

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE



PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 50, NR 1, 2004

Mini-tRNA.	2
Nośniki materiału genetycznego	11
Rybozomy HDV	19
Białka szoku zimna	32
Defekty replikacji mtDNA	45
Działanie hormonów tarczycy	57
Inteiny	69
Endoglikozydazy.	82



Rudolf Stefan Weigl
1883-1957

**W latach międzywojennych profesor mikrobiologii w Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie
Twórca szczepionki przeciw tyfusowi plamistemu**

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa, Poland
tel/fax 658-20-99
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl
www.ptbioch.edu.pl

REDAKTOR SENIOR

Senior Editor
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03

REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02

REDAKTORZY

Editors
KRYSZYNA GRZELAK
DANUTA HULANICKA
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
ANDRZEJ KASPRZAK
LILIANA KONARSKA
ANNA SZAKIEL
ADAM SZEWCZYK

BIURO REDAKCJI

Editorial office
SEKRETARZ
Secretary
HANNA LASKOWSKA
poniedziałki, czwartki
monday—thursday
14—16
tel. 589-24-41
SKŁAD I ŁAMANIE
Typesetting
MAŁGORZATA BASAJ

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
EWA BARTNIK (Warszawa)
ANNA PRZYKORSKA (Warszawa)
ZOFIA SZWEJKOWSKA-
KULIŃSKA (Poznań)
WIESŁAW H. TRZECIAK (Poznań)
MACIEJ UGORSKI (Wrocław)
GRZEGORZ WĘGRZYN (Gdańsk)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: postepy@nencki.gov.pl

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Mini-tRNA jako narzędzie identyfikacji elementów struktury tRNA odpowiedzialnych za aminoacylację

Mini-tRNA as a tool for identification of tRNA structural ele-
ments responsible for aminoacylation

KAMILA BĄKOWSKA, BEATA DUDZIŃSKA-BAJOREK, TOMASZ
TWARDOWSKI

2

Biofizyczne podstawy skuteczności syntetycznych nośników materiału genetycznego

Biophysical properties as indicator of gene carrier transfection
efficiency

MAREK LANGNER, ANDRZEJ OKRUSZEK.

11

Rybozomy wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV)

Hepatitis delta virus (HDV) ribosymes

MICHAŁ ŁĘGIEWICZ, JERZY CIESIOŁKA.

19

Białka szoku zimna mikroorganizmów

Microbial cold shock proteins

AGNIESZKA KAUFMAN, MARIANNA TURKIEWICZ.

32

Choroby mitochondrialne wywołane zaburzeniami w komuni- kacji między genomem jądrowym i organellarnym

Mitochondrial disorders caused by defects of intergenomic
communication

ALICJA TRĘBIŃSKA, PAWEŁ GOLIĆ

45

Molekularny mechanizm działania hormonów tarczycy

Molecular mechanism of thyroid hormone action

LIDIA ZABROCKA, JERZY KLIMEK.

57

O inteinach: ich budowie, ewolucji i zastosowaniach

About inteins: their structure, evolution and applications

MARTA SAWCZAK, ZOFIA SZWEJKOWSKA-KULIŃSKA

69

Endoglikozydazy i glikoamidazy

Endoglycosidases and glycoamidases

ANNA STYPUŁKOWSKA, PIOTR ZWIERZ, KRZYSZTOF ZWIERZ.

82

Mini-tRNA jako narzędzie identyfikacji elementów struktury tRNA odpowiedzialnych za aminoacylację

Mini-tRNA as a tool for identification of tRNA structural elements responsible for aminoacylation

KAMILLA BĄKOWSKA¹, BEATA DUDZIŃSKA-BAJOREK²,
TOMASZ TWARDOWSKI³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mini-tRNA a inne komponenty układu translacyjnego
- III. Elementy tożsamości cząsteczki tRNA a konstruowanie mini-tRNA
- IV. Wybrane przykłady zastosowań mini-tRNA
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AA-tRNA — aminoacylo-tRNA; aaRS — syntetaza aminoacylo-tRNA; D-tRNA — deacylowany tRNA; miejsce A — miejsce wiązania aminoacylo-tRNA; miejsce E — miejsce wiązania deacylowanego tRNA; miejsce P — miejsce wiązania peptydylo-tRNA; P-tRNA — peptydylo-tRNA; tRNA^{AA} — cząsteczka tRNA specyficzna względem określonego aminokwasu

I. Wstęp

W procesie biosyntezy białka dochodzi do skoordynowanej współpracy wielu makrocząsteczek: mRNA, tRNA, enzymów aktywujących, czynników translacyjnych i rybosomów. Cząsteczki tRNA są elementem łączącym podstawową jednostkę składową białka, czyli aminokwas, z informacją genetyczną zakodowaną w mRNA. W strukturze trzecio-

Contents:

- I. Introduction
- II. Mini-tRNA and other components of translational machinery
- III. Elements of tRNA identity and construction of mini-tRNA
- IV. Selected examples of application of mini-tRNA
- V. Summary

rzędowej tRNA wyróżniamy dwie główne domeny: I — domenę akceptorową (nazwaną domeną minihelisy, w skład której wchodzi ramię akceptorowe oraz pętla TΨC) oraz II — domenę antykodonową, zbudowaną z ramienia i pętli antykodonowej oraz ramienia i pętli DHU (Ryc. 1 A). Wiele dowodów wskazuje na to, że te dwie domeny tRNA powstały niezależnie od siebie w procesie ewolucji [1]. Każda z domen tRNA oddziałuje z innymi częściami rRNA rybosomu. Ponadto, przynajmniej 10 syntetaz aminoacylo-tRNA jest zdolnych do aminoacylacji helikalnych substratów RNA odpowiadających całej domenie I lub tylko jej fragmentowi. Takie substraty nazywa się odpowiednio mini- lub mikrohelisami [2-6]. Są one skutecznym narzędziem pomocnym w wielu aspektach badań dotyczących procesów zachodzących na rybosomie. Badania takie mogą dotyczyć przykładowo interakcji między syntetazami aminoacylo-tRNA a cząsteczką tRNA (proces aminoacylacji tRNA), poszczególnych etapów translacji, korelacji struktury i funkcji rybosomu, a także roli poszczególnych fragmentów tRNA w biosyntezie białka. Zastosowanie mini-tRNA posłużyło również do zwery-

¹Mgr, ²mgr, ³prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, tel. (61) 852-85-03, fax. (61) 852-05-32, e-mail: twardows@ibch.poznan.pl

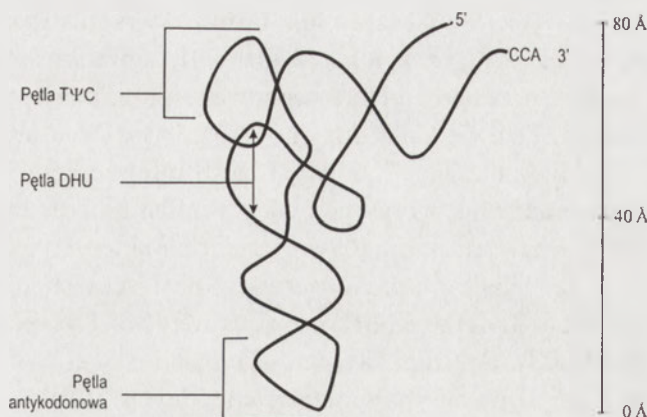
fikowania hipotezy o ewolucyjnym pochodzeniu syntetaz aminoacylo-tRNA. Ciekawym zagadnieniem jest również zastosowanie mini-tRNA do badań oddziaływań tRNA — rRNA w rybosomie. Wykluczając z cząsteczki tRNA pewne fragmenty można uzyskać nowe informacje na temat interakcji poszczególnych domen tRNA z ważnymi funkcjonalnie miejscami rRNA biorącymi udział w procesie translacji. Jednakże użycie mini-tRNA w pracach eksperymentalnych wymaga prawidłowo zaplanowanego modelu minimalnej cząsteczki tRNA, tak aby była ona aktywna w procesie aminoacylacji. Konieczne jest zatem przeanalizowanie elementów strukturalnych tRNA, które są niezbędne aby cząsteczka ta specyficznie wypełniała swoją funkcję. Dlatego ważne jest poznanie reguł, jakich należy przestrzegać przy konstrukcji mini-tRNA. Do przedstawienia tego problemu wybrano kilka przykładów zastosowań mini-tRNA.

II. Mini-tRNA a inne komponenty układu translacyjnego

II-1. Budowa i funkcja cząsteczki tRNA

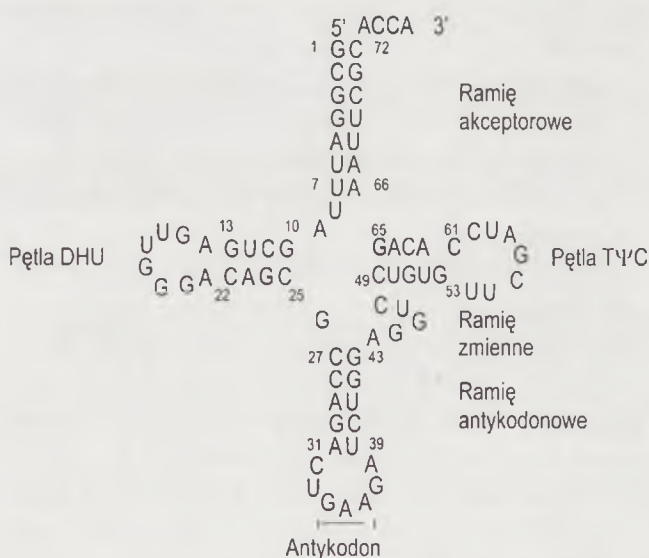
Cząsteczki tRNA charakteryzują się specyficznym ułożeniem nukleotydów i określoną strukturą przestrzenną. Pomimo tego, że dana cząsteczka tRNA jest specyficzna wyłącznie dla określonego aminokwasu, struktura wszystkich tRNA jest zbliżona. W strukturze drugorzędowej przyjmuje ona postać „liścia koniczyny” (Ryc. 1 B) a w trzeciorzędowej wszystkie cząsteczki tRNA przypominają kształtem literę L (Ryc. 1 A). Cząsteczki tRNA zawierają wiele nietypowych, modyfikowanych zasad, zazwyczaj 7-15 na molekułę, co stanowi około 10 — 20% wszystkich nukleotydów. Dla przykładu, tRNA^{Phe} z drożdży zawiera 11 zmodyfikowanych zasad, z czego większość stanowią pochodne metylowane, na przykład 2-metylo-guanozyna, O^{2'}-metylo-cytydyna, czy 1-metylo-adenozyna. Wśród nietypowych zasad tRNA^{Phe} znajdują się również: 5,6-dihydrourydyna oraz pseudourydyna, które są charakterystyczne dla wszystkich cząsteczek tRNA [7].

W strukturze drugorzędowej tRNA można wyróżnić pięć zasadniczych regionów, (tworzących wspomniane już wcześniej dwie główne domeny). Są to: 1. domena akceptorowa, składająca się z ramienia i pętli akceptorowej, z charakterystyczną sekwencją 5'-CCA-3' do której przyłączany zostaje aminokwas; 2. domena antykodonowa (ramię i pętla antykodonowa);



Ryc. 1A. Struktura cząsteczki tRNA — układ przestrzenny i wymiary.

