N, Broxterman HJ, Währer DCR, Pinedo HM (1995) *FEBS Lett* **368**: 385-388
128. Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CAAM, Zaman GJR, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, Borst (1997) *Nature Med* **3**: 1275-1279
129. Chang XB, Hou YX, Riordan JR (1997) *J Biol Chem* **272**: 30962-30968
130. Bakos E, Hegedüs T, Holló Z, Welker E, Tusnády GE, Zaman GJR, Flens MJ, Varadi A, Sarkadi B (1996) *J Biol Chem* **271**: 12322-12326
131. Stride BD, Valdimarsson G, Gerlach JH, Wilson GM, Cole SPC, Deeley RG (1996) *Mol Pharmacol* **49**: 962-971
132. Ma L, Krishnamachary N, Center MS (1995) *Biochemistry* **34**: 3338-3343
133. Loe DW, Deeley RG, Cole SPC (1996) *Eur J Cancer* **32A**: 945-957
134. Sugawara N, Lai Y-R, Arizono K, Ariyoshi T (1996) *Toxicology* **112**: 87-94
135. Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B, Meier PJ (1997) *FEBS Lett* **406**: 75-78
136. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D (1997) *Biochem J* **327**: 305-310
137. Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D (1996) *Hepatology* **23**: 1061-1066
138. Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D (1997) *J Am Soc Nephrol* **8**: 1213-1221
139. Baukowitz T, Hwang TC, Naim AC, Gadsby DC (1994) *Neuron* **12**: 473-482
140. Gunderson KL, Kopito RR (1995) *Cell* **82**: 231-239
141. Jentsch TJ, Günther W (1997) *Bio Essays* **19**: 117-126
142. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE (1991) *Cell* **66**: 1027-1036
143. Greger R, Mall M, Bleich M, Ecke D, Warth R, Riedemann N, Kunzelmann K (1996) *J Mol Med* **74**: 527-534
144. Wersto RP, Rosenthal ER, Crystal RG, Spring KR (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1167-1172
145. Montserrat C, Merten M, Figarella C (1996) *FEBS Lett* **393**: 264-268
146. Prat AG, Reisin IL, Ausiello DA, Cantiello HF (1996) *Am J Physiol* **270**: C538-C545
147. Abraham EH, Okunieff P, Scala S, Vos P, Oosterveld MJS, Chen AY, Shrivastav B, Guidotti G (1997) *Science* **275**: 1324-1325
148. Al-Awqati Q (1995) *Science* **269**: 805-806
149. Reddy MM, Quinton PM, Haws C, Wine JJ, Grygorczyk R, Tabcharani JA, Hanrahan JW, Gunderson KL, Kopito RR (1996) *Science* **271**: 1876-1879
150. Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Grunert D, Al-Awqati Q (1991) *Nature (Lond)* **352**: 70-73
151. van Kuijk MA, Kool M, Merckx GF, Geurts van Kessel A, Bindels RJ, Deen PM, van Os CH (1997) *Cytogenet Cell Genet* **77**: 285-287
152. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR (1991) *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-698
153. Azarian SM, Travis GH (1997) *FEBS Lett* **409**: 247-252
154. Braun A, Ambach H, Kammerrer S, Rolinski B, Stockler S, Rabl W, Gartner J, Zierz S, Roscher AA (1995) *Am J Hum Genet* **56**: 854-861
155. Braiterman LT, Zheng S, Watking PA, Geraghty MT, Johnson G, McGuinness MC, Moser AB, Smith KD (1998) *Hum Mol Genet* **7**: 239-247
156. Pollard H, Moreau J, Aubourg P (1995) *J Neurosci Res* **42**: 433-437
157. Lombard-Platet G, Savary S, Sarde CO, Mandell JL, Chimini G (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1265-1269
158. Kelly A, Powis S, Kerr L-A, Mockridge I, Elliott T, Bastin J, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Trowsdale J, Townsend A (1992) *Nature (Lond)* **355**: 641-644
159. Spies T, Cerundolo V, Colonna M, Cresswell P, Townsend A, DeMars R (1992) *Nature (Lond)* **355**: 644-646
160. Neefjes JJ, Momburg F (1993) *Curr Opin Immunol* **5**: 27-34
161. Momburg F, Armandola EA, Post M, Hämmeling GJ (1996) *J Immunol* **156**: 1756-1763
162. Heemels M-T, Ploegh H (1995) *Annu Rev Biochem* **64**: 463-491
163. Monaco JJ, Nandi D (1995) *Annu Rev Genetics* **29**: 729-754
164. Ahn K, Meyer TH, Uebel S, Sempé P, Djaballah H, Yang Y, Peterson PA, Früh K, Tampé R (1996) *EMBO J* **15**: 3247-3255
165. Tomazin R, Hill AB, Jogovic P, York I, van Endert P, Ploegh HL, Andrews DW, Johnson DC (1996) *EMBO J* **15**: 3256-3266
166. Rau H, Nicolay A, Usadel KH, Finke R, Donner H, Walfish PG, Badenhop K (1997) *Tissue Antigens* **49**: 16-22
167. Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK (1997) *Tissue Antigens* **49**: 168-172
168. Izquierdo MA, Neefjes JJ, Mathari AEL, Flens MJ, Scheffer GL, Scheper RJ (1996) *Br J Cancer* **74**: 1961-1967
169. Summers KM, Howells AJ, Pylotis NA (1982) *Adv Insect Physiol* **16**: 119-166
170. Pinedo HM, Giaccone G (1995) *New Engl J Med* **333**: 1417-1419
171. Ford JM (1995) *Hematol Oncol Clin North America* **9**: 337-361
172. Bouffard DY, Ohkawa T, Kijima H, Irie A, Suzuki T, Curcio LD, Holm PS, Sassani A, Scanlon KJ (1996) *Eur J Cancer* **32A**: 1010-1018
173. Kavallaris M (1997) *Anti-Cancer Drugs* **8**: 17-25
174. Germann UA, Harding MW (1995) *J Natl Cancer Inst* **87**: 1573-1575
175. Leveque D, Jehl F (1995) *Anticancer Res* **15**: 331-336
176. Baudard M, Pastan I, Gottesman MM (1996) *Eur J Cancer* **23A**: 1019-1023
177. Dallagiovanna B, Gamarro F, Castanys S (1996) *Mol Biochem Parasitol* **75**: 145-157
178. Prasad R, Murthy SK, Gupta V, Prasad R (1995) *Acta Biochim Pol* **42**: 497-504
179. Tommasini R, Vogt E, Schmid J, Fromentau M, Amrhein N, Martinoia E (1997) *FEBS Lett* **411**:

Krypty: zapomniane organelle ponownie odkryte

Vaults: forgotten organelles rediscovered

ŁUKASZ PUŁASKI*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Odkrycie i występowanie krypt
- III. Skład i ultrastruktura krypt
- IV. Spekulacje na temat roli krypt
- V. LRP a krypty
- VI. Przyszłość badań krypt

Wykaz stosowanych skrótów: ABC — domena wiążąca ATP (*ATP-binding cassette*); LRP — białko związane z opornością w płucach (*lung resistance-related protein*); MVP — główne białko krypt (*major vault protein*); NPC — kompleks poru jądowego (*nuclear pore complex*); SRP — cząstka rozpoznająca sekwencję sygnałową (*signal recognition particle*); RNP — rybonukleoproteiny; vRNA — kryptowy RNA (*vault RNA*).

I. Wstęp

W okresie od lat sześćdziesiątych do początku lat osiemdziesiątych nastąpił wielki postęp w cytologii ultrastrukturalnej. Rozwój technik mikroskopii elektronowej pozwolił na odkrycie i opisanie wielu dotąd nieznanymi organelli. Intensywnie by badane były przy tym na przykład cząstki rybonukleoproteinowe (RNP). Najdawniej znanymi i najdokładniej zbadanymi spośród nich są rybosomy. Inne, jak na przykład cząstki rozpoznające sekwencje sygnałowe (*signal recognition particles*, SRP) [1], zostały na początku lat osiemdziesiątych odkryte i opisane pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Tymczasem kilkakrotnie większe od rybosomów nukleoproteinowe organelle — krypty — odkryto dopiero w 1986 r. [2]. Jednakże mimo ich powszechnego i masowego występowania trudno było przypisać im jakąkolwiek funkcję biologiczną, przez co zainteresowanie nimi spadło. Dopiero ostatnio te interesujące i niesłusznie zapomniane organelle wracają do łask dzięki szczęśliwemu zbiegowi okoliczności.

* Mgr, Katedra Biofizyki Molekularnej UŁ ul. St. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Contents:

- I. Introduction
- II. Discovery and distribution of vaults
- III. Biochemistry and ultrastructure of vaults
- IV. Speculation on the role of vaults
- V. LRP and vaults
- VI. Future of vault studies

II. Odkrycie i występowanie krypt

Jak wiele odkryć w biologii, odkrycie krypt nastąpiło przypadkiem. Zespół prof. Leonarda R o m e z University of California w Los Angeles od wczesnych lat osiemdziesiątych zajmował się izolowaniem i badaniem różnych subpopulacji pęcherzykowych organelli komórkowych, głównie pęcherzyków opłaszczonych klatryną (*coated vesicles*). W połowie lat osiemdziesiątych opracowano tam nową metodę izolowania i rozdzielania pęcherzyków opłaszczonych klatryną poprzez preparatywną elektroforezę w bardzo luźno usieciowanym (0.15%) żelu agarozowym [3]. W najszybciej migrującej frakcji pęcherzyków z szczurzych hepatocytów zaobserwowano pod mikroskopem elektronowym dziwne zanieczyszczenia: wysoce regularne, jajowate cząstki, nieco mniejsze od samych pęcherzyków, ale za duże na rybosomy. Modyfikacja procedury izolowania (zwiększenie stężenia agarozy do 0.25%, wstępne oczyszczanie poprzez wirowanie w gradiencie gęstości) pozwoliła na otrzymanie oczyszczonego preparatu tych cząstek [2]. Przy większym powiększeniu można było zaobserwować charakterystyczną morfologię „beczki z okienkami”. Należało rozstrzygnąć kwestię, czy odkryto nieznanne dotąd organelle komórkowe, współczyszczane w zastosowanej procedurze z pęcherzykami opłaszczonymi klatryną, czy też są to fragmenty lub monomery prekursorów opłaszczonych pęcherzyków. Mimo pewnych przesłanek wspierających tę drugą hipotezę (występowanie w nowo odkrytych cząstkach białka o masie ok. 100 kDa, podobnie jak w pęcherzykach opłaszczonych klatryną, oraz

morfologia podobna do płaszcza klatrynowego [4] wykluczono jednak tę możliwość. Koronnym argumentem potwierdzającym odkrycie nieznanych uprzednio organelli był brak immunoreaktywności surowicy poliklonalnej przeciwko oczyszczonemu preparatowi nowo wyizolowanych cząstek z opłaszczonymi pęcherzykami, a zwłaszcza ich białkami o masie ok. 100 kDa [2].

Nowo odkrytym organellom nadano nazwę „krypty” (*vaults*), jako że morfologia powtarzających się łuków przypominała odkrywcom strukturę sklepienia krypt gotyckich kościołów¹. Stwierdzono, że można stosując tylko nieznaczne modyfikacje procedury wyizolować krypty z komórek wielu typów i pochodzących z różnych organizmów, przy czym ich morfologia w każdym wypadku wydaje się jednakowa. Przyczyną tak późnego odkrycia powszechnie występujących i dużych organelli był fakt, iż barwniki do barwienia pozytywnego przy transmisyjnej mikroskopii elektronowej, na przykład tlenek osmu czy octan uranylu, mają wysokie powinowactwo do składników lipidowych i nukleinowych. Krypty jako organelle w ponad 90% białkowe wybarwiają się nimi bardzo słabo i są praktycznie niewidzialne w konwencjonalnie barwionych preparatach. Uwidocznić je można dopiero poprzez negatywowe barwienie (czyli barwienie tła) oczyszczonych preparatów.

Poza hepatocytami szczura, gdzie krypty odkryto, udało się je wyizolować z następujących rodzajów komórek i organizmów: ludzkich fibroblastów, mysich fibroblastów 3T3 i komórek glejowych, króliczych makrofagów alveolarnych [2], hepatocytów wołu, kury, żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) i żaby ryczącej (*Rana catesbaeiana*) [5], jak również jaj i rozwijających się zarodków jeżowca *Lytechinus pictus* [6] i wegetatywnego (ameboidalnego) stadium rozwojowego śluzowca *Dictyostelium discoideum* [5, 7]. Ponadto metodami immunologicznymi potwierdzono obecność białek krypt w licznych tkankach i liniach komórek człowieka, szczura, psa, myszy i kota pochodzenia fibroblastycznego, nabłonkowego i mieloidalnego [5, 8], oraz u kury, żab [8], drętwy *Discopyge ommata* [9], jeżowca [6], muszki owocowej [8] i *Dictyostelium* [7].

Liczebność krypt w różnych typach komórek nie jest jednakowa: najwyższy ich poziom stwierdzono u ssaków w komórkach nabłonkowych i makrofagach [5, 8]. Stosunkowo duża ilość krypt w komórkach mikrogleju (mózgowych makrofagach) szczura pozwoliła traktować białka krypt jako markery mikrogleju, co wykorzystano w badaniach profilu rozwojowego tych komórek [10].

Subkomórkowa lokalizacja krypt (na drodze frakcjonowania organelli oraz badań immunocytochemi-

cznych) wykazała, że krypty są przede wszystkim organellami cytoplazmatycznymi, rozproszonymi w cytosolu [2, 5, 8, 11]. Czasem układają się w grona na końcach mikrofilamentów aktynowych [12]. Niewielka proporcja (ok. 5%) krypt izolowana jest we frakcji jądrowej, przy czym podlegają one najprawdopodobniej asocjacji z otoczką jądrową, koncentrując się w okolicach porów jądrowych [13]. Jedynie w dojrzałych komórkach somatycznych jeżowca *Lytechinus pictus* stwierdzono krypty wewnątrz jądra, zwłaszcza w jąderku [6].

III. Skład i ultrastruktura krypt

Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z SDS oczyszczonego preparatu krypt z wątroby szczura wykazała ilościową dominację pojedynczego białka o masie cząsteczkowej 104 kDa. Białko to, nazwane głównym białkiem krypt (*major vault protein*, MVP), stanowi ponad 70% białka w kryptach i w elektroforezie dwuwymiarowej zachowuje się jak pojedynczy polipeptyd o pI około 6.3 [2]. Poza tym białkiem krypty z hepatocytów szczura zawierają jeszcze trzy frakcje białkowe (Tab. 1) oraz składnik o masie cząsteczkowej 37 kDa, nie barwiący się błękitem Coomassie i niepodatny na trawienie proteazami, który okazał się krótkim kwasem rybonukleinowym. Żaden z białkowych składników krypt nie wydaje się być glikoproteiną. W kryptach nie wykryto ani śladu fosfolipidów, co potwierdza ich odrębność od organelli pęcherzykowych, z którymi często są izolowane.

Skład biochemiczny krypt wykazuje konserwatywny ewolucyjny: u wszystkich zbadanych pod tym względem organizmów większość stanowi w nich jeden rodzaj białka, nazywany zawsze głównym białkiem krypt lub MVP. Wyjątkiem jest tu *Dictyostelium*, u którego stwierdzono aż trzy rodzaje głównych białek krypt [7, 14]. Ponadto krypty zawierają zawsze jeden lub dwa rodzaje małego RNA, określanego mianem vRNA, czyli kryptowy RNA [11].

Budowa pierwszorzędowa głównych białek krypt jest bardzo podobna u różnych organizmów — wszystkie mają masę około 100 kDa. Sklonowano do tej pory główne białka krypt szczura [15], człowieka [16], drętwy [17] oraz dwa z trzech głównych białek krypt *Dictyostelium* [7, 14]. Ludzkie główne białko krypt wykazuje 88% identyczności aminokwasowej ze szczurzym i aż 60% z jednym z głównych białek krypt *Dictyostelium* [16]. Co interesujące, dwa z głównych białek krypt *Dictyostelium* są również identyczne jedynie w 60%, co wskazuje, że prowadząca do powstania dwóch genów duplikacja zaszła na bardzo wczesnym etapie ewolucyjnym [11, 14]. Białkowe składniki krypt niektórych organizmów wymieniono i scharakteryzowano w tabeli 1.

Geny kryptowego RNA szczura, myszy, człowieka i żaby ryczącej zostały sklonowane i zsekwencjonowane [11, 18] (patrz Tab. 2). U szczurów vRNA stanowi

¹ Mimo iż kontekstowo poprawniejsze byłoby tłumaczenie *vault* jako „sklepienie”, zdecydowałem się na „kryptę”, ponieważ poza lepszym brzmieniem w języku polskim słowo to wywołuje zgodne z intencjami autorów nazwy konotacje pomieszczenia, zamkniętej przestrzeni.