3. domena dihydrourydyny (ramię i pętla DHU);
4. domena TΨC zbudowana z ramienia oraz pętli, w której występuje charakterystyczny układ zasad: rybotymidyna, T; pseudourydyna, Ψ; oraz cytozyna, C;
5. ramię zmienne znajdujące się pomiędzy domeną antykodonową a domeną TΨC.



Ryc. 1 B. Struktura drugorzędowa cząsteczki tRNA z drożdży specyficznej względem fenyloalaniny (tRNA^{Phe}).

II-2. Syntetazy aminoacylo-tRNA

Zasadniczym etapem w procesie translacji jest selekcja tRNA przez syntetazy aminoacylo-tRNA (aaRS). Enzymy te determinują poprawność wyboru aminokwasu w biosyntezie białka. Ich podstawową funkcją jest swoiste rozpoznanie a następnie kataliza dwuetapowej reakcji estryfikacji tRNA. Enzymy te podzielono na dwie klasy, zgodnie z obecnością w

nich krótkich charakterystycznych sekwencji aminokwasowych [8, 9]. Małe aminokwasy są z reguły rozpoznawane przez syntetazy klasy II, aminokwasy większe oraz bardziej hydrofobowe — przez enzymy klasy I. Te dwie klasy enzymów różnią się strukturą domeny białkowej. W klasie I aaRS miejsce katalityczne enzymu tworzy pięć na przemian ułożonych helis α , tzw. struktura Rossmanna. Charakterystyczne są dwie ultrakonserwatywne sekwencje: His-Leu-Gly-His (HIGH) oraz Lys-Met-Ser-Lys-Ser (KMSKS). Centrum aktywne syntetaz klasy II tworzy siedem antyrównolegle ułożonych struktur β -daszkowych oraz trzy helisy α . Występują w nim trzy zdegenerowane motywy sekwencyjne. Różny jest również sposób rozpoznawania tRNA przez obie grupy syntetaz aminoacylo-tRNA. Enzymy klasy I łączą się z tRNA od strony jego małej bruzdy, natomiast syntetazy klasy II (z wyjątkiem PheRS) w jego dużej bruzdzie.

II-3. Funkcja rybosomów

Podstawową funkcją rybosomów wszystkich organizmów jest biosynteza polipeptydów. Na rybosomie, w trakcie elongacji łańcucha polipeptydowego mają miejsce trzy zasadnicze procesy:

1. rozpoznanie mRNA — tRNA poprzez oddziaływanie kodon — antykodon;
2. tworzenie wiązania peptydowego;
3. przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu (translokacja).

Ponad czterdzieści lat temu Watson i Crick zaproponowali pierwszy mechanizm biosyntezy peptydu na rybosomie postulujący istnienie dwóch miejsc: A — do którego przyłącza się tRNA niosący aminokwas (AA-tRNA) oraz P — w którym zlokalizowany jest peptydylo-tRNA (P-tRNA). Zgodnie z tym modelem, związanie kolejnego AA-tRNA uwalnia deacylowany tRNA, natomiast w rybosomie znajduje się P-tRNA. Klasyczny model dwumiejscowy został zastąpiony przez model trójmiejscowy wraz z odkryciem miejsca E (miejsce wyjścia, ang. *exit site*) przez Nierhaua i współpracowników [10]. W 1990 roku Nierhaus opisał model, w którym postulował większą liczbę miejsc aktywnych na rybosomie i bardziej złożone mechanizmy translacji. Jest to allosteryczny model trójmiejscowy translacji (ang. *allosteric three-site model*) [11, 12]. Charakteryzuje się on obecnością na rybosomie zawsze dwóch cząsteczek tRNA, znajdujących się w odmiennych stanach translokacyjnych. W stanie pretranslokacyjnym, w miejscu A znajduje się AA-tRNA, natomiast w miejscu P znajduje się

P-tRNA. W stanie posttranslokacyjnym obsadzone są również dwa miejsca i są to: miejsce P przez P-tRNA oraz miejsce E przez deacylowany tRNA (D-tRNA). Drugą charakterystyczną cechą modelu trójmiejscowego jest wzajemne allosteryczne oddziaływanie między miejscami A i E. Zgodnie z definicją allosterii, następuje zmiana struktury cząsteczki (w tym przypadku fragmentu rybosomu) powodująca zmianę powinowactwa do ligandu (czyli do tRNA). W przypadku procesu elongacji efekt allosterii objawia się tym, że AA-tRNA zmienia strukturę rybosomu obniżając powinowactwo deacylowanego tRNA do miejsca E i odwrotnie, jeżeli deacylowany tRNA zlokalizowany jest w miejscu E, to w miejscu A występuje obniżone powinowactwo do AA-tRNA. Dzięki dowodom sugerującym istnienie dwóch dodatkowych hybrydowych miejsc wiązania, A/P oraz P/E [13] oraz więcej niż jednego miejsca E [14] zaproponowano istnienie kilku (siedmiu lub więcej) miejsc wiązania tRNA na rybosomie [15].

Biosynteza białka, skomplikowany i wieloetapowy proces, jest koordynowana przez złożoną strukturę rybosomu, składającą się z białek i kwasów nukleinowych. Oba komponenty są funkcjonalne i aktywne w tym procesie.

III. Elementy tożsamości cząsteczki tRNA a konstruowanie mini-tRNA

Zasadniczym etapem biosyntezy białka jest rozpoznanie tRNA przez syntetazy aminoacylo-tRNA. Selekcja odpowiedniego tRNA do acylacji określonym aminokwasem odbywa się poprzez utworzenie unikatowego, specyficznego kompleksu [tRNA — syntetaza AA-tRNA]. Dla określenia swoistości tego procesu używa się określeń rozpoznanie i identyczność (tożsamość) tRNA [16].

Rozpoznanie odnosi się do identyfikacji danego tRNA przez odpowiednią syntetazę dzięki specyficznym elementom strukturalnym tRNA.

Identyczność (tożsamość) tRNA jest pojęciem szerszym, określającym aktywność akceptorową tRNA, obejmującym pozytywne i negatywne elementy rozpoznania (determinanty, ang. *positive elements of recognition*) (antydeterynanty, ang. *negative elements of recognition*) [17]. Obecność elementów rozpoznania i identyczności związana jest z faktem, że do kompleksu rybosomalnego przenoszony jest każdy AA-tRNA przez czynnik elongacyjny EF1 (w układzie prokariotycznym EF Tu-Ts), a o wbudowaniu do nowosyntetyzowanego polipeptydu decyduje interakcja kodon-antykodon. A zatem aminokwas nie jest już traktowany przez system jako ele-

ment rozpoznania i poprawności procesu translacji. Dlatego konieczne są inne elementy warunkujące poprawność odczytu informacji genetycznej.

III-1. Determinanty cząsteczki tRNA

Determinanty (elementy pozytywne rozpoznania), wprowadzone do innej cząsteczki tRNA powodują zmianę specyficzności tej molekuly. Po raz pierwszy opisano je w przypadku tRNA^{Ala} *E. coli*. W cząsteczce tRNA^{Ala} determinantą jest para zasad utworzona przez guanozynę w pozycji 3 i urydynę w pozycji 70 (G3:U70) [2]. Wykazano, że po zastąpieniu naturalnie występujących w tych pozycjach nukleotydów w cząsteczkach tRNA^{Phe}, tRNA^{Cys} oraz tRNA^{Lys} na parę G3:U70, obserwowano obecność alaniny w tworzących się białkach [18]. Podobne badania przeprowadzono też z udziałem tRNA^{Cys} *E. coli*. Substytucja antykodonu metioninowego CAU w cząsteczce tRNA^{Met} *E. coli* przez antykodon cysteinowy GCA prowadziła do inicjacji translacji przez zmutowaną cząsteczkę tRNA. Po zsekwencjonowaniu uzyskanego białka okazało się, że cysteina stanowiła ponad połowę aminokwasów na końcu N. Dodatkowo, zamiana nukleotydu A 73 w inicjatorowym tRNA^{Met} *E. coli* na zasadę występującą w tRNA^{Cys} *E. coli* (U73) powodowała wbudowywanie w tworzone białko cysteiny zamiast formylometioniny w ponad 90% przypadków [19].

W przypadku, gdy w pozycji odpowiadającej determinancie wystąpi mutacja, wówczas należy się spodziewać gwałtownego spadku poziomu aminoacylacji takiej cząsteczki tRNA lub nawet jej całkowitego braku, w związku z nieobecnością odpowiednich wiązań wodorowych [20]. W przypadku tRNA^{Ala} *E. coli* tolerowana jest co prawda zmiana par G2:C71 na U:A. Mogłoby to sugerować, że para znajdująca się w pozycjach 2 i 71 nie jest determinantą. Jednak w przypadku minihelisy alaninowej substytucja tej pary zasad jest wystarczająca aby wyeliminować aminoacylację nawet w przypadku obecności innej determinanty, pary G3:U70. Podobnie w przypadku tRNA^{Met} *E. coli* substytucja par G2:C71 oraz C3:G70 eliminuje aminoacylację [4].

Można wysunąć również następujący wniosek: im więcej w danej cząsteczce tRNA znajduje się determinant, tym poszczególne determinanty mają mniejsze znaczenie. Słuszne byłoby wówczas założenie, że kiedy liczba elementów krytycznych jest mała, wówczas siła działania poszczególnych determinant jest wysoka. Jeśli silne determinanty są zlokalizowane w ramieniu akceptorowym cząsteczki tRNA, to pełnej długości tRNA mógłby być z powodzeniem

zastąpiony przez minihelisy imitujące ten rejon. W przypadku tRNA, w którym elementy stanowiące o tożsamości mają różną siłę i są rozproszone w cząsteczce, niewiele wiadomo o oddziaływaniach pomiędzy nimi.

Ponadto należy wyróżnić determinanty główne (ang. *major*) i poboczne (ang. *minor*) [4]. Jednak takie rozróżnienie nie jest łatwe i często bywa subiektywne. Za główne uważa się takie elementy, których nieobecność prowadzi do znaczących efektów, obserwowanych *in vitro* jako zmniejszenie stopnia aminoacylacji oraz *in vivo* jako supresję. Natomiast determinanty poboczne mają umiarkowany efekt i regulują specyficzność aminoacylacji. Te drugie elementy mogą działać poprzez mechanizmy pośrednie.

Elementy krytyczne w cząsteczce tRNA to w większości przypadków standardowe nukleotydy [21, 22]. Nukleotydy modyfikowane są determinantami aminoacylacji w przypadku tRNA specyficznych względem Ile, Glu i Lys w *E. coli* oraz Ile w drożdżach. Te modyfikacje są zlokalizowane wyłącznie w pętli antykodonowej.