Tabela 1.

Poznane składniki białkowe krypt u niektórych organizmów.

Organizm	Składnik	Masa cząsteczkowa (kDa)	Źródło
Śluzowiec	Główne białko kryptowe MvpA	94	[7]
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Główne białko kryptowe MvpB	92	[7, 14]
	Główne białko kryptowe MvpC	92	[14]
Drewno <i>Discopyge</i>	Główne białko kryptowe MVP100	100	[9, 17]
Szczur	Główne białko kryptowe MVP	99	[2, 15]
	Dodatkowe białko kryptowe	210	[2]
	Dodatkowe białko kryptowe	192	[2]
	Dodatkowe białko kryptowe	54	[2]
Człowiek	Główne białko kryptowe	100	[16]

około 5% masy całej krypty, a obliczenia stechiometryczne wykazują, że jest obecny w około 18 kopiach na kryptę [2]. Przeciwnie niż w innych cząstkach rybonukleoproteinowych, RNA nie wydaje się mieć znaczącej roli strukturalnej w kryptach, jako że nawet całkowite strawienie vRNA nukleazami nie ma wpływu na morfologię izolowanej organelli [2, 11]. Struktura drugorzędowa vRNA wykazuje większy konserwatyzm ewolucyjny niż struktura pierwszorzędowa.

Wykazano, że w komórce główne białko krypt wchodzi wyłącznie w skład krypt, nie występując we frakcji rozpuszczalnej cytosolu [2, 5]. W przeciwieństwie do niego vRNA stwierdzono również w postaci nie związanej w cytoplazmie. W różnych stanach komórki jego zawartość w kryptach i we frakcji rozpuszczalnej może się zmieniać [18]. Nie jest znana rola wolnego vRNA i ewentualny mechanizm jego odłączania się od krypt i ponownego przyłączenia.

Właściwości transkrypcyjne vRNA poznano na przykładzie szczurzego genu, który zawiera sekwencje promotorowe charakterystyczne dla genów typu 2 transkrybowanych przez polimerazę RNA III, takich jak na przykład geny tRNA [18, 19]. Typowa dla tych genów jest rozszczepiona sekwencja promotorowa,

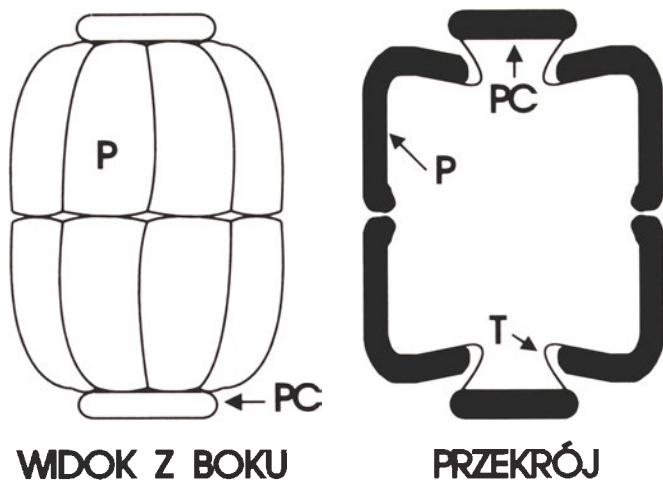
składająca się z dwóch jednostek o długości ok. 10 par zasad, zwanych *A-box* i *B-box*, umieszczonych w obrębie sekwencji transkrybowanej. Gen vRNA zawiera dwie sekwencje typu *B-box*, przy czym pierwsza z nich używana jest preferencyjnie. W systemie transkrypcji *in vitro* vRNA jest wydajnie transkrybowane przez polimerazę RNA III, przy czym sekwencje *B-box* wiążą czynniki transkrypcyjne TFIIC i TFIIB, inicjując transkrypcję. Jednak w przypadku vRNA ważna jest także obecność sekwencji nietranskrybowanej od strony 5', bez której transkrypcja nie zachodzi (nie ma to natomiast wpływu na transkrypcję innych genów typu 2). Przy wysokich stężeniach czynników transkrypcyjnych lub przy nieobecności sekwencji od strony 5' następuje destabilizacja wiązania czynnika transkrypcyjnego TFIIC do *B-box*, co sugeruje dla vRNA nieznan dotychczas sposób regulacji aktywności genu. Bezpośrednim efektem tego faktu jest zapewne zróżnicowana ekspresja tkankowa vRNA, zjawisko nietypowe dla rodzajów RNA transkrybowanych przez polimerazę RNA III. Narządami o wysokim poziomie vRNA są śledziona, jelito, serce i nerka, a w mózgu jest go wyjątkowo mało [11, 18].

Krypty to największe ze znanych cząstek rybonuk-

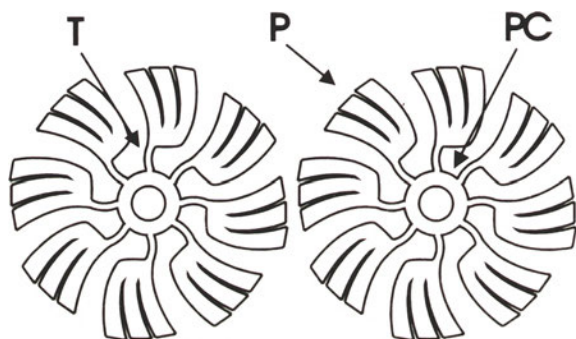
Tabela 2.

Poznane składniki rybonukleinowe krypt u niektórych organizmów.

Organizm	Składnik	Długość (liczba par zasad)	Źródło
Żaba rycząca	Kryptowe RNA vRNAa	89	[18]
	Kryptowe RNA vRNAb	94	[18]
Mysz	Kryptowe RNA vRNA	141	[11]
Szczur	Kryptowe RNA vRNA	141	[18]
Człowiek	Kryptowe RNA vRNAa	~ 80	[11]
	Kryptowe RNA vRNAb	96	[11]



KRYPTA ZAMKNIĘTA



KRYPTA OTWARTA

Ryc. 1. Struktura zamkniętej i otwartej krypty. P — płatek, T — trzonek, PC — pierścień centralny. Otwarta krypta składa się z dwóch części („pół-krypt”) o rozpostartych płatkach. Płatki zamykając się w kubkowaną strukturę i łącząc z czubkami tworzą zamkniętą kryptę w kształcie beczki (na podstawie [8, 11, 20]).

leoproteinowych [8]. Ich wymiary w zależności od techniki uwidaczania pod mikroskopem elektronowym (barwienie negatywowe lub mikroskopia krio-elektronowa) wahają się w granicach $50-55 \times 26-35$ nm i są jednakowe u wszystkich badanych gatunków. Średnia masa cząsteczkowa jednej krypty wynosi 12.9 MDa, stała sedymentacyjna wyznaczona przez wirowanie gradientowe — około 150S. W izolowanych preparatach jawią się jako symetryczne, jajowato-baryłkowate twory o dwóch jednakowych połowach przypominających razem „beczkę z klepek” lub „żebrowane ostrołukowe sklepienie” (Ryc. 1) [2, 8].

Badanie krypt techniką *freeze-etch* i uwydatniania szczegółów cieniowaniem platynowym pozwoliło na bardzo szczegółowe opisanie ich ultrastruktury [8, 20]. Na płaszczyźnie z pokrytej polilizyną miki krypty otwierały się w skomplikowane i delikatne struktury o symetrii ośmiopromiennej w kształcie „ośmiopłatkowych kwiatków” (Ryc. 1), przy czym struktury takie występowały zazwyczaj w parach, co sugeruje, że

w stanie zamkniętym „kwiatek” ma wygięte do środka płatki i stanowi połowę krypty. Każdy „kwiatek” składa się z ośmiu prostokątnych płatków, połączonych z centralnym pierścieniem krótkim i cienkim trzonkiem. Płatki składają się przy tym z trzech niezbyt wyraźnie widocznych podłużnych pasów. Nie wiadomo, czy krypty otwierają się i zamykają *in vivo*. Preparaty krypt *Dictyostelium* zawierają jednak duży procent „pół-krypt”, widocznych pod mikroskopem jako otwarte „kwiatki” [5, 20]. Prawdopodobna wydaje się hipoteza, według której dwie połowki krypt mogłyby się łączyć i zamykać, stykając się czubkami płatków i tworząc w swoim wnętrzu zamkniętą przestrzeń.

Na podstawie danych stechiometrycznych wysnuto wstępne hipotezy na temat umiejscowienia poszczególnych składników biochemicznych krypt w ich strukturze. Płatki zbudowane są prawdopodobnie z głównego białka krypt, które występując w kryptcie najobficiej mogłoby tworzyć ten jej największy element. Ponieważ jedna krypta zawiera około 96 kopii cząsteczki głównego białka krypt, jeden płatek składa się zapewne z sześciu cząsteczek głównego białka krypt (zapewne w postaci trzech dimerów ułożonych w pasy). Pozostałe białka krypty mogłyby tworzyć centralny pierścień i cienkie trzonki płatków. Jedna cząsteczka vRNA związana jest prawdopodobnie z jednym płatkem, nie odgrywając jednak w nim roli strukturalnej, o czym wspomniano wyżej [8, 11, 20].

IV. Spekulacje na temat roli krypt

Początkowe hipotezy na temat roli biologicznej krypt były oparte na wąskim eksperymentalnym materiale dowodowym. Jako organelle występujące powszechnie i mające podobną budowę i skład u ewolucyjnie bardzo od siebie odległych organizmów, krypty pełnią zapewne podstawowe, nieodzowne dla wszystkich komórek funkcje. Na podstawie okruców informacji dotyczących lokalizacji krypt wysnuwano z początku daleko idące wnioski, np. tendencja do skupiania się na końcach filamentów aktynowych zdawała się sugerować ich udział w ruchach komórki [12], masowe występowanie krypt w zakończeniach synaptycznych nerwów cholinergicznego organu elektrycznego drętwy — rolę w przekaźnictwie synaptycznym [9], a lokalizacja jąderkowa u jeżowca — w powstawaniu i transporcie rybosomów [6].

Idealnym organizmem modelowym do badania roli krypt mogłyby być drożdże, które są wygodnym i dobrze scharakteryzowanym (fenotypowo i nie tylko) obiektem manipulacji genetycznych. Niestety z drożdży dotychczas nie udało się ani wyizolować krypt, ani nawet potwierdzić ich istnienia w tych organizmach. Badania genetyczne nad rolą krypt przedsięwzięto zatem na śluzowcu *Dictyostelium*, w którym krypty występują bardzo obficie i który, hodowany w stadium haploidalnym, jest często stosowanym materiałem

modelowym w biologii molekularnej [7, 11, 14]. U *Dictyostelium* wykryto i sklonowano najpierw dwa główne białka krypt, oznaczone MvpA i MvpB (Tab. 1). Ponieważ w komórkach szczepu, który pozbawiony został metodą nokautu genów dla obu tych białek, nadal obserwowano krypty (o silnie co prawda zaburzonej morfologii), postulowano istnienie trzeciego głównego białka krypt *Dictyostelium*, które faktycznie zostało wyizolowane i oznaczone MvpC [14]. Klonowanie tego białka dotychczas się nie powiodło, ponieważ jego sekwencja aminokwasów odbiega prawdopodobnie znacznie od pozostałych głównych białek krypt. Mutanty pozbawione metodą nokautu genów kodujących białka MvpA i MvpB (obydwu równocześnie lub każdego z osobna) nie wykazują żadnej patologii fenotypowej na pożywce pełnej, natomiast na pożywce minimalnej (w warunkach stresu pokarmowego) stwierdzono u nich wolniejszy wzrost i osiąganie niższej maksymalnej gęstości hodowli, co sugeruje rolę krypt w podstawowych funkcjach życiowych komórki. Nie udało się dotychczas uzyskać mutantów całkowicie pozbawionych krypt, które być może pozwoliłyby wysnuć bardziej konkretne wnioski.

Interesująca hipoteza na temat roli krypt wysunięta została na podstawie spekulacji teoretycznych. Odkrywczy krypt zauważyli znaczące podobieństwa między kryptami a elementami kompleksów porowych w otoczce jądrowej (*nuclear pore complexes*, NPC), znanymi jako ziarnistości centralne lub czopy poru (*central plugs*) [21, 22]. Mimo wyizolowania i sklonowania kilku składników całego kompleksu porowego skład, funkcja, a nawet istnienie owej centralnej ziarnistości są wysoce kontrowersyjne. Postulowano nawet, że jest ona artefaktem; najpowszechniej dziś akceptowana koncepcja mówi jednak, że jest to ulegający zmianom konformacyjnym przejściowy składnik kompleksu porowego. Ziarnistość centralna może prawdopodobnie asocjować z kompleksem porowym lub dyfundować do cytoplazmy i bierze dzięki temu udział w transporcie nukleocytoplazmatycznym [22]. Wymiary (ok. 50×30 nm), masa cząsteczkowa (13 MDa), a nawet ośmiokrotna symetria, przypisywana części czopu centralnego poru jądrowego, są uderzająco podobne do odpowiednich cech krypty i na tej podstawie wysunięto śmiałą hipotezę o tożsamości tych dwóch struktur [8]. Wsparcie eksperymentalne dla tej hipotezy pochodzi z doświadczeń nad lokalizacją krypt — większość krypt występuje, co prawda, we frakcji cytosolowej, jednak około 5% powtarzalnie i systematycznie podlega izolowaniu z frakcją jądrową [13, 23]. Co więcej, badania cytoimmunofluorescencyjne wykazały, że część krypt zlokalizowana jest w otoczce jądrowej, kolokalizując się z markerami kompleksu porowego. Stosunkowo dobrze poznany zewnętrzny pierścień poru jądrowego również charakteryzuje się ośmiokrotną symetrią (zawierając osiem promieniście rozmieszczonych „szprych” — *spokes*), a średnica poru (120 nm) jest niewiele większa niż

średnica otwartej krypty. Weryfikacja hipotezy o tożsamości krypt z czopami centralnymi poru jądrowego wymagałaby izolowania, oczyszczenia i zbadania czopów centralnych i bezpośredniego porównania z kryptami, jednak argumenty za rolą krypt w transporcie nukleocytoplazmatycznym płyną również z odkryć opisanych w kolejnym rozdziale.

V. Białko związane z opornością w płucach a krypty

Komórki nowotworowe często wykazują fenotyp zwany opornością wielolekową, polegający na tym, że po kontakcie z jednym lekiem przeciwnowotworowym nabywają oporność krzyżową (*cross-resistance*) na inne, strukturalnie i farmakologicznie odmienne leki [24]. Oporność wielolekowa często związana jest z nadekspresją białek z grupy ABC (zawierających domenę wiążącą ATP — *ATP-Binding Cassette*), zwłaszcza MDR1 (glikoproteina P) i MRP1, które aktywnie wytransportowują cząsteczki leku z komórki [25, 26]. Znanych jest jednak wiele linii komórkowych, które wykazują fenotyp oporności wielolekowej bez nadekspresji żadnego ze znanych białek za ten fenotyp odpowiedzialnych.

W laboratorium prof. Rika Schepera z Vrije Universiteit w Amsterdamie po immunizacji myszy całymi komórkami linii niemalokomórkowego raka płuc SW1573/2R120, wykazującymi oporność wielolekową bez nadekspresji białka MDR1, uzyskano monoklonalne przeciwciało LRP-56 silnie i wybiórczo reagujące z komórkami opornymi [27, 28]. Przeciwciało to rozpoznaje specyficznie białko o masie 110 kDa, nazwane LRP (od skrótu *Lung Resistance Protein* — białko związane z opornością w płucach), które podlega nadekspresji w linii SW1573/2R120 i w wielu innych liniach wykazujących oporność wielolekową [29, 30].

Z biblioteki cDNA ludzkiej linii komórek fibrosarkomy HT1080/DR4 (wykazującej oporność wielolekową) wyizolowano cDNA odpowiadające transkryptowi genu *LRP* [16]. Transfekcja tego klonu powoduje nadekspresję białka o masie 110 kDa, reagującego z przeciwciałem LRP-56. Klon cDNA został zsekwenconowany, stwierdzono, że koduje białko o 896 aminokwasach. Wbrew oczekiwaniom nie stwierdzono w sekwencji potencjalnych domen transmembranych lub wiążących ATP, charakterystycznych dla wszystkich transporterów ABC, odpowiedzialnych za oporność wielolekową. Po porównaniu z bankiem sekwencji okazało się, że wyizolowany klon koduje białko o 88% identyczności aminokwasowej z głównym białkiem krypt szczura. Tak wielkie podobieństwo jednoznacznie wskazuje, że LRP stanowi ludzkie główne białko kryptowe [16, 31].