Determinanty aminoacylacji są odmienne dla tRNA rozpoznawanych przez syntetazy klasy I i II (Tabela 1) [21]. Dla przykładu, pozycja 37 w pętli antykodonowej jest elementem krytycznym wyłącznie dla tRNA aminoacylowanych przez syntetazy klasy I. Natomiast zasada znajdująca się w pozycji 73 oraz trzy nukleotydy antykodonu są elementami krytycznymi i uniwersalnymi dla wszystkich cząsteczek tRNA. Stwierdzono, że dla niektórych tRNA dodatkowe determinanty znajdują się również w innych pozycjach domeny antykodonowej (tRNA^{Met} lub tRNA^{Val} *E. coli*) a dla innych — poza tą domeną, na przykład dla tRNA^{Gly} *E. coli* jest to para zasad znajdujących się w pozycjach 2 i 71 a dla tRNA^{Ala} *E. coli*, jak już wzmiankowano, jest to para zasad w pozycjach 3 i 70 [2]. Istnieje również pogląd, że w cząsteczkach tRNA rozpoznawanych przez enzymy klasy II elementem tożsamości jest dość długa pętla zmienna [23]. Jednak istnieją wyjątki od tej reguły. Przykładem jest tRNA^{Leu} *E. coli*, dla którego specyficzna syntetaza należy do klasy II, jednak w tej cząsteczce ramię zmienne nie jest elementem krytycznym. Ciekawym przykładem jest również cząsteczka tRNA^{His} *E. coli*, w której po zsekwencjonowaniu znaleziono jeden dodatkowy nukleotyd na końcu 5', oznaczony jako (G-1). Okazało się również, że para (G-1):C73 na końcu akceptorowym tRNA pełni zasadniczą rolę w procesie aminoacylacji [24].

Determinanty mogą być rozproszone w całej długości cząsteczki tRNA, jak to ma miejsce w przy-

padku tRNA^{Ser}, tRNA^{Arg} oraz tRNA^{Phe} z *E. coli*, jak również tRNA^{Phe} i tRNA^{Asp} z drożdży [21]. Mogą być również skoncentrowane w obrębie dwóch lub

ciekawe, zapobieganie aminoacylacji tRNA przez niespecyficzne syntetazy, nie jest ograniczone jedynie do enzymów tej samej klasy (Tabela 2).

Tabela 1

Determinanty aminoacylacji tRNA rozpoznawanych przez syntetazy aminoacylo-tRNA klasy I oraz II, opracowana na podstawie [21]

KLASA ENZYMU	tRNA	Determinanty <i>E.coli</i> zlokalizowane w:			Determinanty <i>S.cerevisiae</i> zlokalizowane w:		
		Ramię akceptorowe	Pętla antykodonowa	Pozostałe regiony	Ramię akceptorowe	Pętla antykodonowa	Pozostałe regiony
I	Val	A 73 G 3 : C 70 U 4 : A 69	A 35 C 36	-	A 73	A 35	-
	Met	A 73 G 2 : C 71 C 3 : G 70 U 4 : A 69 A 5 : U 68	C 34 A 35 U 36	-	A 73	C 34 A 35 U 36 4 pętla AC	Ramię D
	Ile	A 73 C 4 : G 69	A 35 U 36 A 37 A 38	-	-	I 34 A 35 U 36	-
	Gln	G 73 U 1 : A 72 G 2 : C 21 G 3 : C 70	Y 34 U 35 G 36 A 37 U 38	G 10	-	-	-
II	His	C 73 G 1	antykodon	-	A 73 G 1	G 34 U 35	-
	Lys	A 73	U 34 U 35 U 36	-	-	-	-
	Phe	A 73	G 34 A 35 A 36 G 27 : C 43 G 28 : C 42	U 20 G 44 U 45 U 59 U 60	A 73	G 34 A 35 A 36	G 20
	Gly	U 73 G 1 : C 72 C 2 : G 21 G 3 : C 70	C 35 C 36	-	A 73 C 2 : G 21 G 3 : C 70	C 35 C 36	-
	Ala	A 73 G 2 : C 21 G 3 : U 70 G 4 : C 69	-	G 20	G 3 : U 70	-	-

tylko jednej z dwóch zasadniczych części cząsteczki tRNA, wyróżnionych na podstawie struktury trzeciorzędowej.

III-2. Antydeterminanty cząsteczki tRNA

Tożsamość cząsteczki tRNA nie jest dyktowana jedynie obecnością pozytywnych elementów umożliwiających rozpoznanie przez specyficzną syntetazę. Istnieją również elementy negatywne, antydeterminanty, które uniemożliwiają błędną aminoacylację. W procesie regulowania bezbłędności biosyntezy polipeptydu są one równie ważnym czynnikiem jak determinanty.

Antydeterminantami mogą być pojedyncze lub sparowane zasady azotowe, zlokalizowane na całej długości cząsteczki tRNA. Pierwsza antydeterminanta została odkryta w tRNA^{Ile} *E. coli*, gdzie zaobserwowano, że modyfikacja zlokalizowana na atomie węgla zasady azotowej w pozycji 34 zapobiega błędnej aminoacylacji tRNA^{Ile} przez syntetazę specyficzną dla tRNA^{Met} [20]. Inny modyfikowany nukleotyd, to jest 1-metyloguanozyna w pozycji 37 (m¹G37) odgrywa podobną rolę w drożdżowym tRNA^{Asp} i zapobiega aminoacylacji przez ArgRS. Co

Cząsteczki tRNA, które są substratami dla syntetaz aminoacylo-tRNA klasy I zawierają antydeterminanty przeciwko enzymom klasy II (tRNA^{Leu}/SerRS) i odwrotnie (tRNA^{Asp}/ArgRS) [26].

Pomimo tego, iż znanych jest jedynie kilka różnych antydeterminant, prawdopodobne jest, że ich występowanie nie jest ograniczone do kilku systemów. Najprawdopodobniej wszystkie tRNA zawierają antydeterminanty przeciwko kilku syntetazom. Enzym PheRS rozpoznaje i aminoacyluje z dużą wydajnością tRNA^{Asp} do którego wprowadzono główne determinanty fenyloalaniny [27].

III-3. Specyfika struktury przestrzennej cząsteczki tRNA

Elementem tożsamości tRNA może być również specyficzna struktura tej cząsteczki. Na przykład, dla poprawnej aminoacylacji tRNA^{Ser} *E. coli* konieczny jest rejon zmienny, gdzie występuje nietypowa para Levitt'a G15:G48 [28]. Natomiast dla prawidłowej acylacji drożdżowego tRNA^{Asp} konieczne są trzeciorzędowe oddziaływania pary zasad G10:U25 z G45 [29]. Optymalna efektywność procesu aminoacylacji często leży w zachowaniu specyficznych cech struk-

ture pnia tRNA. Dla rozpoznania przez GlnRS lub AlaRS *E. coli* oraz PheRS drożdży ważny jest region zmienny i odpowiednia długość pętli D. W drożdżowym inicjatorowym tRNA^{Met} istotnym elementem są wzajemne oddziaływania między pętlą T i pętlą D. Z drugiej strony, syntetazy mogą w pewnym

owych cząsteczek mini-tRNA, specyficznie aminoacylowanych przez określone aminokwasy, przedstawiono na Rycinach 2-5.

Przewidywanie funkcji minimalnych substratów zawierających determinanty aminoacylacji badano po raz pierwszy z użyciem systemu tRNA *E. coli* spe-

Tabela 2

Antydeterminanty aminoacylacji tRNA rozpoznawanych przez syntetazy aminoacylo-tRNA klasy I oraz II, opracowana na podstawie [21]

ANTYDERMINANTA	W cząsteczce tRNA	Przeciwno aaRS
G 3 : U 70	tRNA ^{Ala} (drożdże)/ II	ThrRS/ II
U 30 : G 40	tRNA ^{Ile} (drożdże)/ I	GlnRS/ I LysRS/ II
U 34	tRNA ^{Ile} (drożdże)/ I	MetRS/ I
L 34	tRNA ^{Ile} (<i>E. coli</i>)/ I	MetRS/ I
A 36	tRNA ^{Arg} (<i>E. coli</i>)/ II	TrpRS/ I
G 37	tRNA ^{Ser} (drożdże)/ II	LeuRS/ I
m ¹ G 37	tRNA ^{Asp} (drożdże)/ II	ArgRS/ I
A 73	tRNA ^{Leu} (człowiek)/ I	SerRS/ II

stopniu tolerować zmiany w strukturze swoich substratów. Takie zmiany mogą polegać na braku modyfikacji nukleotydów lub na zamianie rybonukleotydów na ich odpowiedniki z serii deoksy. W większości systemów takim zmianom towarzyszy zmniejszenie efektywności aminoacylacji.

Szczególne cechy struktury przestrzennej cząsteczki tRNA określane mianem architektury są w znacznie mniejszym stopniu uwzględniane przy konstruowaniu struktur mini-tRNA. Jest to zapewne jedną z przyczyn zdecydowanie niższej aktywności biologicznej mini-tRNA w porównaniu do macierzystych cząsteczek.

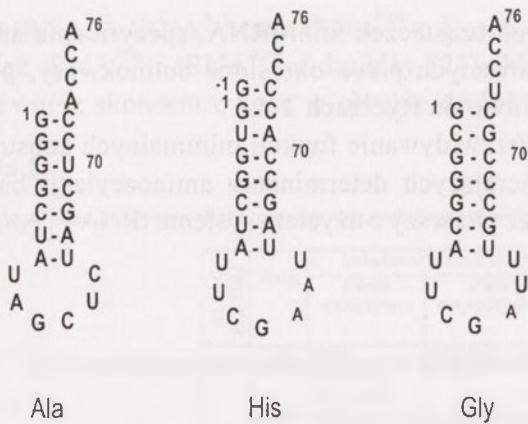
IV. Wybrane przykłady zastosowań mini-tRNA

Stwierdzono, że proces aminoacylacji może skutecznie zachodzić zarówno z minihelisą jako substratem (a więc dla domeny akceptorowej cząsteczki tRNA [30]), jak i ze strukturami zawierającymi jedynie fragment tej domeny (mikrohelisy lub krótsze substraty, tzw. „tetraloops” zbudowane jedynie z pnia oraz czteronukleotydowej pętli). O ile mini- i mikrohelisy zakończone są pętlą zbudowaną z siedmiu nukleotydów, to tzw. „tetraloops” posiadają pętle krótsze, złożone, jak już wspomniano wcześniej, jedynie z czterech nukleotydów. Natomiast dupleksy, to jest fragmenty podwójnej nici kwasu nukleinowego, nie zawierają pętli, a również mogą być aktywne w procesie aminoacylacji. Struktury przykład-

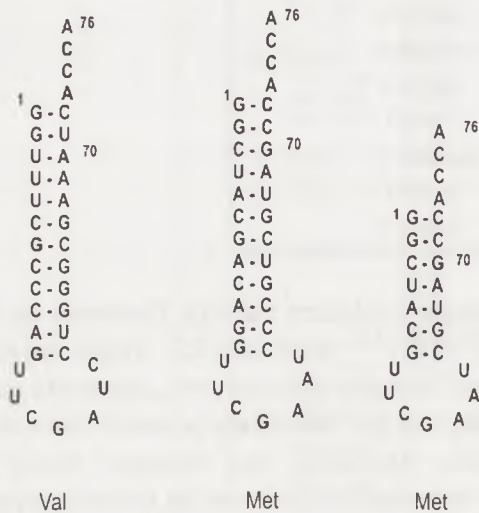
cyficznego względem alaniny. Ponieważ do rozpoznania tRNA^{Ala} przez AlaRS wystarczająca jest obecność domeny akceptorowej, pozostała część tej molekuly nie jest istotna dla procesu aminoacylacji. Tak więc minihelisy oraz mniejsze helisy naśladowujące domenę akceptorową, są dostatecznymi substratami dla aminoacylacji przez AlaRS *E. coli* [31].

Minihelisy specyficzne względem His z *E. coli* zawierające determinanty aminoacylacji dla histydyny okazały się również dobrymi substratami dla specyficznej syntetazy. Przeciwnie, minihelisa^{Ser} jest słabym ale za to specyficznym substratem dla SerRS *E. coli*. Niska aktywność minihelisy serynowej jest najprawdopodobniej związana z brakiem długiego odcinka pętli zmiennej w tej cząsteczce, elementu odpowiedzialnego za rozpoznanie SerRS [30].

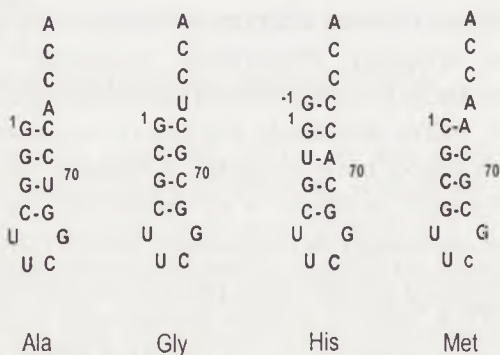
Minihelisy zbudowane z ramienia akceptorowego tych tRNA, których główne determinanty zlokalizowane są w antykodonie, na przykład tRNA specyficznego względem tryptofanu, metioniny, argininy, glicyny i waliny [19], powinny być nieaktywne podczas aminoacylacji. Jednak takie minihelisy w większości przypadków ulegają aminoacylacji, aczkolwiek na niskim poziomie [21]. Przyłączenie do takiego konstrukt pętli antykodonowej zwiększa stopień aminoacylacji w przypadku minihelis otrzymanych z tRNA^{Ile} z *E. coli* oraz drożdżowego tRNA^{Val}. Przeciwnie, dodanie antykodonu do minihelisy Asp *E. coli* nie wywiera takiego efektu na aminoacylację. Mini- i mikrohelisy uzyskane z tRNA^{Ile} *E. coli* są również wydajnie aminoacylowane przez IleRS, po-



Ryc. 2. Przykładowe struktury mikrohelisy specyficznie aminoacylowanych przez alaninę, histydynę i glicynę, na podstawie [4].

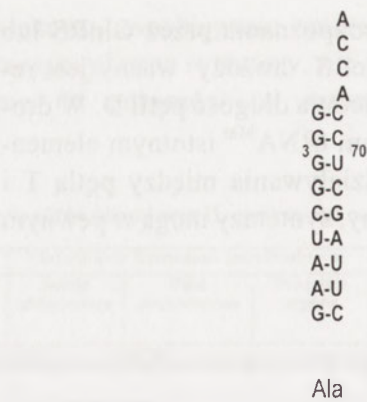


Ryc. 3. Przykładowe struktury minihelisy specyficznie aminoacylowanych przez walinę oraz metioninę, na podstawie [4].



Ryc. 4. Przykładowe struktury "tetraloops" specyficznie aminoacylowanych przez alaninę, glicynę, histydynę oraz metioninę, na podstawie [4].

mimo tego, że zawierają jedynie część determinant, a główne determinanty znajdują się w ramieniu antykodonowym. Stąd też wniosek, że aminoacylacja niekoniecznie wymaga obecności głównych determinant. Aczkolwiek wydajność procesu aminoacylacji jest wówczas wyraźnie niższa (w przypadku mini-tRNA^{Val} obserwuje się 6×10^5 -krotne obniżenie aktywności aminoacylacji w porównaniu z pełnej długości tRNA^{Val} [17]).



Ryc. 5. Przykładowa struktura dupleksu specyficznie aminoacylowanego przez alaninę, na podstawie [4].

Generalnie, minimalne struktury RNA ulegające aminoacylacji przez syntetazy klasy II są poddawane temu procesowi z większą efektywnością niż te, które są aminoacylowane przy użyciu syntetaz należących do klasy I. Taka sytuacja może być odbiciem pochodzenia klasy II syntetaz, które są ewolucyjnie starsze od enzymów klasy I [8, 32].

Dla tRNA, których elementy tożsamości o różnej sile rozproszone są w całej długości cząsteczki, niewiele wiadomo na temat wzajemnego powiązania między tymi elementami oraz o roli determinant pobocznych. Bardzo dobrym modelem do badania tego zagadnienia jest system tRNA^{Val}. Aminoacylacja przez drożdżową syntetazę walinylo-tRNA (ValRS) wymaga nie tylko obecności determinant zlokalizowanych w antykodonie, ale również przynajmniej jednej z pozostałych determinant zlokalizowanych w dużej odległości od pętli antykodonowej. Specyficzną rolę determinant pobocznych badano z użyciem minihelisy naśladującej domenę akceptorową drożdżowego tRNA^{Val}. Aby zbadać funkcjonalne oddziaływanie między dyskryminantami pobocznymi a wybranymi głównymi zastosowano helisę naśladującą domenę antykodonową. Badania te wykazały, że minihelisy skonstruowane na podstawie domeny akceptorowej drożdżowego tRNA^{Val} skutecznie ulegały aminoacylacji. Aminoacylacja minihelisy była dodatkowo stymulowana po dodaniu helisy zawierającej fragment domeny antykodonowej [20].

Szczególnie wiele badań prowadzono z użyciem mini-tRNA^{Met}. Wiadomo, że monomeryczna forma syntetazy tRNA metioninowego u *E. coli* na końcu C posiada segment, który oddziałuje z antykodonem tRNA^{Met}. Ta interakcja jest główną determinantą specyficznej aminoacylacji katalizowanej przez MetRS. Koniec ten oddziałuje również z miejscem gdzie odbywa się aktywacja aminokwasu. Dlatego sugerowano, że koniec C syntetazy aminoacylo-metionylowej mógł w drodze ewolucji być tak wykształcony, aby

integrować rozpoznanie antykodonu tRNA^{Met} z aktywacją metioniny. Kim i Schimmel (1992) wykazali, że wewnętrzne delecje, które uniemożliwiają oddziaływania z antykodonem, nie mają żadnego wpływu na parametry kinetyczne aktywacji metioniny. Co więcej, enzym z delecją pewnego wewnętrznego fragmentu był niezdolny do aminoacylacji mikrohelisy RNA utworzonego na podstawie ramienia akceptorowego tRNA^{Met}. Na podstawie uzyskanych w tych badaniach rezultatów zasugerowano, że w przypadku syntetazy tRNA^{Met} aktywacja aminokwasu i aminoacylacja helisy akceptorowej są funkcjonalnie powiązane i są niezależne od miejsca wiązania w antykodonie [33].

Jako substraty procesu aminoacylacji, z powodzeniem stosowano również wspomniane mniejsze substraty zawierające czteronukleotydową pętlę oraz krótki pień sparowanych nukleotydów (ang. *tetraloops*). W swoich badaniach Shi, Martinis i Schimmel (1992) zastosowali pętle RNA z ramieniem o długości 4 par zasad. Wprowadzono do nich determinanty dla rozpoznania przez syntetazy klasy II. Uzyskano specyficzną aminoacylację alaniną, glicyną i histydyną. Poprzez analizy parametrów kinetycznych aminoacylacji wykazano, że dla systemu alaninowego, stabilizacja układu uzyskiwana przez oddziaływania tRNA — syntetaza może być również uzyskana przez interakcje syntetazy z nukleotydami w mini-tRNA. Obserwowano również specyficzną aminoacylację katalizowaną przez syntetazy klasy I (MetRS) z użyciem substratów zbudowanych z pnia i pętli czteronukleotydowych, opartych na sekwencji ramienia akceptorowego tRNA^{Met}. W tych badaniach przeanalizowano cztery różne przykłady, kiedy specyficzna aminoacylacja jest uzyskiwana przy udziale struktur zawierających mniej nukleotydów niż połowa długości na jaką przypada 1 obrót helisy RNA [3].

Ciekawych wyników dostarczyły również badania z użyciem syntetazy leucylo-tRNA (LeuRS) *E. coli*, która aminoacyluje sześć różnych izoakceptorowych molekuł tRNA^{Leu}. Każda z nich ma odmienny antykodon oraz różni się składem nukleotydowym w poszczególnych częściach tRNA. Próby skonstruowania minihelisy RNA, która byłaby skutecznie aminoacylowana przez LeuRS, okazywały się nieskuteczne. W 2002 roku Larkin i współpracownicy opisali najmniejszy analog tRNA^{Leu}, który ulegał aminoacylacji. W tym celu skonstruowano serię analogów tRNA^{Leu} z różnymi kombinacjami domen, które następnie stopniowo usuwano z tych cząsteczek. Minimalne RNA, które były aminoacylowane przez LeuRS z dużą efektywnością, były po-

zbawione pętli antykodonowej i ramienia zmiennego. Pozostały tylko ramię D oraz ramię T. Gdy do pełnej długości cząsteczki tRNA wprowadzono mutację zamieniającą dyskryminującą zasadę A73 na C73 lub kiedy zakłócano trzeciorzędowe interakcje między pętlą D i T, wówczas aminoacylacja nie zachodziła. To prowadzi do wniosku, że te elementy tożsamości tRNA^{Leu} również funkcjonują w mini-tRNA^{Leu}. Konstrukty ulegające aminoacylacji badano również pod kątem uwalniania aminokwasu przez syntetazę, dla tego procesu ramię antykodonowe oraz zmienne również okazały się nieistotne. Takie rezultaty sugerują, że dla LeuRS krytycznymi elementami w procesie aminoacylacji tRNA^{Leu} i odysocjowania leucyny od syntetazy są ramię D oraz T [23].

Dla syntetazy alanylo-tRNA (AlaRS) wydajnymi substratami do aminoacylacji okazały się również dupleksy RNA, które imitują domenę akceptorową tRNA^{Ala} *E. coli*. Jedną z determinantów procesu utworzenia kompleksu [tRNA^{Ala}-AlaRS] jest, jak już wspomniano, para zasad G2:C71 [28, 29]. Beuning i współpracownicy określali efektywność aminoacylacji dupleksów^{Ala} zawierających substytucje tej krytycznej pary zasad. Zgodnie z ich wynikami, zasadnicza dla pozytywnego rozpoznania jest nie tylko sama para zasad, G2:C71, ale również orientacja tej pary odgrywa w rozpoznaniu ogromną rolę. Po podstawieniu G2:C71 na inną parę pirymidyna 2:puryna 71 obserwowano spadek poziomu aminoacylacji w porównaniu z parą puryna 2:pirymidyna 71 [29].

Badania procesu aminoacylacji z użyciem mini-tRNA mają również znaczenie z punktu widzenia ewolucji. Wiadomo, że selekcja specyficznego tRNA jest determinowana przez odpowiednie domeny strukturalne, które stanowią różne regiony w cząsteczce tRNA. Syntetaza CysRS *E. coli* posiada domeny, które rozpoznają tRNA zawierające U73, antykodon GCA oraz specyficzną strukturę trzeciorzędową rogu litery L, której kształt przybiera cząsteczka tRNA [19]. Enzym z *E. coli* nie jest zdolny do rozpoznania drożdżowego lub ludzkiego tRNA^{Cys}, co sugeruje ewolucję determinantów aminoacylacji od *E. coli* przez drożdże do człowieka i koevolucję domen syntetazy, które oddziałują z tymi elementami. Poprzez modyfikowanie tRNA^{Cys} z drożdży i człowieka tak, aby były one rozpoznawane przez enzym *E. coli*, Lipman i Hou zidentyfikowali determinanty w tRNA, które są ważne dla aminoacylacji, a które uległy dywergencji w procesie ewolucji. Zaproponowali również, że domena syntetazy, która rozpoznaje U73 jest konserwatywna ewo-

lucynie. Domena rozpoznająca róg „litery L” tRNA uległa dywergencji wcześniej, natomiast domena oddziałująca z antykodonem GCA uległa dywergencji najpóźniej [32].