Immunochemiczne badania tkankowego i subkomórkowego rozmieszczenia LRP zostały przeprowadzone przede wszystkim z użyciem przeciwciała LRP-

-56, specyficznego dla głównych białek kryptowych różnych organizmów (przy czym najsilniej reaguje z ludzkim głównym białkiem kryptowym, czyli LRP, przeciwko któremu zostało otrzymane, a słabiej z głównymi białkami kryptowymi szczura i *Dictyostelium*). Dzięki tej specyficzności immunoreaktywność LRP-56 można traktować jako marker występowania krypt [29]. W komórkach ludzkich LRP-56 wykazuje charakterystyczny dla krypt rozproszony wzór barwienia w cytoplazmie.

Rozmieszczenie LRP i krypt zostało zbadane w różnych tkankach ludzkiego organizmu [30]. Technika *Western blotting* z LRP-56 oraz *Northern blotting* wykryło białko LRP i mRNA dla niego we wszystkich badanych tkankach, co wspiera tezę o podstawowej i niezbędnej dla komórki roli krypt. Stwierdzono jednak znaczące zróżnicowanie poziomu mRNA i białka w różnych tkankach, co sugeruje, że funkcje krypt mogą zmieniać się w zależności od tkanki. Najwyższy poziom LRP wykryto w tkankach, których rola związana jest z pewnym stopniem z ochroną organizmu przed szkodliwymi metabolitami i ksenobiotykami, a mianowicie w nabłonku oskrzelowym, nabłonku przewodu pokarmowego, w keratynocytach i makrofagach. W tkankach tych stwierdza się jednocześnie wysoką ekspresję transporterów ABC odpowiedzialnych za oporność wielolekową, czyli MRP1 i MDR1 [32]. Ten szczególny wzór lokalizacji tkankowej stanowi argument za fizjologiczną rolą tych białek w detoksyfikacji organizmu. Na bazie tych analogii między białkami wywołującymi oporność wielolekową a LRP wyciągnięto wniosek o roli LRP i krypt w detoksyfikacji (np. ochronie jądra przez egzogenne i endogenne toksyny) [11, 29].

Związek między nadekspresją białka LRP a fenotypem oporności wielolekowej jest jednak nadal kontrowersyjny. Gen *LRP* zlokalizowany jest u człowieka na krótkim ramieniu chromosomu 16 (dokładnie 16p11.2), zaskakująco blisko genu *MPR1*, kodującego znany transporter z grupy ABC (zlokalizowanego w 16p13.1), którego zdolność do bezpośredniego wywoływania fenotypu oporności wielolekowej była wówczas ostatecznie udowodniona [16, 25, 29]. Postulowano zatem, że *LRP* ulega koamplifikacji z *MRP1* i jego nadekspresja w komórkach opornych jest przypadkowa. Argumenty statystyczne, wykazujące zupełny brak statystycznie znamiennej korelacji nadekspresji LRP i MRP1, oraz genetyczne dowody częstego nieamplifikacyjnego charakteru nadekspresji LRP obaliły jednak tę koncepcję. Ponadto w liniach rewertantów (komórek, które tracąc fenotyp oporności stały się ponownie wrażliwe na leki) zaobserwowano odpowiedni spadek poziomu ekspresji LRP [16]. Argumentem pośrednim, ale sugestywnym jest fakt, że ekspresja LRP okazała się znakomitym markerem oporności wielolekowej (poziom ekspresji odpowiada poziomowi oporności) w nowotworowych liniach komórkowych nie poddawanych selekcji lekiem (nadeks-

presja MDR1 i MRP1 następuje zazwyczaj dopiero po kontakcie z czynnikiem cytotoksycznym), co sugerowałoby rolę krypt w oporności wrodzonej komórek. Badanie ekspresji LRP ma również zastosowanie kliniczne jako marker prognostyczny (pozwalający przewidzieć wynik leczenia) — wysoki poziom LRP koreluje ze słabą odpowiedzią nowotworu na chemioterapię [29, 33, 34].

Kwestia związku przyczynowo-skutkowego ekspresji LRP i poziomu krypt z opornością wielolekową jest jednak nadal niejasna. Sztucznie wywołana nadekspresja LRP (w komórkach poddanych stabilnej transfekcji wektorem niosącym *LRP*) nie daje komórkom fenotypu oporności [16]. Można to wytłumaczyć faktem, że ludzkie krypty składają się z kilku składników poza głównym białkiem krypt i nadekspresja samego LRP (głównego białka krypt), które z braku pozostałych składników nie może uformować funkcjonalnych krypt, nie jest w stanie zmienić statusu opornościowego komórki [11]. Być może nadekspresja LRP w fenotypie opornościowym jest odbiciem ogólnej nadprodukcji krypt, które bezpośrednio odpowiedzialne są za detoksyfikację leków. Zaproponowanych zostało kilka schematów mechanistycznych, wyjaśniających możliwy przebieg tego zjawiska. Najpopularniejszy nawiązuje do spekulacji na temat roli krypt w transporcie nukleocytoplazmatycznym i sugeruje, że krypty nie pozwalają lekom, których tarcza działania znajduje się w jądrze (np. interkalującym się do DNA antracyklinom), przedostać się przez porędkowy, zamykając je w swoim wnętrzu i powodując redystrybucję leku w cytoplazmie [11, 29]. Jedynym eksperymentalnym argumentem za tą niewątpliwie atrakcyjną hipotezą jest fakt, że w niektórych liniach opornych komórek zaobserwowano odbiegającą od normy dystrybucję daunorubicyny (mniejsze stężenie w jądrze, większe w cytoplazmie w postaci wyraźnych punktowych skupień). Zjawisko to można jednak wytłumaczyć na kilka sposobów i dlatego dla potwierdzenia lub obalenia powyższej hipotezy potrzeba więcej dowodów eksperymentalnych.

VI. Przyszłość badań krypt

Badania krypt, głównie w laboratoriach profesorów R o m e w Los Angeles i S c h e p e r a w Amsterdamie, koncentrują się na próbach znalezienia ich roli biologicznej. Znaczące mogą tu być tytuły dwóch dotychczas opublikowanych artykułów przeglądowych o kryptach, napisanych przez naukowców z laboratorium prof. R o m e, odkrywcy krypt „Otwierając krypty: organelle w poszukiwaniu funkcji” z roku 1991 [8] i „Krypty są odpowiedzią, jakie jest pytanie?” z roku 1996 [11]. Ostatnio badania krypt zaczynają rozwijać się intensywniej ze względu na hipotezę o ich udziale w oporności wielolekowej komórek nowotworowych.

Najbardziej spójna i atrakcyjna hipoteza postuluje rolę krypt w transporcie nukleocytoplazmatycznym

poprzez odwracalną asocjacje z kompleksem poru jądrowego. Zmiany konformacyjne (otwieranie krypt) odpowiadają w tej koncepcji za uwalnianie przenoszonych substancji lub cząstek. Związek nadekspresji LRP i zwiększenia poziomu krypt z opornością wielolekową polega tu na obniżeniu stężenia leku w jądrze, gdzie znajdują się tarcze jego działania cytotoksycznego, dzięki usuwaniu leku przez krypty [29]. Najnowsze odkrycie, że u jeźowca krypty mogą występować wewnątrz jądra [6], nabiera w tym świetle nowego znaczenia.

Dla uformowania jednolitej i powszechnie akceptowalnej teorii funkcji krypt potrzebne są jednak odpowiedzi na wiele dodatkowych pytań. Kwestiami zagadkowymi i spornymi są na przykład rola vRNA, relacja między ekspresją LRP a poziomem krypt, interakcje między różnymi białkami krypt w strukturze tych organelli i wiele innych zagadnień.

Artykuł otrzymano 28 listopada 1997 r.

Zaakceptowano do druku 19 marca 1998 r.

Piśmiennictwo

- Sarkar S, Mukherjee AK, Guha C (1981) *J Biol Chem* **256**: 5077-5086
- Kedersha NL, Rome LH (1986) *J Cell Biol* **103**: 699-709
- Kedersha NL, Rome LH (1986) *Anal Biochem* **156**: 161-170
- Keen JH (1990) *Annu Rev Biochem* **59**: 415-438
- Kedersha NL, Miquel MC, Bittner D, Rome LH (1990) *J Cell Biol* **110**: 895-901
- Hamil DR, Suprenant KA (1997) *Dev Biol* **190**: 117-128
- Vasu SK, Kedersha NL, Rome LH (1993) *J Biol Chem* **268**: 15356-15360
- Rome LH, Kedersha NL, Chugani DC (1991) *Trends Cell Biol* **1**: 47-50
- Herrmann C, Volknandt W, Wittich B, Kellner R, Zimmermann H (1996) *J Biol Chem* **271**: 13908-13915
- Chugani DC, Kedersha NL, Rome LH (1991) *J Neurosci* **11**: 256-268
- Kickhoefer VA, Vasa SK, Rome LH (1996) *Trends Cell Biol* **6**: 174-178
- Kedersha NL, Rome LH (1990) *Mol Biol Rep* **14**: 121-122
- Chugani DC, Rome LH, Kedersha NL (1993) *J Cell Sci* **106**: 23-29
- Vasu SK, Rome LH (1995) *J Biol Chem* **270**: 16588-16594
- Kickhoefer VA, Rome LH (1994) *Gene* **151**: 257-260
- Scheffer GL, Wijngaard PLJ, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJLM, Clevers HC, Scheper RJ (1995) *Nat Med* **1**: 578-582
- Herrmann C, Zimmermann H, Volknandt W (1997) *Gene* **188**: 85-90
- Kickhoefer VA, Searles RP, Kedersha NL, Garber ME, Johnson DL, Rome LH (1993) *J Biol Chem* **268**: 7868-7873
- Vilalta A, Kickhoefer VA, Rome LH, Johnson DL (1994) *J Biol Chem* **269**: 29752-29759
- Kedersha NL, Heuser JE, Chugani DC, Rome LH (1991) *J Cell Biol* **112**: 225-235
- Akey CW (1990) *Biophys J* **58**: 341-355
- Davis LI (1995) *Annu Rev Biochem* **64**: 865-896
- Kedersha NL (1995) *Mol Biol Cell* **6** (Suppl.): 196a
- Hill BT (1996) *Int J Oncol* **9**: 197-203
- Bartosz G (1997) *Kosmos* **46**: 129-136
- Gottesman MM, Pastan I (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 385-427
- Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Meijer CJLM, Pinedo HM (1992) *Clin Chim Acta* **206**: 25-32
- Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kalken CK, Slovak ML, de Vries EGE, van der Valk P, Meijer CJLM, Pinedo HM (1993) *Cancer Res* **53**: 1475-1479
- Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Schroeijs AB, van der Valk P, Scheper RJ (1996) *Eur J Cancer* **32A**: 979-984
- Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJLM, van der Valk P, Scheper RJ (1996) *Am J Pathol* **148**: 877-887
- Rome LH (1995) *Nat Med* **1**: 527
- Grzelakowska-Sztabert B (1989) *Post Biochem* **35**: 513-541
- Scheper RJ, Scheffer GL, Flens MJ, van der Valk P, Broxterman HJ, Izquierdo MA (1996) *Cytotechnology* **19**: 187-190
- List AF, Spier CS, Grogan TM, Johnson C, Roe DJ, Greer JP, Wolff SN, Broxterman HJ, Scheffer GL, Scheper RJ, Dalton WS (1996) *Blood* **87**: 2464-2469



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”.

Białka G — najważniejsze sygnalizatory komórkowe?

G Proteins — The most important cellular messengers?

LUDMIŁA ŻYLIŃSKA*¹,
ELŻBIETA REBAS*¹,
AGNIESZKA ŁACHOWICZ*²,
LILLA ŁACHOWICZ**¹

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura i modyfikacje strukturalne białek G
- III. Interakcja białek G z receptorami
- IV. Interakcje między białkami G
- V. Efektory białek G
- VI. Udział białek G w procesie wzrostu i różnicowania komórek
- VII. Regulacja ekspresji podjednostek białek G
- VIII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: GTP — guanozynotrifosforan; GDP — guanozynodifosforan; cAMP — cykliczny 3',5' adenylozomonofosforan; PTX — toksyna krztuśca; CTX — toksyna cholery; IP₃ — inozytolo-1,4,5-trifosforan; DAG — diacyloglicerol; PLC — fosfolipaza C; TRH — hormon tyreotropowy; VIP — wazoaktywny peptyd jelitowy; PTH — parathormon; PKC — kinaza białkowa C; AC — cyklaza adenylanowa.

I. Wstęp

Heterotrimeryczne białka wiążące GTP i GDP (białka G) zostały odkryte w czasie badań nad wpływem glukagonu na wzrost syntezy cAMP w hepatocytach [1]. Jak się następnie okazało, jest to ciągle rozrastająca się rodzina wszechobecnych, molekularnych przekaźników sygnalizacji komórkowej. Receptory błonowe aktywowane przez czynniki wzrostu, neurotransmitery, czynniki chemotaktyczne, hormony czy substancje zapachowe, poprzez białka G wzmacniają sygnały aktywując m.in. cyklazę adenylanową, fosfolipazę C, specyficzne fosfodiesterazy i kanały jonowe [1-3]. Przedłużone działanie czynników sygnałowych wywołuje zjawisko desensytyzacji receptorów, poprzez procesy fosforylacji przebiegające z udziałem kinaz białkowych [4]. Kinazy fosforylujące białka zmieniają specyficzne funkcje m.in. w komórkach takich, jak miocyty, hepatocyty, adypocyty, płytki krwi i komórki endokrynne. Ilościowe i jakościowe różnice w białkach G mogą wpływać na działanie

* Dr n. med. ** prof. dr hab. ¹ II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej 90-131 Łódź, ul. Lindleya 6 ² Instytut Endokrynologii Akademii Medycznej 91-425 Łódź, ul. Sterlinga 3

Contents:

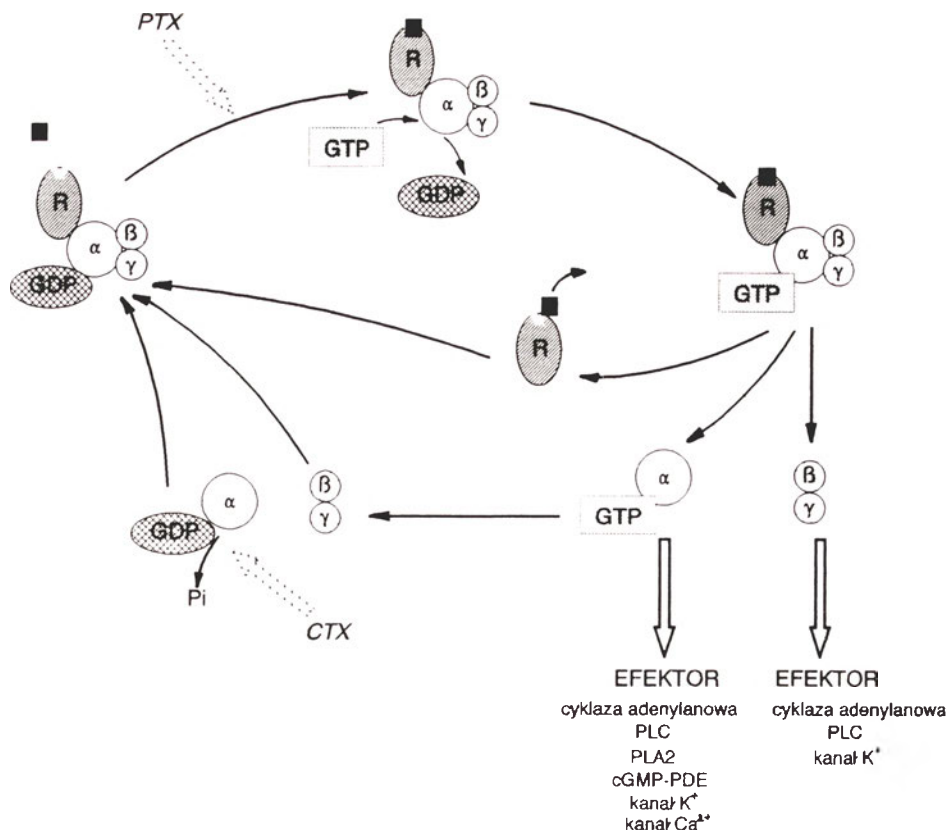
- I. Introduction
- II. G proteins structure and structural modifications
- III. G proteins — receptors interaction
- IV. The interactions between G proteins
- V. The effectors of G proteins
- VI. Participation of G proteins in growth and cell differentiation
- VII. Regulation of G protein subunits expression
- VIII. Summary

hormonów i klinicznie manifestować się jako dysfunkcje różnych organów.

Celem pracy jest przedstawienie danych na temat ważnych fizjologicznych i patologicznych aspektów dotyczących struktury i funkcji białek G, a głównie ich udziału w przekazywaniu sygnałów. Nieprawidłowości w przekaźnictwie transmembranowym mające swe źródło w białkach G, mogą odgrywać kluczową rolę w występowaniu wielu chorób. Przykładem jest obecność w różnych guzach endokrynych naturalnie pojawiających się mutacji w białkach G, które w istotny sposób zmieniają układy przekaźnikowe. Te obserwacje sugerują możliwość wciągnięcia białek G na listę ewentualnych protoonkogenów [1-3].

II. Struktura i modyfikacje strukturalne białek G

W stanie nieaktywnym białka G stanowią kompleks trzech różnych podjednostek: α (39-46 kDa), β (~37 kDa) i γ (~8 kDa), z GDP przyłączonym do podjednostki α . Aktywacja białka G następuje wskutek przyłączenia GTP w miejsce GDP, z jednoczesnym uwolnieniem kompleksu $\beta\gamma$ [5, 6]. Zarówno podjednostka α -GTP, jak i kompleks $\beta\gamma$, mogą niezależnie modulować aktywność przynajmniej niektórych effektorów białkowych (Ryc. 1). Wszystkie podjednostki α wykazują aktywność GTP-azową i są w stanie hydrolizować końcową grupę fosforanową GTP [7, 8]. Największe różnice występują w budowie podjednostek α . Sklonowano już 21 cDNA kodujących różne podjednostki α w komórkach ssaków, a ich liczba niewątpliwie będzie wzrastać [5, 7, 8]. Podjednostki te



Ryc. 1. Mechanizm działania białek G.
 R — receptor; PTX — toksyna krztuśca; CTX — toksyna cholery; P_i — fosforan nieorganiczny; PLC — fosfolipaza C; PLA₂ — fosfolipaza A₂; PDE — fosfodiesteraza.

— zgodnie z ich sekwencją aminokwasową — można podzielić na cztery większe subrodziny. Są to: G_s, G_i, G_q i G₁₂. Każda rodzina zawiera po kilka różnych podjednostek α [9]. Ponadto opisano już przynajmniej pięć różnych podjednostek β i dziesięć podjednostek γ [7, 10]. Miejsce wiązania nukleotydu przez podjednostkę α białka G_s składa się z pięciu różnych, wysoce konserwatywnych regionów (G1-G5) [7]. Wykazano, że najważniejszym mutacjom w regionach G2 i G3 podlegają Arg²⁰¹ i Glu²²⁷, co wpływa na kształtowanie się aktywności białka G (np. następuje blokada aktywności GTP-azowej). Warto podkreślić, że o ile znaczna liczba podrodzin białek G występuje w większości tkanek, to niektóre z podjednostek α tych podrodzin mogą być charakterystyczne wyłącznie dla jednego rodzaju komórek. Przykładem są podjednostki α₁₅ i α₁₆, wykryte na razie tylko w komórkach krwiotwórczych [11]. Przy zastosowaniu technik immunohistochemicznych w mózgowiu szczura wykazano zróżnicowaną lokalizację anatomiczną oraz komórkową podjednostek α₀, α₁₁, α₁₂ oraz α₅ [12]. Może to stanowić podstawę specyfiki działania niektórych neurotransmiterów w ośrodkowym układzie nerwowym.

Niektóre podjednostki α posiadają specyficzne reszty, które mogą być ADP-rybozylowane przez endogenne transferazy ADP-rybozylowe toksyn bakteryjnych takich, jak toksyna cholery (CTX) czy toksyna krztuśca (PTX) [7, 8, 13]. Wiele białek G jest substratem rybozylacji przez obie toksyny, a z kolei istnieje szereg białek niewrażliwych na obie lub jedną z nich. CTX katalizuje ADP-rybozylację na reszcie argininy podjednostki α, co powoduje zahamowanie aktywności GTP-azy. Uważa się, że niektóre białka

G mogą być efektywnie modyfikowane przez CTX w obecności agonisty, lecz bez egzogennego GTP. W takich warunkach tworzy się wiązanie receptora z białkiem G pozbawionym nukleotydu, a ta forma właśnie uznawana jest za dostępną dla CTX. Zjawisko to zachodzi wyraźnie w podjednostkach α₂ i α₃ białka G_i. PTX natomiast katalizuje ADP-rybozylację reszty cysteiny w pozycji 4 C-końca większości podjednostek α rodziny białek G_i, hamując sprzężenie białka G z receptorem [14, 15].

Podjednostki α oraz dimer βγ są modyfikowane kowalencyjnie przez lipidy [16]. Mirystylacja i palmitylacja podjednostki α nadaje jej hydrofobowy charakter oraz umożliwia zakotwiczenie w błonie. Ponadto wykazano, że mirystylacja podjednostki α białka G_i znacznie zwiększa jej powinowactwo do dimeru βγ [17]. Spośród dotychczas poznanych podjednostek α, z wyjątkiem G_i, wszystkie zawierają palmitynian związany tioestrowo z cysteiną N-końcowej części białka. Palmitylacja jest procesem odwracalnym i sugeruje się, że reguluje translokację podjednostki α z błon do cytosolu [18]. Badania prowadzone z udziałem mutantów nie zawierających reszty palmitylowej w podjednostkach α białek G_s, G_q i G₁₁, wykazały ich zmniejszoną zdolność asocjacji z błoną [19].

W kompleksie βγ acylacji ulega jedynie podjednostka γ. Uważa się, że prenylacja jest wręcz niezbędna dla prawidłowej interakcji dimeru z podjednostką α, receptorami i efektorami [16]. Reszty lipidowe, farnezylo- lub geranylogeranylowe, łączą się wiązaniem tioestrowym z cysteiną w N-końcowej części podjednostek γ₁ i γ₂ [20].

III. Interakcja białek G z receptorami

Receptory wiążące białka G należą do wielkiej rodziny homologicznych i integralnych białek występujących w błonie plazmatycznej. W ich skład wchodzi siedem transmembranowych domen, połączonych zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi, hydrofobowymi pętlami [21, 22]. Po stronie cytoplazmatycznej znajdują się trzy pętle oraz C-końcowy odcinek receptora. Druga i trzecia pętla oraz C-końiec uważane są za najważniejsze miejsca oddziaływania receptora z różnymi rodzajami białek G. Transmembranowe regiony wykazują najwyższy stopień homologii. Te helikalne odcinki receptorów mają charakter lipofilowy lub amfipatyczny, co ułatwia wiązanie ligandów [23]. Znacznie mniejsze podobieństwa zaobserwowano w C-końcowej cytoplazmatycznej części receptora [5, 22]. Sugeruje to, że specyficzność i powinowactwo w procesie aktywacji receptora przez białka G, związane są z tym regionem. Zarówno wiązanie ligandu, jak i aktywacja receptora za jego pośrednictwem, są utrzymywane przez kieszonkę wytworzoną przez różne zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe regiony [8, 15, 21]. Utworzenie właściwej kieszeni wiązania jest zależne od obecności reszt proliny [24]. W przypadku dłuższych ligandów, np. hormonów glikoproteinowych, N-końiec receptora pomaga również w utrzymaniu kontaktu z ligandem [25]. Ponadto istnieje inna kieszeń zwrócona w kierunku przestrzeni wewnątrzkomórkowej, która pozwala na interakcję kompleksu receptor-ligand z białkami G. Trzeci cytoplazmatyczny region wydaje się być najbardziej krytyczny dla działania białka G. Jakiegokolwiek mutacje w pętli cytoplazmatycznej lub C-końcu receptora mogą zakłócać aktywację białka G [5, 22]. Część receptora katalizuje GTP-właściwą aktywację białek G przez pobudzenie różnych, poszczególnych reakcji cyklu GTP-azy. Są to: 1) stymulacja uwalniania GDP w następstwie wiązania GTP [26], 2) ułatwienie przejścia z układu nieaktywnego do aktywnego (GTP-ligand) [27], 3) wzrost dysocjacji podjednostki białka G [28, 29]. Inną cechą właściwą dla wszystkich receptorów białek G jest ich podatność na desensytyzację lub adaptację, wywołana przedłużonym lub powtórnym działaniem danego ligandu [9]. W procesie desensytyzacji w ciągu minut zachodzi fosforylacja receptora, co powoduje gwałtowne odłączenie receptora od białka G. Obecnie uważa się, że przynajmniej dwa typy kinaz serynowo-treoninowych zaangażowane są w regulację wrażliwości receptorów. Są to zależne od wtórnych przekaźników kinaza białkowa A i C oraz niezależne od wtórnych przekaźników kinazy receptorów związanych z białkami G (GRK, *G-protein-coupled receptor kinases*) [4]. Dotychczas scharakteryzowano sześć kinaz GRK: GRK1 (kinaza rodopsynowa), GRK2 i 3, także określane jako kinazy 1 i 2 receptora β -adrenergicznego, GRK4, GRK5 i GRK6 [30]. Enzymy te preferencyjnie fosforylują

zaktywowany receptor lub receptor związany z ligandem. Trzecia pętla cytoplazmatyczna oraz C-końiec receptora stanowią przypuszczalne miejsca regulowane przez procesy fosforylacji [31-33]. Zaobserwowano również, że dimer $\beta\gamma$ wzmacnia działanie niektórych kinaz GRK poprzez indukcję ich przemieszczania do błony oraz ułatwianie interakcji z receptorami [34]. W następstwie często dochodzi do desensytyzacji i zniesienia regulacji [35, 36]. Procesy te prowadzą z kolei do internalizacji receptora. Długotrwała ekspozycja receptora na działanie ligandu wywołuje także obniżenie ilości mRNA receptora, co stanowi wyraz regulacji długo działających mechanizmów powodujących represję genów receptora.

IV. Interakcje między białkami G

Białka G mogą komunikować się między sobą poprzez zgodne działanie dwu lub więcej receptorów sprzężonych z tymi samymi białkami G [37]. Jest to działanie zbieżne — konwergencja. Drugi rodzaj komunikowania się może występować, kiedy jeden receptor przenosi sygnał hormonalny na różne białka G. Jest to działanie rozbieżne — dywergencja [8]. Takie porozumiewanie między poszczególnymi białkami G i receptorami hormonów w różnych tkankach wydaje się być niezwykle ważne. Występuje ono np. w komórkach przysadki syntetyzujących prolaktynę (PRL), w osteoblastach oraz komórkach mięsaka kości (osteosarkoma). W modelu komórek przysadki tworzenie cAMP wzrasta pod działaniem TRH i VIP, bowiem oba te peptydy aktywują cyklazę adenylanową poprzez białko G_s [38]. Natomiast synteza cAMP obniża się w wyniku działania somatostatyny i dopaminy, które działają inhibująco na podjednostkę αG_{i2} [39]. Wykazano także, że receptory TRH i parathormonu sprzężone z białkami G_s i G_q wyraźnie wzmagają syntezę cAMP, IP_3 i DAG [9, 40]. Aktywny kompleks hormon-receptor powoduje uwolnienie podjednostki α od trimery $\alpha\beta\gamma$, co w następstwie może prowadzić do zaburzenia działania innych efektorów i w ten sposób komplikować wewnętrzne porozumiewanie się między białkami G [5, 10, 41].

V. Efektory białek G

Dotychczas najlepiej poznanym efektem białek G jest cyklaza adenylanowa, która katalizuje powstawanie cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu. Opisano dziewięć wyraźnie zróżnicowanych izoform cyklazy, które na podstawie sekwencji i funkcjonalnych podobieństw podzielono na 6 klas [42]. Niektóre cyklazy ulegają aktywacji przez białka G_s , jedynie w obecności kompleksu Ca^{2+} /kalmodulina, lub gdy jednocześnie fosforylowane są przez PKC (np. I typ AC), a także kiedy fosforylacja przez PKC zachodzi w obecności dimeru $\beta\gamma$ (typy II, III i V AC) [43]. Niektóre hormony powodują hamowanie aktyw-

ności cykazy, jednak w tym wypadku sygnał przekazywany jest przez białka G_i , głównie podjednostki α_{i2} i α_{i3} . Ponadto inhibicja AC może być wynikiem działania dimeru $\beta\gamma$ [44]. Szczególnie mocno hamowany jest I typ cykazy adenylnowej [45, 46].

Działania fizjologiczne obszernej klasy hormonów, neurotransmiterów i czynników wzrostu wyjaśnia się ich zdolnością do aktywacji specyficznej fosfolipazy C (PLC), kolejnego enzymu efektorowego, który katalizuje hydrolizę fosfatydyloinozytolo-bis-fosforanu (PIP_2) do inozytolo 1,4,5-trifosforanu (IP_3) i diacyloglicerolu (DAG) [41]. Ostatnie prace zidentyfikowały podrodziny białka G_q działające jako regulatory tych przemian. Badania prowadzone z oczyszczoną, rekombinowaną formą PLC $\beta_{1,2}$ i podjednostką α_q białka G lub podjednostką α_{11} potwierdziły te doniesienia [10]. Natomiast PLC β_3 w mięśniach gładkich aktywowana była przez kompleks $\beta\gamma$ [47].

Białka G regulują także kanały jonowe. Wykazano, że G_s aktywują wrażliwe na dihydropirydynę zależne od napięcia kanały Ca^{2+} w mięśniach i hamują kanały Na^+ w sercu [48, 49]. Zaobserwowano, że modulacja tych samych neuronalnych kanałów Ca^{2+} zależnych od napięcia może również zachodzić poprzez różne białka G [50]. Niektóre podtypy podjednostki α_i białka G jak np. podjednostka α_{i3} (po indukcji somatostatyną) stymulowała kanały K^+ [51]. Również aktywność kanałów K^+ zależnych od Ca^{2+} wzrastała w obecności białek G_i i G_o [52]. W miocytach specyficzne kanały K^+ związane z receptorem muskarynowym aktywowane były przez białko G_i , zależne od PTX [53]. Ostatnie doniesienia wskazują także na udział dimeru $\beta\gamma$ w modulacji aktywności kanałów K^+ w sercu [54].

VI. Udział białek G w procesie wzrostu i różnicowania komórek

Stężenie komórkowe białek G_i i G_o jest wyższe niż białek G_q i G_s , co sugeruje, że ich rola może być bardziej złożona [10]. Podrodzina G_o obecna w czopkach wzrostu neuronalnego prawdopodobnie jest modulatorem wczesnego wzrostu neuronalnego i uczestniczy w synaptycznym przemieszczeniu cząsteczek u dorosłych osobników [10]. W synaptosomach embriionów kurzych hormony tyroidowe zmniejszały aktywność GTPazową białka G_o [55]. Modulacja aktywności tego białka zmienia proces tworzenia wtórnych przekazników i wiązana jest z regulacją proliferacji i różnicowania neuronów. Przy zastosowaniu techniki immunohistochemicznych ustalono, że regulacja wzrostu aksonów włókien wzrokowych myszy związana była z wrażliwymi na PTX białkami G_o i G_i [56]. Na razie dane o działaniu białek G należących do innych rodzin są nieliczne, ale wykazano np. że białka rodziny G_{12} uczestniczą w procesach proliferacji komórek [10, 57]. Prawdopodobnie zachodzi to poprzez

bezpośrednią stymulację kinaz białkowych związanych z aktywacją mitozy. W związku z tym uważa się, że ta klasa białek G może uczestniczyć w różnicowaniu komórki, podobnie jak wykazano to dla białek G_{12} [14, 58]. Podjednostka α_{i3} zlokalizowana w kompleksie aparatu Golgiego wiązana jest z sekrecją zgromadzonych tam białek; towarzyszy też transportowi pęcherzyków [59, 60].

Osteoblasty nim staną się osteocytami mineralizującymi układ kostny, w czasie swego życia podlegają procesom wzrastania i mineralizacji. W tym cyklu przemian biorą udział różne geny zależne od stopnia dojrzałości osteoblastu, jak np. geny kolagenu typu I i histonu 4 w stadium proliferacji, a fosfatazy alkalicznej i białka GLA (osteokalcyna) w stadium mineralizacji [61]. Wykazano, że istnieje korelacja między endogennym poziomem białka G_{12} i stopniem dojrzałości osteoblastycznej. Analizy PCR genów, kodujących kolagen I i fosfatazę alkaliczną w komórkach transfekowanych mutantem podjednostki α białka G_{12} , wykazały nieznaczne zmniejszenie poziomu odpowiedniego mRNA. Co więcej, poziomy mRNA receptorów kalciolu i osteokalcyny wzrastały. Poza tym stwierdzono, że poziom mRNA receptora PTH, interleukiny I i transformowanego czynnika wzrostu β (TGF β) był znamienne obniżony [62]. Dane te wskazują, że białko G_{12} prawdopodobnie skraca fazę proliferacji, a podnosi stopień komórkowego różnicowania procesów mineralizacji. Ponieważ przemiany, w których uczestniczą białka G_{12} wydają się być ściśle związane z mitotyczną aktywacją kinaz białkowych pobudzanych przez czynniki wzrostu, to ten model może przyczynić się do wyjaśnienia funkcji białka G we wzroście i różnicowaniu komórki.