Użycie mini-tRNA może również przysłużyć się do zgłębienia mechanizmu selekcji aminokwasów podczas aminoacylacji. Takie badania prowadził między innymi Jakubowski [34]. Stosował on w swoich badaniach oprócz minihelis również koenzym A (CoA-SH). Jest to przenośnik grup acylowych, które w połączeniu z nim są substratami syntetaz wszystkich klas. Koenzym A działa jako analog tRNA. Jakubowski wykazał, że syntetaza izoleucylo-tRNA *E. coli* jest zdolna do aminoacylacji CoA-SH z użyciem nie tylko izoleucyny, ale również waliny, leucyny, treoniny, alaniny i seryny. Syntetaza tRNA^{Val} katalizowała aminoacylację CoA-SH przez walinę, treoninę, alaninę, serynę i izoleucynę. Natomiast syntetaza LysRS skutecznie aminoacylowała CoA-SH następującymi aminokwasami: Lys, Leu, Thr, Ala, Val i Ile. Wszystkie wymienione syntetazy: IleRS, ValRS oraz LysRS zachowują się jak syntetazy z „rozluźnioną selektywnością aminokwasową”. Przeciwnie, minihelisy RNA utworzone z pętli akceptorowej tRNA^{Ile} oraz tRNA^{Val} były aminoacylowane wyłącznie przez specyficzne syntetazy. Te wyniki są poparciem hipotezy, że dzisiejsze syntetazy aminoacylo-tRNA powstały z wcześniejszych form, które uczestniczyły w syntezie białka zależnej od tioestrów [34].

V. Podsumowanie

Prace badawcze przeprowadzane z użyciem minimalnych struktur tRNA przyczyniły się do wyjaśnienia wielu procesów zachodzących z udziałem cząsteczki tRNA. Dzięki zastosowaniu minihelis, mikrohelis czy mniejszych struktur uzyskano wiele cennych informacji na temat aminoacylacji tRNA i mechanizmu funkcjonowania tej cząsteczki. Skuteczność ich stosowania uzasadnia prowadzenie dalszych badań, które miałyby na celu lepsze zrozumienie procesów mających miejsce na rybosomie.

Artykuł otrzymano 10 kwietnia 2003
Zaakceptowano do druku 22 marca 2004

Piśmiennictwo

1. Chihade J W, Schimmel P (1999) *PNAS* 96:12316-12321
2. Schimmel P (1991) *FASEB J* 5:2180-2187
3. Shi J, Martinis S A, Schimmel P (1992) *Biochem* 31:4931-4936
4. Musier-Forsyth K, Schimmel P (1993) *FASEB J* 7:282-289
5. Schimmel P, Fabrega C, Farrow M, Hendrickson T A, Kelley S O, Morales A J, Nordin B, Nomanbhoy T, de Pouplana R L, Swairjo M, Tamura K, Turner J R, Wakasugi K, Wang C, de Crecy-Lagard V, Slike B, Abraham A, Nangle L, Oesreich S (1999) *Scientific Report 1998-1999* The Skaggs Institute For Chemical Biology
6. Ramaswamy K, Wei K, Suga H (2002) *NAR* 30:2162-2171
7. Shi H, Moore P (2000) *RNA* 6:1091-1105
8. de Pouplana L R, Schimmel P (2001) *Cell* 104:191-193
9. Kamińska M, Zakrzewska A, Madajka M, Barciszewski J (2002) *Post Bioch* 48:189-199
10. Rheinberger H J, Sternbach H, Nierhaus K H (1981) *PNAS* 78 (9):5310-5314
11. Nierhaus K H (1990) *Biochem* 29:4997-5008
12. Burkhardt N, Jünemann R, Spahn C M, Nierhaus K H (1998) *Crit Rev in Bioch and MolBiol* 33:95-149
13. Moazed D, Noller H F (1989) *Nature* 342:142-148
14. Lill R, Robertson J M, Wintermeyer W (1986) *Biochem* 25:3245-3255
15. Green R, Noller H F (1997) *Ann Rev Biochem* 66:679-716
16. Barciszewska M, Barciszewski J (1992) *Post Bioch* 38 (4):171-178
17. Frugier M, Florentz C, Giegé R (1992) *PNAS* 89:3990-3994
18. McClain W, Foss K, Jenkins R, Schneider J (1991) *PNAS* 88:9272-9276
19. Pallanck L, Li S, Schulman L H (1992) *J Biol Chem* 267 (11):7221-7223
20. Frugier M, Helm M, Felden B, Giegé R, Florentz C (1998) *J Biol Chem* 273 (19):11605-11610
21. Giegé R, Sissler F, Florentz C (1998) *NAR* 26 (22):5017-5035
22. Yarian C, Townsend H, Czestkowski W, Sochacka E, Malkiewicz A, Guenther R, Miskiewicz A, Agris P (2002) *J Biol Chem* 277 (19):16391-16395
23. Larkin D C, Williams A M, Martinis S A, Fox G E (2002) *NAR* 30 (10):2103-2113
24. Himeno H, Hasegawa T, Ueda T, Watanabe K, Miura K, Shimizu M (1989) *NAR* 17 (19):7855-7863
25. Uhlenbeck O, Lowary P, Wittenberg W (1982) *NAR* 10:3341-3352
26. Breitschopf K, Achsel T, Busch K, Gross H J (1995) *NAR* 23:3633-3637
27. Perret V, Florentz C, Puglisi J D, Giegé R (1992) *J Mol Biol* 226:323-333
28. Himeno H, Hasegawa T, Ueda T, Watanabe K, Shimizu M (1990) *NAR* 18:6815-6819
29. Hou Y-M, Westhof E, Giegé R (1993) *PNAS* 90:6776-6780
30. Schimmel P, Giegé R, Moras D, Yokoyama S (1993) *PNAS* 90:8763-8768
31. Buening P, Nagan M, Cramer C, Musier-Forsyth K, Gelpi J-L, Bashford D (2002) *RNA* 8:659-670
32. Limpan R S, Hou Y-M (1998) *NAR* 26 (23):13495-13500
33. Kim S, Schimmel P (1992) *J Biol Chem* 267:15563-15567
34. Jakubowski H (2000) *J Biol Chem* 275 (45):34845-34848

Kompleksy lipidowe jako nośniki materiału genetycznego

Lipid complexes as carriers for genetic material

MAREK LANGNER¹, ANDRZEJ OKRUSZEK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Tworzenie agregatów zawierających kwasy nukleinowe
- III. Stabilność agregatów w płynach fizjologicznych
- IV. Pokonanie bariery krew-tkanka
- V. Penetracja tkanki
- VI. Specyficzność komórkowa
- VII. Pokonanie bariery błony cytoplazmatycznej
- VIII. Transport DNA wewnątrz komórki; rola układu immunologicznego
- IX. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. The formation of aggregates containing nucleic acids
- III. The stability of aggregates in physiological fluids
- IV. Overcoming the blood-tissue barrier
- V. Tissue penetration
- VI. Cell specificity
- VII. Overcoming the plasma membrane barrier
- VIII. DNA transport inside the cell; the role of the immunological system
- IX. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: CD (40,80,86) – (ang. *cluster of differentiation*) kompleks różnicowania (cząsteczki kostymulacyjne o charakterze receptorów powierzchniowych); C_pG-oligonukleotydy (DNA) – oligonukleotydy (DNA) zawierające dimeiry *deoksycytidyna-deoksyguanozyna* w odpowiednim otoczeniu sekwencyjnym (*motyw C_pG*); ERK – (ang. *extracellular-signal regulated proteins*) kinazy regulowane przez czynniki zewnątrzkomórkowe; JNK – (ang. *c-Jun-N-terminal kinases*) kinazy N-końca c-Jun; IL (6, 10, 12, 18) – (ang. *interleukins*) interleukiny; komórki NK – (ang. *natural killer cells*) naturalne komórki cytotoksyczne N (zdolne do spontanicznego zabijania komórek nowotworowych); MAPK – (ang. *mitogen-activated protein kinases*) kinazy białkowe aktywowane przez mitogen; MHC – (ang. *major histocompatibility complex*) główny układ zgodności tkankowej; TNF – (ang. *tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworu

I. Wstęp

Od kilku już lat podejmowane są próby zastosowania wielkocząsteczkowych biomolekuł jako pre-

paratów farmakologicznych. Terapie oparte na specyfikach białkowych oraz pojawienie się możliwości zastosowania terapii genowej wymagają wprowadzenia do organizmu makromolekuł, których zachowanie się w organizmie, z racji rozmiarów, nie podlega prostym prawom dystrybucji, a czas działania ograniczony jest ich efektywnym rozpoznawaniem i eliminowaniem [1-3]. Jednym ze sposobów systemowego stosowania takich makromolekuł opiera się na ich asocjacji z innymi cząsteczkami. Powstały w ten sposób agregat chroni aktywne substancje przed hydrolizą enzymatyczną oraz umożliwia osiągnięcie przynajmniej częściowej specyficzności tkankowej i komórkowej [4, 5]. Dobranie odpowiednich składników agregatu pozwala dodatkowo na kontrolę czasu trwania czynnika aktywnego w tkance docelowej. Strategia ta opiera się na doświadczeniach zdobytych przy stosowaniu supramolekularnych nośników leków niskocząsteczkowych, wykorzystywanych w terapiach przeciwnowotworowych oraz w leczeniu systemowych infekcji grzybiczych [6, 7].

Farmakologiczne zastosowania agregatów supramolekularnych wiąże się z problemami jakościowymi różnymi od tych, jakie występują przy zastosowaniach tradycyjnych farmaceutyków. Leki niskocząsteczkowe podlegają prawom klasycznej far-

¹Dr hab., Instytut Fizyki, Politechnika Wrocławska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław oraz Międzyuczelniane Centrum Biotechnologii Agregatów Lipidowych, Wrocław;
²prof. dr hab. Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Łódź oraz Instytut Chemii i Ochrony Środowiska, Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Częstochowa

makokinetiki, która oparta jest na założeniu niespecyficznego dystrybucji substancji aktywnej w organizmie. Selektowność oddziaływania leku jest wynikiem powinowactwa do wybranej cząsteczki (np. enzymu, receptora czy kwasu nukleinowego), zależności stężenia od czasu w tkance docelowej, wielkości dawki oraz sposobu podania. W przypadku zastosowania agregatów supramolekularnych pojawia się szereg dodatkowych czynników, które istotnie wpływają na ich zachowanie w organizmie. Do czynników tych należy np. rozmiar agregatu oraz jego ewolucja w czasie, zarówno pod względem składu, jak i topologii. Czynniki te komplikują farmakologiczne zastosowanie agregatów, z drugiej jednak strony stwarzają dodatkowe możliwości wpływania na jego dystrybucję w organizmie [8-11].

Celem niniejszego artykułu jest zwrócenie uwagi na znaczenie właściwości biofizycznych syntetycznych nośników materiału genetycznego w przewidywaniu ich farmakokinetiki i farmakodynamiki oraz efektywności transfekcji *in vivo*. Poruszane w tej pracy zagadnienia mają szersze zastosowanie i dotyczą wszystkich rodzajów agregacyjnych preparatów farmakologicznych. Zawężenie dyskusji do syntetycznych nośników materiału genetycznego opartych na lipidach (lipopleksy) nie pomniejsza ogólności prezentowanych zagadnień.