W hodowlach mysich preadypocytów i adypocytów lokalizacja podjednostek α różniła się w zależności od stopnia zróżnicowania komórek [63]. $G_{5\alpha}$ i $G_{1\alpha3}$ występowały w cytoplazmie, natomiast $G_{1\alpha1}$ i $G_{1\alpha2}$ w błonie plazmatycznej. Translokacja dwóch ostatnich związana była z dojrzewaniem komórek. Linia komórkowa 3T3-L1 preadypocytów przekształcała się w formy dojrzałe po stymulacji insuliną, deksametazonem lub inhibitorem fosfodiesterazy, IBMX [64, 65]. Komórki nadmiernie zróżnicowane akumulują więcej triacylogliceroli i fosfolipidów niż komórki kontrolne, prawidłowo zróżnicowane. Okazało się także, że białko G w stanie aktywnym pobudza enzymy metabolizujące tłuszcze: syntetazę palmitoilo-CoA i acylotransferazę glicerolo-3-fosforanową do poziomów, daleko przekraczających wartości w zróżnicowanych komórkach kontrolnych [9]. Dość interesujące jest spostrzeżenie, że efekty obserwowane w komórkach nadmiernie zróżnicowanych (*superdifferentiated cells*) mogą częściowo zachodzić w komórkach kontrolnych w obecności kwasów tłuszczowych. Ale należy pamiętać, że wszystkie hormonalne drogi regulacji i modulowania po stosowaniu kwasów tłuszczowych mogą wzajemnie się zaburzać [66].

VII. Regulacja ekspresji podjednostek białek G

W wielu patologicznych stanach zachodzą zmiany ekspresji, a w efekcie funkcji, podjednostek białek G. Większość tych zaburzeń uważana jest za wtórną, z powodu zmienionego stanu hormonalnego. W cukrzyca hipoinsulinowej i otyłości izolowane błony komórek wątroby myszy wykazały obniżoną zawartość podjednostki α białek G_{12} , G_{13} i podjednostki β , bez wykrywalnych zmian ilościowych podjednostki α białek G_s [67]. Hormony steroidowe oddziałują na komórki docelowe przez wewnątrzkomórkowe, jądrowe receptory, a do ich modelu działania genomowego należą zmiany w ekspresji różnych podjednostek białek G. I tak np. w adrenolektomii obserwuje się niedobór receptora AC w sercu oraz rdzeniu nerki szczura. W linii komórkowej mięsaka kości podanie deksametazonu powoduje wzrost poziomu podjednostki α białka G_s , a równocześnie znacznie mniejszy wzrost podjednostki α białka G_i [68]. Nadmierne stężenie glukokortykoidów prowadzi do stymulacji cyklazy adenylanowej w osteoblastach i fibroblastach, podobnie jak w komórkach neuroblastoma (nerwiak) i miocytach [69]. Podobnie hormony płciowe regulują ekspresję genów białek G. Przemawia za tym stwierdzenie, że w czasie cyklu rujowego zmieniają się ilości specyficznych białek G w przednim płacie przysadki, a w czasie ciąży także w mięśniówce macicy [70, 71]. W hipokampie szczura kortykosteron wpływał na poziom podjednostek α białek G_s , G_{11} , G_{12} oraz G_0 , nie zmieniając przy tym ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji [72]. Wiele efektów działania hormonów tarczycy polega na modulacji dróg przekazywania sygnału adrenergicznego. Receptory α - i β -adrenergiczne modulowane są zarówno w hipotyzmie jak i hipertyzmie [73]. U zwierząt hipotyzm prowadzi do szczytowego wzrostu podjednostki α i β białka G_i w tkance tłuszczowej, podczas gdy poziom podjednostki α białka G_s jest normalny [74]. Badania przeprowadzone u ludzi i zwierząt dają różniące się wyniki, ale większość prac odnotowuje w hipotyzmie wzrost ekspresji podjednostki α białek G_i .

VIII. Podsumowanie

Przedstawione w tej części dane koncentrują się głównie na budowie i mechanizmie działania białek G, także modyfikacjach, którym podlegają oraz ocenie ich udziału w niektórych chorobach endokrynologicznych. Obecnie wiadomo, że kardiomiopatia, alkoholizm, różnego rodzaju uzależnienia czy zaburzenia metaboliczne mogą dotyczyć dysfunkcji jednego lub kilku białek G [75-78]. W ostatnich latach wykazano, że mutacje receptorów wiążących białka G, a także podjednostek α związane są z występowaniem wielu chorób takich, jak osteodystrofia, cukrzyca, syndrom McCune-Albright czy przedwczesne dojrzewanie chłopców [79]. Identyfikacja powstających zmian może

mieć fundamentalne znaczenie diagnostyczne oraz potencjalne terapeutyczne, co wskazuje, że białka G długo jeszcze będą w centrum zainteresowania współczesnej biochemii.

Artykuł otrzymano 29 września 1997 r.
Zaakceptowano do druku 30 marca 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Barańska J (1994) *Post Biol Kom* **21**: 479-488
2. Kwiatkowska J (1995) W Konarska L (red) *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, PWN W-wa, str 104-116
3. Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) *Annu Rev Biochem* **60**: 653-688
4. Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ (1993) *J Biol Chem* **268**: 23735-23738
5. Johnson GL, Dhanasekaran N, Gupta SK, Lowndes RR (1991) *J Cell Biochem* **47**: 136-146
6. Concllin BR, Bourne H (1993) *Cell* **78**: 31-41
7. Spiegel AM, Shenker A, Weinstein IS (1992) *Endocrinol Rev* **13**: 563-565
8. Birnbaumer LG (1990) *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 675-705
9. Gordeladze JO, Johansen PW, Paulssen RH, Paulssen EJ, Gautvik KM (1994) *Eur J Endocrinol* **131**: 557-574
10. Hepler JR, Gilman AG (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 383-387
11. Simon MJ, Strathmann MP, Gautam N (1991) *Science* **252**: 802-808
12. Okuhara DY, Lee JM, Beck SG, Muma NA (1996) *Synapse* **23**: 246-257
13. Johnson GL, Dhanasekaran N (1989) *Endocr Rev* **10**: 317-331
14. Hermonet S, Merendino Jr JJ, Gutkind JS, Spiegel AM (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10455-10458
15. Dixon RF, Sigal JS, Rauds E, Register RB, Candelore MR, Blake AD et al (1987) *Nature (Lond)* **326**: 73-77
16. Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR (1995) *J Biol Chem* **270**: 503-506
17. Linder ME, Pang I-H, Duronio RJ, Gordon JJ, Sternweis PC, Gilman AG (1991) *J Biol Chem* **266**: 4654-4659
18. Levis MJ, Bourne HR (1992) *J Cell Biol* **119**: 1297-1307
19. Okamoto Y, Ninomiya H, Tanioka M, Sakamoto A, Miwa S, Masaki T (1997) *J Biol Chem* **272**: 21589-21596
20. Muller S, Lohse MJ (1995) *Biochem Soc Trans* **23**: 141-148
21. Lefkowitz RJ, Caron MG (1988) *J Biol Chem* **263**: 4992-4996
22. Strosberg AD (1991) *Eur J Biochem* **196**: 1-10
23. Van Rhee, Jacobson KA (1996) *Drug Develop Res* **37**: 1-38
24. Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987) *Biochemistry* **26**: 2657-2664
25. Parmentler M, Libert F, Faenhaut C, Lefart A, Gerard C, Rerret J et al (1989) *Science* **246**: 1620-1622
26. Cassel D, Selinger Z (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4155-4159
27. Iyengar R, Birnbaumer L (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5179-5183
28. Rasnass LA, Insel PA (1988) *J Biol Chem* **263**: 17239-17242
29. Iyengar R, Rich KA, Herberg JT, Premont RI, Codina J (1988) *J Biol Chem* **263**: 15348-15353
30. Stoffel III RH, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997) *J Membrane Biol* **157**: 1-8
31. Benovic JL, Mayor F, Staniszewski C, Lefkowitz RJ, Caron MG (1987) *J Biol Chem* **262**: 9062-9032
32. Bouvier M, Hausdorff W, DeBlasi AO, Dowol BF, Kobilka BK (1988) *Nature (Lond)* **333**: 370-372

33. Houslay MD (1991) *Eur J Biochem* **195**: 9-27
34. Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) *Science* **257**: 1264-1267
35. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) *FASEB J* **4**: 2881-2889
36. Krueger KM, Daaka Y, Pichter JA, Lefkowitz RJ (1997) *J Biol Chem* **9**: 5-8
37. Gudermann T, Schöneberg T, Schultz G (1997) *Annu Rev Neurosci* **20**: 399-427
38. Paulssen RH, Paulssen EJ, Gautvik KM, Gordeladze JO (1992) *Eur J Biochem* **204**: 413-418
39. Johansen PW, Paulsen RH, Bjoro T, Gautvik KM, Gordeladze JO (1994) *Biochim Biophys Acta* **2454**: 304-309
40. Abou-Samra AB, Juppner A, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E et al (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2732-2736
41. Sternweis PC, Smrcka AV (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 502-506
42. Antoni FA (1997) *TEM* **8**: 7-14
43. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) *Annu Rev Biochem* **36**: 461-480
44. Premon RT, Matsuoka I, Mattei M-G, Pouille Y, Defer N, Hanoune J (1996) *J Biol Chem* **271**: 13900-13907
45. Krupiński J (1991) *Mol Cell Biochem* **104**: 73-79
46. Iyengar R (1993) *FASEB J* **7**: 768-775
47. Murthy KS, Coy DH, Makhlof GM (1996) *J Biol Chem* **271**: 23458-23463
48. Mattera R, Graziano MP, Yatani A, Zhou, Graf R, Codina J (1989) *Science* **243**: 804-807
49. Schubert B, Van Dongen AMJ, Kirch GE, Brown AM (1989) *Science* **245**: 516-519
50. Zhu Y, Yakel JL (1997) *J Neurophysiol* **78**: 780-789
51. Takano K, Yasufuku-Takano J, Teramoto A, Fujita T (1997) *Endocrinology* **138**: 2405-2409
52. Walsh KB, Wilson SP, Long KJ, Lemon SC (1996) *Mol Pharmacol* **49**: 379-386
53. Koumi S, Sato R, Nagasawa K, Hayakawa H (1997) *J Membr Biol* **157**: 71-81
54. Huang CL, Jan YN, Jan LY (1997) *FEBS Lett* **405**: 291-298
55. Giguere A, Fortier S, Beaudry C, Gallo-Payet N, Bellabarba D (1996) *Endocrinology* **137**: 2558-2564
56. Bates CA, Meyer RL (1996) *Brain Res* **714**: 65-75
57. Chan ANL, Fleming IP, McCovern ES, Chedid M, Miki T, Aaronson SA (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 762-768
58. Gordeladze JO, Jabłoński G, Lund HW, Bruland OS (1994) *J Cell Biochem* **212**: 231-237
59. Barr FA, Leyete M, Mollner S, Pfeuffer T, Tooze SA, Huttner WB (1991) *FEBS Lett* **294**: 239-242
60. Stow JL, De Almeida JB, Narula N, Holzmann EJ, Ercolani L, Ansello DA (1991) *J Cell Biol* **114**: 113-118
61. Pockwinse SM, Wilming LG, Conlon DM, Stein GS, Lian JB (1992) *J Cell Biochem* **49**: 310-323
62. Gordeladze JO, Lund HW, Bruland OS (1994) *Amer Soc Bone and Mineral Res*, abstrakt, str 276
63. Bégin-Heick N, Black MA, Gaffield J, Cadrin M (1997) *J Cell Biochem* **65**: 259-266
64. Paulssen EJ, Paulssen RH, Haugen TB, Gautvik KM, Gordeladze JO (1991) *Acta Physiol Scand* **143**: 195-201
65. Paulssen EJ, Paulssen RH, Gautvik KM, Gordeladze JO (1992) *Biochem Pharmacol* **44**: 471-477
66. Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4653-4657
67. Feldman AM (1993) *Circulation* **87**: 27-34
68. Rodan SB, Rodan GA (1986) *Endocrinology* **118**: 2510-2518
69. Forray C, Richelson E (1985) *J Neurochem* **45**: 79-84
70. Bouvier C, Lagace G, Collu R (1991) *Mol Cell Endocrinol* **79**: 65-73
71. Taufin Z, Goureau O, Milligan G, Harbon S (1991) *FEBS Lett* **278**: 4-7
72. Okuhara DY, Beck SG, Muma NA (1997) *Brain Res* **745**: 144-151
73. Lazar-Wesley E, Hadcock JR, Malbou CC, Kunos G, Ishac E, JN (1991) *Endocrinology* **129**: 1116-1121
74. Allard WJ, Vicario PP, Saperstein R, Slater EE, Strout HV (1991) *Endocrinology* **129**: 169-174
75. Ohyanagi M, Iwasaki T (1996) *Mol Cell Biochem* **160/161**: 153-158
76. Klinker JF, Lichtenberg-Kraag B, Damm H, Rommelspacher H (1996) *Neurosci Lett* **213**: 25-28
77. Spiegel AM (1996) *Annu Rev Physiol* **58**: 143-170
78. Manji H, Chen G, Potter W, Kosten TR (1997) *Biol Psychiatry* **41**: 130-134
79. Spiegel AM (1997) *J Inherit Metab Dis* **20**: 113-121

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

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

Funkcje sygnalizacyjne białek G niewrażliwych na PTX w komórce

Signalling function of G proteins insensitive on PTX in cell

AGNIESZKA LACHOWICZ*¹,
LILLA LACHOWICZ**²
LUDMIŁA ŻYLIŃSKA*²
ELŻBIETA RĘBAS*²,

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Ogólna charakterystyka białek G niewrażliwych na PTX
 - II-1. Białka G_z
 - II-2. Białka G_{12} i G_{13}
- III. Sygnalizacja komórkowa z udziałem białek G niewrażliwych na PTX
 - III-1. Sygnalizacja z udziałem białka G_q
 - III-2. Sygnalizacja z udziałem białka G_{12}
 - III-3. Sygnalizacja z udziałem białka G_z
- IV. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: GTP — guanozynotrifosforan; GDP — guanozynodifosforan; cAMP — cykliczny 3'5'adenozynomonofosforan; PTX — toksyna krztuśca; CTX — toksyna cholery; PLC — fosfolipaza C; PKC — kinaza białkowa C; CA — cyklaza adenylnowa; PLA_2 — fosfolipaza A_2 ; TXA_2 — tromboksan A_2 ; TRH — hormon tyreotropowy;

I. Wstęp

Białka G są transmembranowymi proteinami stanowiącymi pomost między receptorami czynników zewnątrzkomórkowych jak np. hormonów, neurotransmiterów, a błonowymi efektorami jak np. kanałami jonowymi czy enzymami katalizującymi powstawanie wtórnych przekaźników informacji. Głównymi enzymami związanymi z działaniem białek G są: cyklaza adenylnowa, fosfolipaza C oraz fosfolipaza A_2 . Białka G są heterotrimerami zbudowanymi z podjednostki α zawierającej miejsce wiązania nukleotydów guaninowych GDP i GTP i posiadającej aktywność GTP-azową oraz z podjednostek β i γ , tworzącymi kompleks $\beta\gamma$ [1].

Klasyfikacja białek G opiera się o różnice istniejące w budowie i właściwościach podjednostki α . Niektóre podjednostki α białek G zawierają domenę, która ulega modyfikacji przez toksyny bakteryjne. Toksyna

Contents:

- I. Introduction
- II. G proteins insensitive on PTX
 - II-1. Proteins G_z
 - II-2. Proteins G_{12} i G_{13}
- III. Signalling function of G protein insensitive on PTX
 - III-1. Signalling function of proteins G_q
 - III-2. Signalling function of proteins G_{12}
 - III-3. Signalling function of proteins G_z
- IV. Summary

krztuśca (PTX) jest powszechnie stosowana jako czynnik charakteryzujący udział heterotrimerycznych białek G w procesach sygnalizacji w komórce. Toksyna ta katalizuje ADP-rybozylację specyficznych podjednostek α białek G z rodziny G_i i G_s , a ta modyfikacja uniemożliwia współdziałanie receptora z białkiem G. Toksyna cholery (CTX) natomiast katalizuje ADP-rybozylację podjednostki α , blokując jednocześnie aktywność GTP-azową tej podjednostki, co prowadzi do przedłużenia aktywacji białka G [2].

Do białek G posiadających podjednostkę wrażliwą na działanie toksyny krztuśca zalicza się białka G_s , które głównie uczestniczą w stymulacji cyklazy adenylnowej oraz białka G_i (z podjednostkami α_{11} , α_{12} , α_{o1} i α_{o2}) które pośredniczą w hormonalnej inhibicji cyklazy adenylnowej, a także w regulowaniu aktywności kanałów wapniowych i potasowych.

Wśród białek niewrażliwych (opornych) na toksynę krztuśca (PTX) wyróżnia się białka G_q z podjednostkami α_q , α_{11} , α_{14} , α_{15} , α_{16} , białka G_{12} i α_{13} i jedno z rodziny białek G_i , a mianowicie białko G_z [ref w 3]. Stwierdzono, że podrodzina G_z białka G_i nie posiada reszty cysteiny, która jak wiadomo jest miejscem oddziaływania PTX [4, 5]. Białka G niewrażliwe na PTX są obecne we wszystkich tkankach człowieka; wyjątek stanowią białka G_z , których obecność wykazano głównie w neuronach oraz w płytkach krwi i komórkach chromochłonnych [6]. Na przykład białko G_{14} jest charakterystyczne dla śledziony, nerek, jąder i tkanki płucnej [7]. Białka G_{15} i G_{16} występują głównie w komórkach hematocytów a ich poziom

* dr n. med ** prof. dr hab. ¹ Instytut Endokrynologii Akademii Medycznej 91-425 Łódź, ul. Sterlinga 3 ² II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej 90-131 Łódź, ul. Lindleya 6.

Tabela 1.

Klasyfikacja białek G.

	Podjednostki	Wrażliwość na toksyny	Aktywator-receptor	Efektor	Modyfikacje	Występowanie	
G _s	$\alpha_{s(s)}$	CTX PTX	hormony β adrenergiczne glukagon	\uparrow CA \uparrow kanał Ca^{2+} \downarrow kanał Na^+	ADP-rybozylacje PKA(?)	wszystkie tkanki	
	$\alpha_{s(l)}$						
	α_{olf}	CTX	substancje zapachowe	\uparrow CA	ADP-rybozylacje	komórki węchowe	
G _i	α_{i1} α_{i2}	CTX, PTX	rodopsyna światło	\uparrow cGMP-PDE	ADP-rybozylacje	pręciki siatkówki oka	
	α_{i1}	PTX, (CTX)	rec. muskarynowe, α -adrenergiczne	\uparrow kanał K^+	ADP-rybozylacje mirystylacje palmitylacje PKC (tylko α_{i2}) cGMP-kinaza PKA(?)	gł. tk. nerwowa	
	α_{i2}			\downarrow CA \downarrow kanał Ca^{2+}		wszystkie tkanki	
	α_{i3}			\downarrow CA			
	α_{o1} α_{o2}	PTX, (CTX)	j.w.	\downarrow kanał Ca^{2+} \uparrow PLC \uparrow PLA_2 (?)	ADP-rybozylacje mirystylacje palmitylacje	tk. nerwowa kom. endokrynne	
	α_g	PTX, (CTX)		?	kw. arachidonowy	kom. smakowe	
	α_z	—		muskarynowe, TXA_2	\downarrow CA	mirystylacje palmitylacje kw. arachidonowy PKC	tk. nerwowa płytki krwi
G _q	α_q α_{11} α_{14} α_{15} α_{16}	—	muskarynowe	\uparrow β -PLC	palmitylacje	wszystkie tkanki hematocyty	
	G ₁₂	α_{12} α_{13}	—	TXA_2 trombina	$\text{Na}^+ \text{H}^+$ \uparrow PLA_2 (?)	palmitylacje acylacje α_{13}	wszystkie tkanki płytki krwi neurony

PTX — toksyna krztuśca; CTX — toksyna cholery; PLC — fosfolipaza C; PLA_2 — fosfolipaza A_2 ; PDE — fosfodiesteraza; TXA_2 — tromboksan A_2 ; PKC — kinaza białkowa C; PKA — kinaza białkowa A; CA — cyklaza adenylanowa

maleje wraz z dorastaniem komórek. Białko G_z, mimo że jest odporne na PTX, zaliczane jest do rodziny białek G_i ze względu na hamujące działanie na cyklazę adenylanową. Podział białek G z uwzględnieniem ich efektorów przedstawia tabela 1.

II. Ogólna charakterystyka białek G niewrażliwych na PTX

II-1. Białka G_z

Białka G_z, początkowo nazywane białkami G_x, zostały opisane po raz pierwszy w roku 1988 przez dwie niezależne grupy badaczy [5]. Stwierdzono pewne podobieństwo w sekwencji aminokwasów tych białek do sekwencji białek G_i i G_o wrażliwych na

toksynę krztuśca. Późniejsze badania wykazały jednak, że białko G_z nie jest substratem dla toksyny krztuśca [3]. Mimo to nadal zaliczane jest do rodziny białek G_i, gdyż podobnie jak podjednostki α_i i α_o białek G, podjednostka α_z może być acylowana kwasem mirystylowym i palmitynowym.

Białka G_z występują głównie w neuronach i płytkach krwi. W innych tkankach nie stwierdzono ich obecności lub występują w bardzo niskich stężeniach. Lokalizacja taka sugeruje ich specyficzną rolę w procesach zachodzących w komórkach tych tkanek [3].

Na razie brak danych, które charakteryzowałyby receptor lub efektor związany wybiórczo z białkiem G_z. Wykazano jednak, że receptor muskarynowy acetylocholiny M₂ może aktywować podjednostkę α_z otrzymaną z *E.coli* [8]. Stwierdzono natomiast, że

transfekcja w komórkach podjednostki α_1 z podjednostką α_2 białek G współdziałających z receptorami adrenergicznymi, dopaminergicznymi D_2 i adenosyny A_1 prowadzi do niezależnej od PTX inhibicji cyklazy adenylanowej. Wskazuje na to udział białek G_2 w hamowaniu przekazywania sygnału z receptora na cyklazę adenylanową. Fizjologiczne znaczenie tego efektu nie jest dotychczas w pełni poznane, zwłaszcza, że inhibicja cyklazy adenylanowej w komórkach tkanek bogatych w białka G_2 zachodzić może również w sposób zależny od PTX [9].

Podstawowa aktywność GTP-azowa, czyli hydroliza nukleotydu guanylowego, jest szczególnie ważna dla białka G_2 , bowiem reakcja ta zachodzi tu bardzo wolno, nawet przy optymalnych (niskich mikromolarnych) stężeniach jonów Mg^{2+} . Proces ten praktycznie osiąga wartości zerowe przy stężeniach milimolarnych Mg^{2+} [6]. Zjawisko odwrotne ma miejsce przy wysokich stężeniach Mg^{2+} , co może być wyraźnym sygnałem do stymulacji wymiany nukleotydu, ale jest ono charakterystyczne dla innych białek G, nie zaś dla białek G_2 [10]. Mechanizm, który hamuje wymianę nukleotydu w białku G_2 ciągle nie jest jasny, ale istnieją dane, że efekt ten pojawia się na etapie dysocjacji GDP [6]. Hamowanie procesu hydrolizy przez jony Mg^{2+} zaobserwowane u $G_2\alpha$ jest podobne do procesu zachodzącego u białek Ras [11].

Wykazano, że nienasycone składniki lipidów takie jak np. kwas arachidonowy, hamują wymianę nukleotydu białek $G_2\alpha$ [12]. Mechanizm tej supresji polegać ma na wiązaniu negatywnie naładowanych kwaśnych lipidów z wolną postacią nukleotydu białka $G_2\alpha$, które jest w ten sposób nieodwracalnie inaktywowane. Ten rodzaj interakcji lipid-białko ma zatem konsekwencje funkcjonalne. Inhibicja ta jest specyficzna dla αG_2 , natomiast inne białka G są niewrażliwe na obecność tych lipidów. Warunkiem pojawienia się inhibicji jest obecność grupy karboksylowej, podczas gdy inne pochodne alkoholowe kwasów (20:4; 20:0; 18:3; 18:2; 18:1) nie dają podobnego efektu. Kwas arachidonowy w stężeniu 120 μM powodował prawie całkowitą inhibicję wiązania αG_2 z GDP, a także niehydrolizującym analogiem GTPS. Do inaktywacji wiązania GTP wywołanej przez kwasy tłuszczowe niezbędne jest odłączenie GDP od α_2 [12]. Rysuje się hipoteza, że mechanizm inaktywacji białek G_2 wywołany przez nienasycone kwasy tłuszczowe przebiega poprzez oddziaływanie kwasu z formą białka G_2 nie związaną z nukleotydem. Brak jest dokładnych danych dotyczących fizjologicznego znaczenia tego procesu. Podobne działanie nienasyconych kwasów tłuszczowych na inne białka biorące udział w przekazywaniu sygnału w komórce (np. kinaza C), sugeruje potencjalną rolę lipidów w modulowaniu tego procesu przy udziale białek G_2 . Fakt ten jest o tyle interesujący, że tkanki w których występują białka G_2 znane są z magazynowania znacznych ilości kwasu arachidonowego i wysokiej aktywności PLA_2 . Kwas arachidonowy

(20:0) nie wpływał na wiązanie GTPS przez białko αG_2 , co sugeruje, że podstawowym warunkiem wywołania efektu jest obecność podwójnego wiązania. Inne nienasycone kwasy (olejowy, linolowy i linolenowy) wykazują działanie podobne do arachidonianu, lecz wymagają znacznie wyższych stężeń. Trans nienasycone kwasy są słabymi inhibitorami opisanego procesu [12].

Większość podjednostek α białek G opornych na PTX może być modyfikowana przez palmitynian. Palmitynian w procesie posttranslacyjnym wiąże się wiązaniem tioestrowym z jedną lub kilkoma resztami cysteiny występującymi blisko N-końca, a modyfikacja ta jest odwracalna [13-16]. Sugeruje się, że palmitynian jest podstawowym związkiem łączącym białka G_2 z błoną, co stanowi o ich funkcji sygnalizacyjnej w komórce [14]. Inne dane podkreślają znaczenie nie tyle palmitynianu w tych procesach, ale reszt cysteiny, które służą jako miejsca palmitylacji np. białek αG_q i stanowią miejsce krytyczne dla jego funkcji [17]. Np. dla αG_2 palmitynian nie jest niezbędny dla procesu sygnalizacji, ponieważ w przypadku zmutowanego białka (zmiana cysteiny na alaninę) następuje wyraźne hamowanie aktywności cyklazy adenylanowej [18]. Jednakże potencjalna rola palmitylacji w procesach sygnalizacji z udziałem białek G wydaje się nie budzić wątpliwości. Poza palmitylacją podkreśla się również znaczenie innej ko-translacyjnej modyfikacji z udziałem kwasu mirystylowego. Modyfikacja ta polega na związaniu kowalencyjnym wiązaniem amidowym z resztą glicyny na N-końcu białka. Ta, jak się okazało, stabilna modyfikacja ważna jest dla lokalizacji tych białek w błonie komórkowej. Mirystylacja wzmacnia również powinowactwo rodziny białek G_1 do kompleksu $\beta\gamma$ [19-21].

Inną, ważną biochemicznie cechą przynajmniej dwóch niewrażliwych na PTX białek G jest możliwość ich fosforylacji. Dotyczy to αG_2 i αG_{12} . Są one znakomitymi substratami dla kinazy białkowej C w badaniach *in vitro* [22, 23]. Aktywacja PKC w płytkach przez takie czynniki jak trombina, tromboksan A_2 , analogi i estry forbolu, prowadzi do szybkiej fosforylacji podjednostki αG_2 [22-24]. Potwierdzono, że PKC fosforyluje α_2 w sposób selektywny bowiem enzym ten nie katalizuje fosforylacji podjednostek α_1 oraz α_q . Selektowność obserwowana była również w stosunku do innych kinaz białkowych, gdyż ani kinaza zależna od cGMP, ani kinaza białkowa A zależna od cAMP nie fosforylują podjednostki α_2 . Badania wykonane na płytkach krwi wykazały, że fosforylacja podjednostki α_2 blokuje oddziaływanie pomiędzy poszczególnymi podjednostkami tego białka. Pierwotnym miejscem fosforylacji jest seryna²⁷ znajdująca się blisko N-końca [22, 25]. Biologiczne znaczenie tej fosforylacji jest nadal niejasne, chociaż wiadomo, że fosforylacja tak $G_2\alpha$, jak i G_{12} , blokuje ich współdziałanie z kompleksem $\beta\gamma$ [23, 26]. Wyciągnąć można stąd wniosek, że może to być mechanizm

regulacyjny osłabiający sygnalizację podjednostek α białek G. Chociaż dostępne dane mogą budzić pewne wątpliwości, to ogólnie zakłada się, że fosforylacja może spełniać rolę głównego mechanizmu regulującego aktywność białek G, w tym także αG_7 i αG_{12} .

Z białkami G_7 może współdziałać również receptor fMLP (peptydu-N-formylometionyleucylofenyloalaniny), znanego czynnika chemotaktycznego produkowanego przez bakterie i stymulującego m.in. PI-PLC [27].

II-2. Białka G_{12} i G_{13}

Białka G_{12} i G_{13} różnią się od innych białek G sekwencją aminokwasową i mogą tworzyć własną podgrupę w rodzinie białek G_q . Jak się okazało, nie są one wrażliwe na toksynę krztuśca oraz wykazują brak transferazy N-mirystylowej, co sprawia, że najprawdopodobniej nie są także mirystylowane [28].

Podjednostki α_{12} i α_{13} występują głównie w liniach komórkowych neuronów, a szczególnie wysoki poziom α_{13} wykryto również w płytkach krwi [3].

Badania na liniach NIH 3T3 fibroblastów myszy wykazały, że typ α_{12} odgrywa istotną rolę w chorobowym namnażaniu komórek. Wywołana mutacja białek G innych rodzin α_{12} , naturalnie występujących w guzach tkanek endokrynnych, nie wywołuje zmian w komórkach NIH 3T3. Świadczy to o tym, że różne białka G pełnią różne role uzależnione od typu komórek w których występują. Oprócz przypisywanego im znaczenia jako czynników o dużym potencjale onkogennym, białka z rodziny α_{12} biorą również udział w procesach komórkowych zachodzących podczas organogenezy [29, 30].

III. Sygnalizacja komórkowa z udziałem białek G niewrażliwych na PTX

Dotychczasowe wstępne obserwacje wykazały, że wiele procesów sygnalizacji w komórce jest zależnych od białek G opornych na PTX. Skupiono zatem uwagę nie tylko na identyfikacji tych białek, ale także na charakterystyce specyficznych dróg sygnalizacji, w których te białka uczestniczą. Najlepiej opracowano to zagadnienie dla białek G_q [31].

III-1. Sygnalizacja z udziałem białka G_q

Proces ten został dobrze scharakteryzowany ponad pięć lat temu. Polega on na bezpośredniej stymulacji przez podjednostkę αG_q izoenzymów β PLC, nawet w warunkach *in vitro*. Powoduje to wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i w następstwie aktywację PKC. Działanie białek G_q w obrębie tej podrodziny może różnić się siłą i specyficznością wobec izoenzymów PLC [32-37]. Pojawia się również wiele doniesień wskazujących na możliwość połączenia aktywacji przez białka G_q z kaskadą kinazy MAP.

Sugeruje się jednakże, że ta interakcja nie zachodzi bezpośrednio, ale również na drodze aktywacji PLC [38-40].

III-2. Sygnalizacja z udziałem białka G_{12}

Działanie docelowe podrodziny białek G_{12} nie jest na razie w pełni określone, dlatego sygnalizacja zachodząca z ich udziałem stanowi przedmiot intensywnych badań [41]. Wykazano, że silne aktywatory płytek krwi, jak tromboksan A_2 i trombina, aktywują białka G_{12} i G_{13} w błonach płytek krwi ludzkiej. Badania oparto o określenie zależnego od receptora stopnia przyłączania nie hydrolizującego fotoreaktywnego analogu ($\alpha^{32}P$) GTP do podjednostek α_{12} i α_{13} otrzymanych z błon płytkowych. Oba białka wiązały analog bardzo wolno w obecności agonów receptora, co różni te białka od innych białek z rodziny G_i i G_o , szybko wiążących nukleotydy w podobnych warunkach. Przyłączenie analogu GTP do α_{12} i α_{13} w odpowiedzi na aktywację receptorów TXA_2 i trombiny zachodziło po upływie 30 minut. Zakłada się zatem, że cała pula białek G_{12} i G_{13} wiążących się z receptorem TXA_2 i trombiny w płytkach staje się zdolna do aktywacji. Fizjologiczne znaczenie opóźniania tego procesu nie jest jednak jeszcze znane [41-44].