Jednym z kluczowych zadań lipopleksu jest ograniczenie ekspozycji kwasu nukleinowego na działanie enzymów oraz, co być może ważniejsze, zapobieganie niezamierzonej aktywacji układu immunologicznego (jest to szczególnie ważne w przypadku gdy nośnikiem informacji genetycznej jest plazmid). Już pod koniec lat 80-tych wykazano, że bakteryjny DNA, w przeciwieństwie do DNA kręgowców, wykazuje *in vitro* bezpośredni efekt immunostymulacyjny na mysie leukocyty [12]. Tego typu aktywacja jest spowodowana obecnością w bakteryjnym DNA licznych sekwencji dinukleotydowych C_pG, które w genomie kręgowców występują czterokrotnie rzadziej i są metylowane w pozycji 5 cytozyny. Taką samą immunostymulację mogą także wywołać syntetyczne oligonukleotydy, zawierające dinukleotydy C_pG w odpowiednim otoczeniu sekwencyjnym. Badania przeprowadzone w laboratorium Kriega [13] *in vitro* na leukocytach myszy oraz *in vivo*, z użyciem ponad 300 oligonukleotydów o różnych sekwencjach i długościach wykazały, że najsilniejszy efekt immunostymulacyjny wykazują oligonukleotydy zawierające motyw N¹_pN²_pC_p.G_pN³_pN⁴). Oligonukleotydy o długości ponad 8 zasad, zawierające conajmniej jeden tak zdefiniowany „motyw C_pG” wywołują *in vitro*, już w niewielkim

stężeniu, niezależną od limfocytów T, proliferację mysich limfocytów B, przy czym efekt oligonukleotydów o szkieletie tiofosforanowym jest około 200-krotnie silniejszy [13]. Proliferacji limfocytów B pod wpływem oligonukleotydów C_pG towarzyszy sekrecja cytokin klasy Th1 (IL6, IL10, IL12), polireaktywnych immunoglobulin klasy IgM, receptora Fcγ oraz kostymulacyjnych cząsteczek takich jak CD80, CD86 czy MHC klasy II [13, 14]. Oligonukleotydy C_pG powodują bezpośrednią stymulację komórek prezentujących antygen (makrofagów oraz komórek dendrytycznych), które pod ich wpływem wydzielają liczne cytokiny (IL6, IL12, IL18, TNFα) oraz chemokiny (IP-10, MIP-1α,β, MCP-1) [14]. Ponadto, poddane działaniu C_pG-oligonukleotydów komórki dendrytyczne wykazują zwiększoną sekrecję cząsteczek kostymulacyjnych (CD40, CD80, CD86, MHC II) oraz powodują wtórną aktywację limfocytów T [14]. Oligonukleotydy C_pG działają również pośrednio na komórki NK zwiększając ich aktywność lityczną i wywołując sekrecję interferonu γ [15]. Stymulacyjny efekt określonych sekwencji kwasu nukleinowego, poza indukcją elementów układu immunologicznego, może dodatkowo wzmocnić efekt usuwania lipopleksów z krwioobiegu przez komórki żerne oraz elementy komplementu.

Przedstawione powyżej fakty powodują, że nośnik przeznaczony do przenoszenia materiału genetycznego powinien rygorystycznie spełniać następujące warunki:

- jego struktura powinna zapewnić ochronę kwasu nukleinowego przed hydrolizą enzymatyczną;
- powinien posiadać właściwości, które zapobiegają stymulacji układu immunologicznego przez kwas nukleinowy oraz inne składniki agregatu;
- nośnik powinien posiadać skład i właściwości, które umożliwią zamierzoną dystrybucję w organizmie na drodze niespecyficznego akumulacji oraz w wyniku specyficznego oddziaływania z elementami tkanki czy komórek docelowych;
- po wnikięciu do wnętrza komórki docelowej agregat powinien ulec dezintegracji w taki sposób, aby przenoszony materiał genetyczny przedostał się w formie nienaruszonej do jądra komórkowego.

Z wymienionych powyżej warunków wynika, że problem uzyskania wydajnego nośnika jest przedsięwzięciem interdyscyplinarnym i wielowątkowym. Dodatkowe trudności w opracowaniu wydajnego syntetycznego nośnika materiału genetycznego spotęgowane są brakiem wiedzy na temat wielu istotnych kwestii dotyczących zjawisk na poziomie ko-

mórkowym, a zwłaszcza sposobu, w jaki egzogennie dostarczony materiał zachowuje się w cytoplazmie. Istotnym elementem procesu projektowania nośnika dla materiału genetycznego jest powiązanie jego właściwości biofizycznych ze sposobem, w jaki oddziałuje on ze strukturami tkankowymi i komórkowymi po wprowadzeniu do organizmu. Konieczność uwzględnienia oddziaływań na różnym poziomie organizacji (molekularnym, komórkowym, tkankowym i organizmu jako całości) jeszcze bardziej komplikuje zagadnienie. Dotychczasowe próby uzyskania skutecznego preparatu dla celów terapii genowej prowadzone były w sposób fragmentaryczny, tzn. skupione były na jednym lub tylko kilku wybranych zagadnieniach, co nie gwarantowało uzyskania zadowalającego rezultatu. Pomimo tego, osiągnięte do tej pory wyniki znacznie poszerzyły wiedzę dotyczącą molekularnych podstaw powstawania agregatów, ich oddziaływania z komórkami oraz dystrybucji w organizmie. Niewątpliwym postępem osiągnięto w syntezie nowych amfifilowych substancji kationowych, które agregują z kwasem nukleinowym [16, 17]. Opracowano nowe techniki badawcze, które umożliwiają ilościowy opis parametrów biofizycznych agregatów supramolekularnych, takie jak dynamiczne rozpraszanie światła czy korelacyjna spektroskopia fluorescencyjna [18-20]. Rozliczne badania *in vitro* i *in vivo* zaowocowały zunifikowaniem metodologii oceny wnikanía agregatów do komórek oraz pozwoliły zidentyfikować problemy, które należy rozwiązać tak, aby osiągnąć wydajną transfekcję. Najważniejsze z nich to adsorpcja na powierzchni błony plazmatycznej komórki i doprowadzenie do fuzji agregatu z błoną plazmatyczną lub endosomalną. Badania te wspierane są przez rozwój nowych technik obrazowania oraz towarzyszący im postęp w ilościowej analizie obrazu, pozwalającej na śledzenie i analizowanie pojedynczych agregatów po ich wnikięciu do komórki [10, 21, 22].

II. Tworzenie agregatów zawierających kwasy nukleinowe

Kluczowe zagadnienia związane z uzyskaniem efektywnego syntetycznego nośnika materiału genetycznego pojawiają się już na etapie projektowania oraz opracowywania procedur formowania agregatów. Fakt, że właściwości chemiczne i biofizyczne agregatu bezpośrednio determinują sposób, w jaki będzie on oddziałował z tkankami i elementami strukturalnymi komórek, oznacza, że te jego cechy powinny być rygorystycznie określone i dopasowywane do specyficznych wymagań terapii. Procedury

przygotowywania agregatów powinny gwarantować osiągnięcie pożądaných parametrów biofizycznych w sposób powtarzalny i jednorodny w całej ich populacji. Opracowanie wydajnej procedury formowania agregatu, która zapewnia wysoką jakość preparatu jest warunkiem koniecznym jego akceptacji pod względem farmakologicznym.

Opracowanie takiej procedury napotyka na trudności wynikające z dwóch grup, jakościowo różnych, zagadnień. Po pierwsze, nie do końca poznane są mechanizmy, które leżą u podstaw powstawania złożonych kompleksów supramolekularnych. Po drugie, niewiele wiadomo na temat oddziaływań wieloskładnikowych agregatów ze strukturami tkankowymi i komórkowymi. Pierwsza grupa zagadnień rozwiązywana jest na poziomie badań fizykochemicznych i biofizycznych. Badania powinny być prowadzone równolegle do testów w hodowlach komórkowych oraz w powiązaniu z badaniami farmakokinetycznymi i farmakodynamicznymi. Dopiero ściśle powiązanie właściwości biofizycznych oraz składu agregatu z jego zachowaniem w komórkach i dystrybucją w organizmie daje szansę na powodzenia całego przedsięwzięcia.

Samą procedurę formowania kompleksu lipid-kwas nukleinowy można umownie podzielić na dwa etapy: kondensację cząsteczki DNA oraz jej asocjację z pozostałymi składnikami agregatu [23-25]. Cząsteczka kwasu nukleinowego, w formie powszechnie stosowanego plazmidu, jest za duża, aby możliwe było jej wprowadzenia do komórki bez dodatkowych zabiegów. Aby zredukować jej rozmiary geometryczne cząsteczka kwasu nukleinowego poddawana jest procesowi tzw. kondensacji, który opiera się na neutralizacji ujemnego ładunku grup fosforanowych związkami kationowymi (osiągane zmiany wymiarów sięgają często kilku rzędów wielkości) [23]. Skondensowana cząsteczka kwasu nukleinowego jest w dalszym ciągu podatna na hydrolizę oraz dekonduensację w wyniku oddziaływania ze składnikami płynów fizjologicznych [26]. Aby ustabilizować i zabezpieczyć skondensowaną cząsteczkę kwasu nukleinowego opłascza się ją warstwą lub dwuwarstwą lipidową. W praktyce kondensacja i asocjacja z amfifilami przeprowadzane są jednocześnie poprzez zmieszanie DNA z uprzednio przygotowanymi liposomami. Tak przeprowadzony proces agregacji jest trudny do kontrolowania, co powoduje, że powstałe kompleksy są niejednorodne, a ich topologia nie zapewnia pełnej izolacji cząsteczki kwasu nukleinowego od środowiska zewnętrznego. Tym niemniej, kompleksy te są powszechnie stosowane do transfekcji *in vitro* w hodowlach komórkowych [20].

Struktura takich kompleksów zależy zarówno od rozmiarów cząsteczki kwasu nukleinowego, składu frakcji lipidowej, jak i od warunków przeprowadzania agregacji. Brak pełnej kontroli nad formowaniem się agregatu wyklucza jednak tego typu formułacje z zastosowań klinicznych [19, 27].

Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w dziedzinie formowania agregatów o z góry określonej strukturze i parametrach. Inspiracją do opracowania nowej strategii było koncepcyjnie nowe postrzeganie nośnika materiału genetycznego. Najpierw określono kluczowe parametry topologiczne i ich funkcjonalne znaczenie. Założono, że materiał genetyczny nie powinien mieć kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym oraz, że oddziaływanie pomiędzy agregatem a strukturami biologicznymi odbywa się wyłącznie za pośrednictwem jego powierzchni. Te z pozoru oczywiste założenia oraz zaobserwowany fakt doświadczalny, że DNA związany z niewielką ilością kationowego związku amfifilowego staje się hydrofobowy, pozwoliły na zaproponowanie jakościowo różnych technik formowania kompleksów lipid-kwas nukleinowy [11, 25, 28, 29]. Strategia formowania agregatu oparta na tych założeniach stawia sobie za cel rozdzielenie procesów wiodących do powstania wnętrza agregatu zawierającego kwas nukleinowy oraz formowania jego powierzchni, której parametry powinny być podatne na modyfikacje w możliwie szerokim zakresie. Na procedurę tą składa się kilka następujących po sobie, niezależnych etapów, które gwarantują pełną kontrolę nad tworzeniem obu obszarów agregatu niezależnie od siebie. Kolejne kroki procedury przebiegają w następujący sposób:

- roztwór wodny kwasu nukleinowego dodawany jest do lipidu kationowego rozpuszczonego w chloroformie, w wyniku czego powstają dwie nie mieszające się ze sobą fazy;
- dodanie odpowiedniej ilości metanolu powoduje powstanie jednej fazy co umożliwia elektrostatyczne oddziaływanie kwasu nukleinowego z lipidem kationowym; w rezultacie powstają agregaty zawierające skondensowaną cząsteczkę kwasu nukleinowego oraz lipidy kationowe z łańcuchami alkilowymi zwróconymi na zewnątrz, co powoduje, że cały kompleks staje się hydrofobowy;
- dodanie odpowiedniej ilości wody i chloroformu powoduje ponowny rozdział faz, ale tym razem kwas nukleinowy zagregowany z lipidem znajduje się w fazie hydrofobowej; w tym miejscu zakończone jest formowanie jądra agregatu;
- następnie do frakcji hydrofobowej zawierającej agregat lipid-kwas nukleinowy dodawana jest od-

- powiednia mieszanina lipidów, które będą tworzyć zewnętrzną powierzchnię kompleksu;
- dodanie niewielkiej ilości wody oraz odparowanie chloroformu wymusza adsorpcję dodanych lipidów na hydrofobowej powierzchni jądra agregatu.

W wyniku takiej sekwencji działań uzyskuje się agregat, którego rozmiary zależą tylko od wielkości cząsteczki kwasu nukleinowego i czynnika kondensującego (lipid kationowy). Właściwości powierzchni, takie jak ładunek elektrostatyczny, bariera polimerowa czy zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, zdeterminowane są wyłącznie przez mieszaninę użytych lipidów. Powstała w ten sposób struktura zapewnia, że kwas nukleinowy jest całkowicie odizolowany od otoczenia, co chroni go przed niepożądanym działaniem enzymów nukleolitycznych. Agregaty te są obecnie testowane na zwierzętach, a szczegóły dotyczące sposobu ich formowania są przedmiotem intensywnych badań. Procedura ta pozwala na uzyskanie parametrów biofizycznych agregatów, które gwarantują pożądaną biodystrybucję oraz determinują sposób oddziaływania z komórkami [11, 28, 29].

III. Stabilność agregatów w płynach fizjologicznych

Nośnik materiału genetycznego powinien zachować w surowicy swoją strukturę oraz przebywać w układzie krążenia przez czas umożliwiający akumulację agregatu w tkance docelowej, np. w guzie nowotworowym. Większość stosowanych obecnie lipopleksów po wprowadzeniu do surowicy agreguje w wyniku oddziaływania z cząsteczkami o charakterze polijonów, co powoduje, że nie nadają się one do zastosowań *in vivo* [30-32]. Natomiast agregacja nośników w wyniku oddziaływania z elementami surowicy zwiększa efektywne wymiary kompleksów, co istotnie wpływa na ich biodystrybucję. Duże rozmiary agregatów powodują ich akumulację w organach o rozbudowanym systemie naczyniowym, a zagregowane nośniki zalegają w naczyniach włosowatych. Ten generalnie negatywny efekt wykorzystuje się do niespecyficznego akumulacji czynnika transfekcyjnego w płucach, w leczeniu nowotworów układu oddechowego [33, 34].

Białka surowicy osadzają się na powierzchni agregatu w wyniku kombinacji oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych. Adsorpcja białek jest jednym z głównych czynników, które powodują eliminację agregatów przez komórki żerne. W wyniku

tej eliminacji agregaty akumulują się w śledzionie i w wątrobie, gdzie następnie są degradowane. Ta eliminacja znacząco skraca czas przebywania agregatów w krwioobiegu, ograniczając ich akumulację w tkankach docelowych. Aby zapobiec eliminacji przez makrofagi, do frakcji lipidowej agregatu dodawany jest lipid z kowalencyjnie związanym hydrofilowym polimerem (np. glikol polietylenowy). Dodany polimer tworzy na powierzchni steryczną barierę dla białek osocza, co wydajnie redukuje eliminację agregatów przez makrofagi [29]. Bariera steryczna może być także tworzona za pomocą innych substancji, np. przyłączonych łańcuchów cukrowych czy związanych z powierzchnią agregatu białek. Jednakże substancje te niosą ze sobą niebezpieczeństwo pojawienia się efektów ubocznych, w tym indukcję odpowiedzi immunologicznej.

Dodatkowym czynnikiem, rzadko branym pod uwagę w badaniach nad syntetycznymi nośnikami materiału genetycznego, są zmiany w składzie i w strukturze. Ponieważ elementy agregatu oddziałują ze sobą wyłącznie w wyniku oddziaływań „słabych” (elektrostatyczne, hydrofobowe czy poprzez wiązania wodorowe) to, od momentu wprowadzenia do surowicy, następuje wymiana składników frakcji lipidowej agregatu ze strukturami błonowymi sąsiadujących komórek oraz lipoproteinami. Agregat podlega także działaniu enzymów hydrolitycznych (głównie lipaz), które dodatkowo modyfikują skład lipidowy jego warstwy powierzchniowej. Hydroliza enzymatyczna jest szczególnie ważnym czynnikiem destabilizującym, gdy agregat znajduje się w obszarze wzmożonej aktywności immunologicznej (stany zapalne czy guzy nowotworowe) [35, 36]. Wynikiem tych procesów jest ustawiczna ewolucja składu oraz, co za tym idzie, właściwości agregatu. Praktycznie wszystkie badania prezentowane w literaturze przeprowadzane są przy milczącym założeniu, że właściwości agregatów podanych do organizmu nie ulegają zmianie, co może się okazać zbyt daleko idącym uproszczeniem.

IV. Pokonanie bariery krew-tkanka

Bariera krew-tkanka jest czysto fizyczną przeszkodą, co oznacza, że aby zapewnić nośnikowi jej pokonanie, należy brać pod uwagę głównie jego właściwości biofizyczne. Dwa parametry wydają się odgrywać w tym przypadku decydującą rolę – rozmiar agregatu oraz jego elektrostatyczny ładunek powierzchniowy. Manipulacja rozmiarami agregatu pozwala wykorzystać niespecyficzną akumulację w

wyniku rozszczelnienia bariery krew-tkanka, która występuje przy wszelkiego typu stanach zapalnych oraz w guzach nowotworowych, gdzie naczynia krwionośne powstałe w wyniku angiogenezy są źle ukształtowane [11]. Rozszczelnienie bariery krew-tkanka polega na powiększeniu przestrzeni międzykomórkowych, co umożliwi wnikięcie liposomów o rozmiarach mniejszych niż 0,2 μm . Znaczenie ładunku powierzchniowego agregatu jest sprawą kontrowersyjną, choć powszechnie uważa się, że jest to ważny parametr. Oddziaływania elektrostatyczne mają wpływ na wiele procesów, w tym asocjację białek czy rozpoznawanie przez komórki układu immunologicznego. Doświadczalne określenie znaczenia ładunku powierzchniowego agregatu w jego adsorpcji na powierzchni komórek jest technicznie trudne do przeprowadzenia, ponieważ superpozycja wszystkich efektów powoduje, że uzyskane wyniki badań *in vivo* są trudne do interpretacji [37].

W przypadku obecnie stosowanych nośników materiału genetycznego lokalne rozszczelnienie bariery krew-tkanka jest trudne do wykorzystania ze względu na brak możliwości uzyskania wymaganych rozmiarów agregatów. Z powodzeniem natomiast wykorzystywany jest proces odwrotny. Kompleksy zawierające kwas nukleinowy podawane lokalnie nie są usuwane przez układ krążenia, ze względu na zbyt duże rozmiary.

V. Penetracja tkanki

Rozmiary agregatu mają także znaczenie z innego powodu. O ile dystrybucja agregatów w organizmie przez układ krążenia nie narusza zasadniczych problemów, ponieważ są one rozprawdane na drodze konwekcji, to wnikanie do tkanek, gdzie procesy konwekcyjne praktycznie nie występują, jest znacznie utrudnione. Rozprawdanie agregatu w tkance odbywa się wyłącznie na drodze dyfuzji, a ta silnie zależy od jego rozmiarów. Dla dużych agregatów dyfuzja jest procesem tak powolnym, że można go praktycznie pominąć. W efekcie, agregaty akumulują się w pobliżu naczyń krwionośnych nie wnikając w głąb tkanki. Efekt ten jest szczególnie widoczny w przypadku guzów nowotworowych, gdzie występują znaczne niejednorodności tkanki wynikające z lokalnej martwicy [38]. W efekcie w tkance istnieje bariera przestrzenna, której pokonanie powinno być brane pod uwagę, gdy projektowany jest cel i sposób działania nośnika materiału genetycznego. Także w tym przypadku niezwykle ważne jest, aby powiązać biofizyczne właściwości agregatu z jego zdolnością do penetracji tkanki czy osadzania się lokalnie w naczyniach krwionośnych.

VI. Specyficzność komórkowa

Następnym zagadnieniem, które powinno być uwzględnione w projektowaniu nośnika materiału genetycznego jest jego specyficzność w odniesieniu do określonej populacji komórek. Systemowa terapia genowa z założenia wymaga, aby transfekcji ulegały tylko wybrane komórki, natomiast inne powinny pozostać niezmienione. Konieczne jest więc osiągnięcie znacznego poziomu specyficzności komórkowej, szczególnie w przypadku, gdy selektywność tkankowa nie jest znacząca. Aby osiągnąć taką specyficzność, w nośnik wbudowuje się odpowiedni ligand lub przeciwciało do antygeny typowego dla rodzaju komórek docelowych [2, 39-42]. Niestety, pozytywne wyniki uzyskiwane w hodowlach komórkowych rzadko przekładają się na wydajną transfekcję w badaniach na zwierzętach, co związane jest, między innymi, z immunogennością stosowanych przeciwciał. Dodatkowo, znakowanie przeciwciałami wymaga ich odpowiedniej prezentacji, co w połączeniu z powierzchniowo związanymi polimerami może nastęrczać pewne trudności [43, 44]. Uzyskanie „immunoagregatów” wymaga zatem pełnej kontroli nad topologią nośnika już na poziomie procesu ich formowania. Wyrafinowane konstrukcje agregatów zaproponowane przez grupę prof. Cullisa wymagają jeszcze wielu badań, aby stały się powszechnie akceptowanym preparatem farmakologicznym [45, 46].