Natomiast ważną konsekwencją aktywności białek G_{12} jest ich udział w modulacji wymiany Na^+/H^+ w błonach płytek krwi [45, 46].

Białka G_{12} uczestniczą także w regulacji wzrostu komórki. Jak wykazano synteza DNA stymulowana trombiną jest zależna od białek G_{12} [47]. Zmutowane, aktywne podjednostki αG_{12} i αG_{13} wykazują potężną zdolność transformacji w fibroblastach [48-50]. Mechanizm tych procesów jest niejasny, jako że nie zanotowano zaburzeń w stężeniach cAMP, cytozolowego Ca^{2+} , białek zawierających fosfotyrozynę, także w aktywnościach PLC czy PLD w tych komórkach [49]. Dane te potwierdziły następne obserwacje, że oczyszczone podjednostki αG_{12} czy αG_{13} nie zmieniały aktywności cyklazy adenylanowej (typy I, II i V), PLC, fosfolipazy D, oraz kinazy 3-fosfoinozytolu w badaniach *in vitro* [51, 52].

III-3. Sygnalizacja z udziałem białek G_z

Ocena funkcji sygnalizacyjnych białek G_z stanowi ciągle intrygujący problem z uwagi na dość ograniczony model ekspresji i odmienne właściwości biochemiczne tych białek. Podobnie jak w przypadku rodziny białek G_{12} , większość danych dotyczących sygnalizacji za pośrednictwem białek G_z odkryto na podstawie badań ekspresji heterologicznej w komórkach nieuszkodzonych. Wykazano zdolność αG_z do bezpośredniego hamowania cyklazy adenylanowej w warunkach *in vitro*, kiedy guanozyno-5'- γ -thio-trifosforanowy ligand αG_z hamował I i V typ cyklazy adenylanowej [51]. Warto podkreślić, że podobnie jak αG_z , typ

I cyklazy adenylanowej jest główną formą występującą w układzie nerwowym, natomiast typ V CA przeważa w mięśni sercowym i mózgowiu [53, 54].

Wykazano, że białka G_z mogą łączyć się z różnymi receptorami, które zazwyczaj aktywują białka G_i [27, 55-58]. Wydaje się nie budzić wątpliwości stwierdzenie, że białka G_z mogą współdziałać z różnymi receptorami i mogą wiązać je w procesie inhibicji różnych efektorów np. cyklazy adenylanowej.

Warto chyba podkreślić, że białka G_z mogą uczestniczyć w hormonalnej inhibicji syntezy cAMP w większości komórek. Wyższa ekspresja α_z w mózgu niż w innych tkankach sugeruje, że niewrażliwa na PTX inhibicja syntezy cAMP może również zachodzić w komórkach i błonach neuronalnych. Jakkolwiek mechanizm inhibicji akumulacji cAMP przez α_z jest na razie nieznan, to podobieństwo sekwencji aminokwasowej między α_z a α_i wykazuje ścisłą ewolucyjną zależność między tymi białkami, która może być równoznaczna z pokrywaniem się ich funkcji sygnalizacyjnej. Pozostaje do wyjaśnienia lub białka G_z zmniejszając akumulację cAMP bezpośrednio czy pośrednio przez inne drogi sygnalizacyjne i czy mogą zastępować białka G_i w regulacji innych efektorów takich jak PLA_2 , PLC oraz kanały potasowe i sodowe [9].

Parker i wsp. [8] stwierdzili, że kiedy rekombinowaną podjednostkę αG_z wprowadzono do receptorów muskarynowych M_2 występujących w pęcherzykach fosfolipidów, wówczas zastosowanie agonisty receptora muskarynowego może stymulować wymianę nukleotydu w podjednostce αG_z . Podobne eksperymenty były także prowadzone z innymi przedstawicielami białek G_i (αG_{11} , αG_{12} , αG_{13} , αG_0).

Zakłada się również udział αG_z w syntezie fosforanu inozytoli, chociaż z drugiej strony zwraca uwagę brak wyraźnego rozróżnienia między bezpośrednią stymulacją PLC przez podjednostkę αG_z , a pośrednią stymulacją w uwalnianiu kompleksu $\beta\gamma$ [55]. Równocześnie podkreśla się zdolność stymulacji wytwarzania fosforanów inozytoli przez αG_q , αG_{11} , i αG_z , jako odpowiedź na TRH i na otwarcie kanałów wapniowych typu L, co jest również drugim efektem działania TRH [59]. Inhibitory PKC blokują także aktywację kanałów indukowanych powtórnym zastosowaniem TRH, ale uzyskane wyniki nie pozwalają na rozróżnienie, które z tych trzech białek uczestniczy w procesie supresji.

Iniekcja dokomorowa antysensowych oligodeoksynukleotydów dla podjednostki αG_z powodowała u szczurów redukcję ekspresji αG_z w substancji szarej (40%), prążkowiu (41%), wzgórzu (16%) i podwzgórzu (54%) [60-62]. Natomiast mechanizm przez który iniekcje mogą wpływać na ekspresję αG_z jest nadal niejasny.

Podjednostka αG_z podobnie jak białka G_{12} , może brać udział w takich procesach sygnalizacji w komórce, które regulują jej wzrost [63]. Obecność mutantu αG_z (Q205L) indukuje transformację fenotypu komór-

rek Swiss 3T3 i wzrost inkorporacji H^3 -tymidyny w nieobecności czynników wzrostu. Nie wykryto zmian w aktywności CA w tych komórkach. Ta zdolność aktywnej αG_z do transformacji komórek jest podobna do wykazanej dla białka αG_{12} wrażliwego na PTX [29]. Warto podkreślić, że zmutowana aktywna forma αG_{12} (R179C) została wykryta w guzach jajnika i kory nadnerczy u ludzi [30]. Podobnie zmutowaną podjednostkę αG_z stwierdzono również w guzach przysadki i tarczycy u ludzi [64]. Jest zatem możliwe, że mutacje podjednostek α białek G, w tym również αG_z , mogą wiązać się z procesem karcynogenezy u ludzi [65].

IV. Podsumowanie

Wśród białek G opornych na PTX, tylko dla podrodziny białek G_q drogi sygnalizacji są dotychczas względnie dobrze poznane. Natomiast sygnalizacja np. przez białka G_{12} ciągle pozostaje niejasna. Wskazuje się ostatnio na istnienie powiązania tej rodziny białek z różnymi drogami regulującymi wzrost i różnicowanie komórki. Podkreśla się też ich udział w regulacji wymiany Na^+/H^+ i działanie na aktywny cytoszkieletu. Udział białek G_z w sygnalizacji komórkowej nadal pozostaje w sferze dyskusji. Warto podkreślić, że mutacyjnie zaktywowane podjednostki αG_z podobnie jak i αG_{12} czy αG_{13} mogą powodować zmiany w fenotypie niektórych komórek. Większość prac poświęconych zagadkowemu białku G_z wykazuje, że może ono być aktywowane przez pewną ilość receptorów, z których większość również aktywuje inne białka z rodziny G_i , oraz, że zaktywowana podjednostka αG_z może hamować przynajmniej dwa podtypy cyklazy adenylanowej. Jako że αG_z nie jest substratem dla PTX, oraz, że proces hamowania aktywności CA jest zasadniczo *in vivo* i *in situ* wrażliwy na PTX, to pytanie: czy funkcja białka G_z polega rzeczywiście na hamowaniu cyklazy adenylanowej pozostaje otwarte. Należy tu wziąć pod uwagę, że zarówno αG_z jak i αG_{12} są substratami dla PKC, a więc ich funkcja sygnalizacyjna może być blisko związana z sygnalizacją białek G_q . Analiza dróg sygnalizacji białek z rodziny G_z i G_{12} niewrażliwych na PTX w tkankach, sugeruje, że różne receptory, kanały jonowe jak również PLC są potencjalnymi składnikami tego układu sygnalizacyjnego.

Artykuł otrzymano 29 września 1997 r.

Zaakceptowano do druku 12 kwietnia 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Kwiatkowska J (1995) W: Konarska L (red) Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce, PWN W-wa, str. 104-116
2. Nurnberg B, Gudermann T, Schultz G, (1995) *J Mol Med* 73: 123-132
3. Offermans S, Schultz G (1994) *Moll Cell Endocrinol* 100: 71-74
4. Amatruda TTD, Steele DA, Slepak VZ, Simon

- MJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5587-5591
5. Matsuoka M, Itoh H, Kozasa T, Kaziro Y (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5384-5388
 6. Casey PJ, Fong HKW, Simon MJ, Gilman AG (1990) *J Biol Chem* **265**: 2383-2390
 7. Wilkie TM, Scherie PA, Strathmann MP, Slepak VZ, Simon MJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10049-10053
 8. Parker EM, Kameyama K, Higashijima T, Ross EM (1991) *J Biol Chem* **266**: 519-527
 9. Wong YH, Conklin BR, Bourne HR (1992) *Science* **255**: 339-342
 10. Gilman AG (1987) *Annu Rev Biochem* **56**: 615-649
 11. Hall A, Self AJ (1986) *J Biol Chem* **261**: 10963-10965
 12. Glick J, Santoyo G, Casey PJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 2949-2954
 13. Linder ME, Middleton P, Hepier JR, Taussing R, Gilman AG, Mumby SM (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3675-3679
 14. Wedegaertner PB, Chu DH, Wilson PT, Levis MJ, Bourne JR (1993) *J Biol Chem* **269**: 25001-25008
 15. Veit M, Nurnberg B, Spicher K, Harteneck C, Ponimaskin E, Schultz G, Schmidt MF (1994) *FEBS Lett* **339**: 160-164
 16. Degtyarev MY, Spiegel AM, Jones TLZ (1993) *J Biol Chem* **268**: 23769-23772
 17. Hepler JR, Biddlecome GH, Kleuss C, Camp LA, Hofman SL, Ross EM, Gilman AG (1996) *J Biol Chem* **271**: 496-504
 18. Wilson PJ, Bourne HR (1995) *J Biol Chem* **270**: 9667-9675
 19. Jones TLZ, Simonds WF, Marendino JJ, Brann MR, Spiegel AM (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 508-572
 20. Linder ME, Pang JH, Duronio RJ, Gordon JI, Sternweis PC, Gilman AG (1991) *J Biol Chem* **266**: 4654-4659
 21. Kakame K, Fukada Y, Yoshizawa T, Takao T, Shimonishi Y (1992) *Nature (Lond)* **359**: 749-752
 22. Lounsbury KM, Cacey PJ, Brass LF, Manning DR (1992) *J Biol Chem* **266**: 22051-22056
 23. Kozasa T, Gilman AG (1996) *J Biol Chem* **271**: 12562-12567
 24. Carison KE, Brass LF, Manning DR (1989) *J Biol Chem* **264**: 13298-13305
 25. Lounsbury KM, Schlegel B, Poncz M, Brass LR, Manning DR (1993) *J Biol Chem* **268**: 3494-3498
 26. Fields TA, Casey PJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 21119-21125
 27. Tsu RC, Lai HWL, Allen RA, Wong YH (1995) *Biochem J* **309**: 331-339
 28. Stratham MP, Simon MI (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5582-5586
 29. Pace AM, Wong YH, Bourne HR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7031-7035
 30. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grun-delwald K, Feichtlinger G, Duh QY, Clark OH, Kawasaki E, Bourne (1990) *Science* **249**: 655-659
 31. Field TA, Cacey PJ (1997) *Biochem J* **321**: 561-571
 32. Smrcka AV, Hepier JR, Brown KO, Sternweis PC (1991) *Science* **251**: 804-807
 33. Taylor SJ, Chac HZ, Rhee SG, Exton JH (1991) *Nature* **350**: 516-518
 34. Schnabel P, Schreck R, Schiller DL, Camps M, Gierschik P (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **188**: 1018-1023
 35. Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 16044-16047
 36. Kozasa T, Hepier JR, Smrcka AV, Simon MJ, Rhee SG, Sternweis PC, Gilman AG (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9176-9180
 37. Nakamura F, Kato M, Kameyama K, Nakuda T, Haga T, Kato H, Takenawa T, Kikkawan U (1995) *J Biol Chem* **270**: 6246-6253
 38. Wan Y, Kurosaki T, Huang XY (1996) *Nature (Lond)* **380**: 541-554
 39. Hawes BE, Van Biesen T, Koch WJ, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 17148-17153
 40. Buhl AM, Osawa S, Johnson GL (1995) *J Biol Chem* **270**: 19828-19832
 41. Offermans S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 504-508
 42. Offermans S, Schultz G, Rosenthal W (1991) *J Biol Chem* **266**: 3365-3368
 43. Laugwitz KL, Offermans S, Spicher K, Schultz G (1993) *Neuron* **10**: 233-242
 44. Wange RL, Smrcka AV, Sternweis PC, Exton JH (1991) *J Biol Chem* **266**: 11409-11412
 45. Dhanasekaren N, Prasad MV, Wadsworth SJ, Dermott JM, Van Rossum G (1994) *J Biol Chem* **269**: 11802-11806
 46. Voyno-Yasenetskaya T, Conklin BR, Gilbert RL, Hooley R, Bourne HR, Barber DL (1994) *J Biol Chem* **269**: 4721-4724
 47. Aragay AM, Collins LR, Post GR, Watson AJ, Feramisco JR, Brown JH, Simon MJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 20073-20077
 48. Chan AM, Fleming TP, McGovern ES, Chedid M, Miki T, Aaronson SA (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 762-768
 49. Xu N, Bradley L, Ambdukar J, Gutkind JS (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6741-6745
 50. Voyno-Yasenetskaya TA, Pace AM, Bourne HR (1994) *Oncogene* **9**: 2559-2565
 51. Kozasa T, Gilman AG (1995) *J Biol Chem* **270**: 1734-1741
 52. Singer WD, Miller RT, Sternweis PS (1994) *J Biol Chem* **269**: 19796-19802
 53. Taussig R, Gilman AG (1995) *J Biol Chem* **270**: 1-4
 54. Tang WJ, Gilman AG (1992) *Cell* **70**: 869-872
 55. Tsu RC, Chan JS, Wong YH (1995) *J Neurochem* **64**: 2700-2707
 56. Chan JS, Chiu TT, Wong YH (1995) *Biochem J* **309**: 331-339
 57. Tsu RC, Allen RA, Wong YH (1995) *J Neurochem* **65**: 2682-2689
 58. Butkerait P, Zheng Y, Hallak H, Graham TE, Miller HA, Burris KD, Molinoff PB, Manning DR (1995) *J Biol Chem* **270**: 18691-18699
 59. Gollasch M, Kleuss C, Hescheler J, Witting B, Schultz G (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6265-6269
 60. Sanchez-Biazquez P, Juarros JL, Martinez-pena Y, Castro MA, Garzon J (1993) *Life Sci* **53**: pl381-pl386
 61. Sanchez-Biazquez P, Garzon J (1994) *Life Sci* **55**: pl445-pl450
 62. Garzon J, Martinez-Pena Y, Sanchez-Biazquez P (1994) *Life Sci* **55**: pl219-pl250
 63. Wong XH, Chan JS, Yung LY, Bourne HR (1995) *Oncogene* **10**: 1927-1933
 64. Goretzki PE et al (1992) *World J Surg* **16**: 576-582
 65. Grunicke HH, Maly K (1993) *Crit Rev Oncog* **4**: 389-402



Wydawca prosi
o kontakt tych,

k którzy chcieliby wykorzystać
łamy „Postępów Biochemii”
do reklamowania
swych produktów i usług
związanych z biochemią,
biologią molekularną
i biologią komórki.

Od Redakcji

Uwaga P.T. Czytelnicy

Z przyjemnością zawiadamiamy o ukazaniu się interesującej książki:

Red. naukowy Jerzy Bał

Badanie molekularne i cytogenetyczne w medycynie. Elementy genetyki klinicznej

wyd. 1, 16,5×23,5 cm, s. 272

cena katalogowa 33 zł

Książka przedstawia zastosowania i interpretację badań diagnostycznych z zakresu cytogenetyki i analizy kwasów nukleinowych w medycynie. W części ogólnej omówione zostały podstawy molekularne genetyki, zasady dziedziczenia oraz stosowane metody badawcze. W dalszej części przedstawiono współczesne możliwości wykorzystywania tych metod w diagnostyce chorób genetycznie uwarunkowanych, nowotworów, chorób infekcyjnych oraz w medycynie sądowej. Autorzy poświęcili też miejsce omówieniu najnowszych osiągnięć badań nad genomem człowieka, znaczeniem ich dla medycyny, a także współczesnym możliwościom leczenia i profilaktyki chorób genetycznych. Przedstawiono też problemy etyczno-moralne towarzyszące rozwojowi badań genetycznych oraz regulacje prawne obowiązujące w tej dziedzinie.

Książkę można zamawiać w wydawnictwie Springer PWN, 00-251 Warszawa, ul. Miodowa 10, tel. (022) 828 94 63, fax (022) 821 32-56.

Recenzje książek:

Sarah Benyon, "METABOLISM AND NUTRITION"

Faculty advisor Marek Dominiczak

Series editor Daniel Horton-Szar

Mosby, London, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Tokyo,

Copyright Mosby International Ltd. 1998.

244 pages

ISBN 0 7234 2990 1

Książka jest jedną z kolejnych pozycji oryginalnej serii „Mosby's Crash Course” wydawanej przez wydawnictwo Mosby pod redakcją Daniela Horton-Szar. Jest to rodzaj „bryku” czy też raczej doskonale sporządzonych i opracowanych studenckich notatek (Sarah Benyon z United Medical and Dental Scholls of Guy's and St Thomas's Hospitals, UMDS, London), jednakże pod kontrolą merytoryczną doświadczonego nauczyciela akademickiego w osobie dr Marka Dominiczaka z Uniwersytetu w Glasgow (Faculty Adviser).

Ta zwięzła, licząca zaledwie 230 stron książka jest bardzo dobrym przykładem integracji medycznego nauczania przedklinicznego i klinicznego. Podkreśla ona bardzo wyraziście kliniczne implikacje biochemii i na pewno wskaże i ułatwi studentom przyswojenie szczególnie tych aspektów biochemii, które mają największe znaczenie dla dalszego nauczania klinicznego. Całość ujęta jest w cztery części.

Część I, licząca 147 stron, zatytułowana „Processes of Metabolism and Nutrition” zaznajamia czytelnika z podstawami metabolizmu jako całości, głównymi szlakami metabolicznymi i ich regulacją. Ostatni z rozdziałów poświęcony odżywianiu omawia bilans energetyczny organizmu człowieka i rolę odżywczą białek, witamin i składników mineralnych naszej diety.

Część II, „Clinical Assessment” licząca 29 stron, omawia systematycznie badanie kliniczne pacjenta ze zwróceniem specjalnej uwagi na objawy mogące wskazywać na istnienie zaburzeń metabolicznych. Omówione jest zebranie wywiadu i badanie fizykalne w tym także ocena stanu odżywiania pacjenta; objawy występujące w różnych chorobach metabolicznych są analizowane pod kątem diagnostyki różnicowej. W kolejnym rozdziale omówione są wyniki podstawowych badań laboratoryjnych i obrazowych.

W części III, „Basic Pathology” na 37 stronach omówiono najczęściej spotykane w praktyce klinicznej

zaburzenia metaboliczne takie jak cukrzyca i inne zaburzenia metabolizmu węglowodanów oraz zaburzenia gospodarki lipidowej. Dalej omawiane są zaburzenia w przemianach aminokwasów, puryn i pirymidyn oraz hemu. Odrębny rozdział poświęcony jest stanom chorobowym będącym następstwem nieprawidłowego odżywiania w zakresie białek, witamin i substancji mineralnych.

Część IV, „Self-assessment” na 12 stronach zawiera 50 wielowyborowych pytań testowych z odpowiedziami; 20 pytań nadających się do wykorzystania na egzaminie ustnym i 10 pytań problemowych przeznaczonych do opracowania pisemnego lub także do egzaminu ustnego. Pozwala to studentowi dokonać samodzielnie oceny swoich wiadomości i stanowi dodatkowy materiał do ostatniej powtórki przed prawdziwym egzaminem.

Bardzo istotnym walorem książki jest jej szata graficzna znakomicie ułatwiająca szybki dostęp do poszukiwanych informacji i zapamiętywanie tego co jest najważniejsze. Poza biało-czarnym drukiem książka operuje w różnym natężeniu jedynie kolorem fioletowym. Liczne i bardzo czytelnie skonstruowane rysunki i schematy ułatwiają zrozumienie i pozwalają na ograniczenie tekstu do absolutnie niezbędnego minimum. Wiele zagadnień przedstawionych jest skrótowo i porównawczo w formie tabelarycznej. W każdym rozdziale czytelnik znajdzie specjalnie graficznie wyróżnione pola z pytaniami sprawdzającymi zrozumienie czytanego tekstu (ang. Check Boxes) i stwierdzenia skierowujące uwagę na przyswojenie podstawowych koncepcji i zagadnień (ang. Hints and Tips Boxes). Indeks haseł umożliwia bardzo szybki dostęp do poszukiwanej informacji.

Książka przeznaczona jest w pierwszym rzędzie dla studentów medycyny przygotowujących się do egzaminu z biochemii, a także z interny. Jej szczególną zaletą jest pokazanie studentom, że podstawowa biochemia nie jest nauką teoretyczną ale mocno osadzoną w praktyce klinicznej. Na pewno nie powinna być traktowana jako podstawowy podręcznik do nauki ale niewątpliwie może bardzo ułatwić zrozumienie wykładów, wyłowienie tego co najważniejsze i wreszcie pozwoli na szybką powtórkę obszernego materiału przed egzaminem. Jestem przekonany, że także wykładowcom dostarczy cennych wskazówek jak można zainteresować biochemią przyszłych lekarzy i jak bardzo zwięźle i syntetycznie przedstawić metabolizm człowieka w integracji z odżywianiem. Jeżeli ukaże się niebawem tłumaczenie tej książki na język polski to nie wątpię, że znajdzie wielu nabywców i stanie się sukcesem wydawniczym.

*Prof. dr hab. med. Wiesław Makarewicz
Katedra i Zakład Biochemii
Akademii Medycznej w Gdańsku*

Bardzo potrzebna i bardzo udana...

„Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie. Elementy genetyki klinicznej”.

Pod redakcją Jerzego Bala. Wyd. Springer PWN, Warszawa 1998, Wyd. I. ISBN 83-866376-12-9

W tytule recenzji mowa jest o książce. Jest ona niewielka, a napisało ją wielu autorów. Jeżeli chce się, a niewątpliwie taki był zamiar Redaktora całości Jerzego Bala, dostarczyć potrzebującym zwięzłego tekstu, na wysokim poziomie, traktującego o wielu stronach problemu zasygnalizowanego w tytule – trzeba zaprosić do współpracy wybitnych specjalistów, bo tylko oni wiedzą jak przedstawić trudne, często kontrowersyjne, zagadnienia w najistotniejszych ich aspektach. Proszę wyobrazić sobie rozdział „Podstawy genetyki molekularnej” (J. Bal, J. A. Siedlecki) zajmujący zaledwie 14 stron: znaleziono tu miejsce dla schematów, rysunków i tabeli, nie użyto zbędnych słów. Każdy kto pisał teksty o ograniczonej objętości, wie jak trudno jest taki stan osiągnąć.

Kolejne rozdziały bieżą zgodnie z logiką tytułu – następny traktuje o centralnym problemie genomiki, czyli o „Genomie człowieka” (J. Bal, E. Bocian) na podstawie najnowszych danych o sekwencjonowaniu genomu człowieka, przedstawionych na tle osiągnięć genomiki w badaniu mniejszych genomów. To jest ten rozdział, który trzeba będzie pisać od nowa przy każdym nowym wydaniu książki, czego Autorom i Redaktorowi życzę.

Rozdziały „Zmienność i dziedziczność” (J. Bal, E. Bocian) i „Zasady dziedziczenia” (J. Bal, T. Mazurczak), mimo ogólnie brzmiących tytułów traktują o sygnalizowanych zjawiskach wychodząc z przykładów z zakresu genetyki człowieka, i ludzkich chorób dziedzicznych. Fotografie uzupełniają spotykany już wcześniej typ ilustracji.

I tyle wprowadzenia w temat. Teraz następuje opis współcześnie dostępnych „Metod badania kwasów nukleinowych” (J. Bal), umożliwiających badania ludzkiego genomu, włącznie z sekwencjonowaniem genów, a także mapowaniem i identyfikacją genów, które muszą poprzedzić poznanie sekwencji. Zgodnie z tytułem, czytelnik zostaje następnie zapoznany z najważniejszymi „Metodami badań cytogenetycznych” (E. Bocian, J. Limon), w tym z technikami analizy, po poznaniu kariotypu, poszczególnych chromosomów.

Zestaw opisanych metod pozwala na cytologiczną i/lub molekularną charakterystykę chorób dziedzicznych, o których traktuje kolejny rozdział. „Choroby dziedziczne” (J. Bal, E. Bocian, S. L. Chojnowska, T. Mazurczak) omawiający wcześniej sygnalizowane przypadki w sposób systematyczny. Wielką zaletą tego rozdziału jest zaproszenie jako autorów badaczy, którzy w codziennej pracy omawiane choroby diagnozują i charakteryzują od strony genotypu fenotypu. Dlatego też rozdział ilustrują wyniki własnych badań autorów, co czyni go wiarygodnym i osobistym. Ta cecha wydaje mi się szczególnie ważna dla potencjalnych czytelników z polskiego środowiska lekarskiego – dokumentuje bowiem nasze możliwości w zakresie diagnostyki cytologicznej i molekularnej.

Teraz następuje stosunkowo, jak na tę książkę, długi rozdział, „Choroby nowotworowe” (J. Limon, J. A. Siedlecki), ale też traktuje o bardzo trudnym problemie, o którym jeden z autorów (J. A. S.) jeszcze kilka lat temu powiedział mi prywatnie, że jest niezwykle trudno, wręcz niemożliwe, opisać go odpowiedzialnie z pozycji molekularnych, nie mówiąc już o stwarzaniu nadziei pacjentom i onkologom na proste i szybkie rozwiązania terapeutyczne. Sytuacja uległa częściowej poprawie, zwiększyła się bowiem od tamtej naszej rozmowy liczba wyjaśnionych pytań, dotyczących zjawisk trudnych do interpretacji. Bogatsze jest dziś nasze rozumienie procesów życia i śmierci poszczególnych komórek, procesów leżących u podstaw autonomicznego istnienia nowotworu w organizmie (angiogeneza, przerzuty). Rozwinęła się szczegółowa diagnostyka molekularna wielu chorób nowotworowych – od czegoś w racjonalnym projektowaniu terapii trzeba zacząć. I w omawianej książce autorzy przystąpili do określania perspektyw „Prognozowania i leczenia chorób genetycznie uwarunkowanych” (J. Bal, J. A. Siedlecki) – tekst ten nie bez przyczyny należy do najkrótszych w całej książce, nie buduje nadmiernych nadziei i złudzeń. Somatyczna terapia genowa wciąż jeszcze istnieje bardziej w wyobraźni inżynierów genetycznych niż kierowników klinik i szpitali.

Ostatnie rozdziały poświęcone są wybranym szczegółowym problemom: „Antygeny krwinek białych i płytkowych” (E. Brojer), rozdział wiążący się z molekularnymi problemami transplantologii, „Analiza DNA w medycynie sądowej” (P. Kozioł), temat ważny i znany szerokiej publiczności z informacji prasowych tu uzyskuje naukowe wytłumaczenie i argumentację. „Diagnostyka chorób infekcyjnych i inwazyjnych” (N. Pieniążek) napisana jest przez polskiego biologa molekularnego pracującego od wielu lat w Centrum Kontroli Chorób w Atlancie (USA). Pisząca te słowa miała okazję słuchania świetnych wykładów Normana Pieniążka, które uświadomiły, i mnie i pozostałym słuchaczom jak odpowiedzialną pracę wykonują badacze w laboratorium przez niego kierowanym, pracę, od której wyników prawie zawsze zależy czyjeś życie, co trudno zrozumieć ludziom po prostu analizującym „jakiś DNA”.

Nie byłoby pełnego wymiaru tej książki, gdyby na koniec nie wypowiedział się prawnik: „Prawo a dylematy współczesnej genetyki” (M. Safjan). Autor, związany z polskimi i europejskimi agendami prawniczymi najwyższej rangi, nie raz wypowiadał się otwarcie, iż genetyka jest zbyt ważną dziedziną działań naukowych, aby można ją było zostawić samym tylko genetykom. Marek Safjan powtórzył to stwierdzenie w kwietniu 1998 r., na prezentacji polskim mediom deklaracji UNESCO dotyczącej integralności ludzkiego genomu (listopad 1997 r.). Najważniejsza chyba konkluzja tej deklaracji głosi, że dobro i szacunek dla praw człowieka muszą być stawiane wyżej, niż prawo do wolności badań naukowych.

Recenzowana książka ukazała się z wyprzedzeniem w stosunku do działań dydaktycznych w polskich uczelniach medycznych. To bardzo rzadki przypadek, kiedy wydawnictwo w typie podręcznika wyprzedza potrzeby wykładowców i studentów. To wyprzedzenie jest jednak dalece pozorne. Piszę o tym z niekłamany bólem, ponieważ mam od 20 lat dydaktyczny kontakt z przyszłymi lekarzami i widzę, jak narasta niezaspokojona potrzeba tych młodych ludzi, którzy będą nas leczyć w przyszłym stuleciu, na wiedzę i praktykę w zakresie medycyny molekularnej. Nie wiem jak długo jeszcze polskie Akademe Medyczne mogą się tłumaczyć brakiem funduszy na nauczanie przyszłych lekarzy wiedzy o ludzkich genach, genomie i chorobach związanych z patologiami tych genów.

Na razie PWN wydało dwie świetne książki: „Genom ludzki” pod red. W. Krzyżosiaka (1997) i omawiane „Molekularne badania...” pod redakcją J. Bala. Przynajmniej myślący student medycyny może teraz sięgnąć do tych potrzebnych książek.

*Prof. dr hab. Magdalena Filkus
Profesor w Instytucie Biologii Biochemii i Biofizyki, PAN
Przewodnicząca Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN*

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

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Redakcja „Postępów Biochemii” z przyjemnością informują, że wkrótce ukaze się dodatkowy, specjalny zeszyt naszego kwartalnika poświęcony osobie i życiu Jakuba Karola Parnasa, profesora Chemii Lekarskiej w Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie w latach 1920-1941 – patrona dorocznej nagrody naszego Towarzystwa za najlepsze prace doświadczalne, wykonane w kraju.

Zeszyt obejmuje materiały biograficzne przedstawione podczas pierwszej Konferencji Parnasowskiej we Lwowie w 1996 roku oraz liczne wspomnienia i relacje dawnych studentów Profesora, uczniów i asystentów, przedstawiające Jego osobowość i losy w latach 1941-1949, a także nadzieję, że Uniwersytet Jagielloński będzie mógł powołać Go na Katedrę Biochemii.

W zeszycie znajdują się też odnośne dokumenty oraz fotografie Profesora z różnych okresów Jego życia.

Przewidujemy, że prenumeratorzy „Postępów Biochemii” z roku 1997 otrzymają zeszyt specjalny w jej-sieni br.

Innych zainteresowanych prosimy o kontakt.

BioCentrum Kraków Instytutu Biologii Doświadczalnej Uniwersytetu Jagiellońskiego informuje:

Wychodząc naprzeciw potrzebom krajowego środowiska naukowego oraz biorąc pod uwagę konieczność pełniejszego wykorzystania posiadanej nowoczesnej aparatury badawczej Uniwersytet Jagielloński utworzył: Biocentrum-Kraków. Formacja ta skupia obecnie sześć laboratoriów badawczych (Chemii Białek, Wysokorozdzielczej Spektrometrii Masowej, Biochemii Kwasów Nukleinowych, Cytometrii Przepływowej i Mikroskopii Konfokalnej), które wyposażone w najnowocześniejszą aparaturę podjęły się pełnić funkcje usługowe oraz szeroko pojęte doradztwo metodyczno-naukowe w zakresie nauk biomolekularnych obejmujących biochemię, biologię i chemię strukturalną, biologię komórki i genetykę molekularną.

*Uniwersytet Jagielloński
Instytut Biologii Molekularnej
BioCentrum Kraków
31-120 Kraków
Al. Mickiewicza 3
Fax: (012) 633-69-07
e-mail: dubin@mol.uj.edu.pl
Doc. dr hab. Adam Dubin*



Pokwitowanie dla wpłacającego

zł
słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł
słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł
słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego



Pokwitowanie dla wpłacającego

zł
słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł
słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł
słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę
zł

podpis przyjmującego

Prenumerata POSTĘPÓW

BIOCHEMII rok 1998

dla nie zrzeszonych w PTBioch 30 zł

dla członków PTBioch 15 zł

dla instytucji 60 zł

Składka P.T.Bioch.

za rok 1998 20,— zł

studenci 7,— zł

Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