VII. Pokonanie bariery błony cytoplazmatycznej

Sposób wprowadzenia materiału genetycznego do komórek bardzo zależy od ich rodzaju. Z punktu widzenia wnikania supramolekularnych agregatów istotne są takie parametry jak zdolność do endocytozy czy posiadanie specyficznych receptorów lub antygenów (inna będzie możliwość transfekcji w przypadku makrofagów, komórek nerwowych czy nowotworowych). Oznacza to, że typ komórki powinien być bezwzględnie brany pod uwagę przy projektowaniu nośnika materiału genetycznego. Bariera błony biologicznej może być pokonana przez agregat poprzez fuzję z błoną plazmatyczną lub na drodze endocytozy. Z dotychczasowych badań wiadomo, że fuzja może być indukowana za pośrednictwem odpowiedniego składu frakcji lipidowej agregatu oraz za pośrednictwem odpowiednich białek, najczęściej pochodzenia wirusowego (np. hemaglutyniny) [21, 47]. Endocytoza jest procesem zachodzącym w sposób naturalny i nie wymaga specjalnych modyfikacji

samego agregatu. Ważne jest natomiast, aby nośnik zapewnił uwolnienie kwasu nukleinowego z endosomu zanim ulegnie on hydrolizie [23]. W chwili obecnej nie ma jednolitego poglądu na temat sposobu destabilizacji błony endosomalnej. Przypuszcza się, że w warunkach niskiego pH indukowana jest fuzja frakcji lipidowej agregatu z błoną endosomalną [48] lub, że endosomy pękają w wyniku wymuszonego przepływu wody spowodowanego buforowaniem przestrzeni endosomalnej przez kationy wchodzące w skład nośnika [49-51]. Zasadniczy problem związany z zapewnieniem wniknięcia agregatu do komórki wiąże się z faktem, że etap ten wymaga selektywnej destabilizacji struktury nośnika, która powinna nastąpić po asocjacji z błoną plazmatyczną lub we wnętrzu endosomu, a jak wspomniano już wcześniej niestabilne agregaty są wrażliwe na procesy zachodzące w surowicy. Selekcja odpowiedniego czynnika destabilizującego (natury biofizycznej czy biochemicznej) jest kluczowym zagadnieniem, które nie zostało do tej pory pozytywnie rozwiązane.

W rezultacie, o ile wprowadzenie materiału genetycznego za pomocą syntetycznych nośników do komórek hodowanych *in vitro* nie nastęrczać zazwyczaj poważniejszych problemów, to uzyskanie podobnych wyników po podaniu systemowym do organizmów wyższych stanowi ciągle wyzwanie dla współczesnej farmakologii [27, 52].

VIII. Transport DNA wewnątrz komórki; rola układu immunologicznego

Transport materii wewnątrz komórki jest przedmiotem badań dopiero od kilku ostatnich lat, gdyż wcześniej brak było odpowiednich narzędzi badawczych. Dopiero powszechne zastosowanie mikroskopu konfokalnego czy technik umożliwiających śledzenie pojedynczych molekuł w żywej komórce pozwoliło na uzyskanie istotnych informacji na temat transportu materii w cytoplazmie. Jednakże wiedza na ten temat jest na tyle ograniczona, że w chwili obecnej uwzględnienie problematyki transportu wewnątrzkomórkowego przy konstrukcji nośnika dla kwasu nukleinowego nie jest możliwe. Pojawiające się próby rozwiązania tego zagadnienia opierają się głównie na zastosowaniu mechanizmów wprowadzania materiału genetycznego do komórki przez wirusy [42]. Stosowane preparaty, będące kombinacją syntetycznych nośników i elementów strukturalnych wirusów są na tak wczesnym etapie badań, że jakiegokolwiek uogólnienia są obecnie niemożliwe [22, 23, 53-55]. Znaczenie transportu kwasu nukleinowego wewnątrz komórki pokazano w

spektakularnych doświadczeniach, w których plazmidy wprowadzone do cytoplazmy drogą mikromanipulacji wykazywały znikomą wydajność transfekcyjną [56]. Specyficzność komórkowa oraz odpowiedni sposób wprowadzenia DNA do komórki, a następnie do jądra warunkuje uniknięcie niepożądanych efektów ubocznych związanych między innymi ze stymulacją układu immunologicznego na poziomie komórkowym. Liczne badania wykazały, że immunostymulacja leukocytów za pomocą oligonukleotydów C_pG nie zależy bezpośrednio od ich oddziaływania z receptorami powierzchniowymi zdolnymi do wiązania DNA i wymaga ich internalizacji [57], najprawdopodobniej poprzez endocytozę [58]. Zauważono na przykład, że inkubacja splenocytów mysich z oligonukleotydami C_pG w obecności kationowych lipidów wspomagających transport dokomórkowy (ang. *lipofection*) zwiększa ich aktywność lityczną i wywołuje sekrecję interferonu γ [59]. Za udziałem endocytozy w dokomórkowym transporcie C_pG-DNA przemawia fakt blokowania procesu immunostymulacji limfocytów przez substancje będące inhibitorami procesu obniżania pH w pęcherzykach endosomalnych związanego z ich dojrzewaniem [60]. Dalszy przebieg procesu immunostymulacji jest determinowany przez wiązanie C_pG-DNA, po jego uwolnieniu z endosomu, z wewnątrzkomórkowymi receptorami TLR9 (ang. *Toll-Like Receptor type 9*) [61, 62]. Receptor TLR9 należy do rodziny niedawno odkrytych transmembranowych białek, charakteryzujących się obecnością bogatych w leucynę powtórzeń w części zewnątrzkomórkowej i motywu receptora IL1 w domenie cytoplazmatycznej. Utworzenie kompleksu C_pG-DNA-TLR9 powoduje zmiany w równowadze redox komórki leukocytu, objawiające się przez wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*), aktywację czynnika transkrypcyjnego NF κ B i indukcję szeregu szlaków przekazywania sygnałów związanych z aktywacją kinaz białkowych zależnych od mitogenów (MAPK), takich jak szlaki ERK, p38MAPK oraz JNK [62]. Prowadzi to do aktywacji procesów transkrypcji oraz translacji dających w efekcie sekrecję wymienionych wyżej cytokin klasy Th1, chemokin oraz cząsteczek kostymulacyjnych.

W rezultacie, oligonukleotydy C_pG aktywują wrodzoną oraz nabytą odporność organizmu kręgowców (w tym człowieka), mają działanie hematopoetyczne oraz aktywują szerokie spektrum niespecyficznych i profilaktycznych odpowiedzi immunologicznych na różnorodne patogeny i komórki nowotworowe [14]. Oligonukleotydy te wzmacniają odpowiedź immunologiczną organizmów na antygeny podane w ce-

lach immunoprewencyjnych (działanie adiuwacyjne) [14], przy czym działanie to jest bardziej skuteczne w przypadku oligonukleotydów opłaszczonych w liposomach [63]. Motywy C_pG pełnią również istotną rolę „wewnętrznych adiuwantów” w działaniu szczepionek DNA (ang. *DNA vaccines*) [64]. Ich obecność w strukturze wektorów stosowanych w terapii genowej ma również określone konsekwencje, nie zawsze korzystne dla przebiegu terapii [65].

IX. Podsumowanie

Należy podkreślić, że wątpliwe jest, aby jeden typ nośnika zapewnił wydajną transfekcję w każdej tkance i we wszystkich typach komórek. Należy raczej oczekiwać, że każda terapia będzie wymagała zaprojektowania specyficznie do tego celu nośnika. Jego parametry będą zależały od wielkości cząsteczek materiału genetycznego, rodzaju komórek, które będą przedmiotem manipulacji, ich lokalizacji w organizmie oraz sposobu podania preparatu. Tym niemniej, już teraz można określić kilka kluczowych parametrów nośnika, które spełniać będą określone funkcje na drodze od miejsca podania do jąder wybranych komórek. Poniższej przedstawiono wybrane funkcje, które powinien spełnić wydajny nośnik materiału genetycznego wraz z przykładami odpowiednich składników, mającymi spowodować ich skuteczną realizację.

- 1) Kondensacja cząsteczki DNA: poli(4-winylo)pirydyny, chitosan, kationowe polimery cukrowe, dendrymery, polietylenoiminy, poliaminokwasy, histony, spermina, spermidyna, protaminy, lipidy kationowe.
- 2) Ochrona materiału genetycznego: glikole polietylenowe, struktura agregatu.
- 3) Ligandy zapewniające specyficzność komórkową: ligand receptora asialoglikoproteiny, mannoza, lektyny, treansferyny, insulina, białko wiążące integryny, czynniki wzrostu, przeciwciała.
- 4) Czynniki ułatwiające wnikanie do komórki: inaktywowane wirusy lub ich fragmenty, peptydy fuzjogenne lub amfipatyczne (GALA, HA2, INF1, INF2), chlorochin.

Podziękowania

Praca była subsydiowana z funduszy grantu PBZ-KBN 04/P04/98 oraz środków Instytutu Fizyki Politechniki Wrocławskiej.

Piśmiennictwo

1. van Slooten ML, Boerman O, Romoren K, Kedar E, Crommelin DJ, Storm G (2001) *Biochim Biophys Acta* **1530**: 134-145
2. Lee VHL, Sporty JL, Fandy TE (2001) *Adv Drug Deliv Rev* **50**: 533-540
3. Nauman DA, Bertozzi CR (2001) *Biochim Biophys Acta* **1568**: 147-154
4. Langner M (1998) *Post Biochem* **44**: 299-305
5. Siatskas C, Medin JA (2001) *J Inherit Metab Dis* **24**: 25-41
6. Lasic DD (1996) *Nature* **380**: 5611-5620
7. Alikan S, Rex JH (2001) *Curr Pharm Des* **7**: 393-415
8. Langner M, Kral T (1999) *Pol J Pharmacol* **51**: 211-222
9. Langner M (2000) *Pol J Pharmacol* **52**: 3-14
10. Jain RK (2001) *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 149-168
11. Bally MB, Lim H, Cullis PR, Mayer LD (1998) *J Liposome Res* **8**: 299-335
12. Tokunaga T, Yamamoto S, Namba K (1988) *Jpn J Cancer Res* **79**: 682-686
13. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky G, Klinman D (1995) *Nature* **374**: 546-549
14. Krieg AM, Yi AK, Hartmann G (1999) *Pharmacol Ther* **84**: 113-120
15. Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM (1996) *J Immunol* **157**: 1840-1845
16. Byk G, Scherman D (2000) *Drug Dev Res* **50**: 566-572
17. Byk G, Wetzer B, Frederic M, Dubertret C, Pitard B, Jasling G, Scherman D (2000) *J Med Chem* **43**: 4377-4387
18. Kral T, Langner M, Benes M, Baczynska D, Ugorski M, Hof M (2002) *Biophys Chem* **95**: 135-144
19. Anchordoquy TJ, Koc GS (2000) *J Pharm Sci* **89**: 289-296
20. Perrie Y, Gregoriadis G (2000) *Biochim Biophys Acta* **1475**: 125-132
21. Cerletti A, Drewe J, Fricker G, Eberle AN, Huwyler J (2000) *J Drug Target* **8**: 435-446
22. Hu Q, Shew CR, Bally MB, Madden TD (2001) *Biochim Biophys Acta* **1514**: 1-13
23. Langner M (2000) *Cell Mol Biol Lett* **5**: 295-313
24. Oberle V, Bakowsky U, Zuhorn IS, Hoekstra D (2000) *Biophys J* **79**: 1447-1454
25. Stuart DD, Kao GY, Allen TM (2000) *Cancer Gene Ther* **7**: 466-475
26. Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF (2001) *Int J Pharm* **229**: 1-21
27. Audouy S, Hoekstra D (2001) *Mol Membr Biol* **18**: 129-143
28. Saravolac EG, Ludkovski O, Skirrow R, Ossanlou M, Zhang YP, Giesbrecht C, Thompson J, Thomas S, Stark H, Cullis PR, Scherrer P (2000) *J Drug Target* **7**: 423-437
29. Fenske DB, MacLachlan I, Cullis PC (2001) *Curr Opin Mol Ther* **3**: 153-158
30. Son KK, Tkach D, Rosenblatt J (2001) *Biochim Biophys Acta* **1511**: 201-205
31. McKalip D, Grenier M, Choy M (2000) *Neurosci Lett* **295**: 64-66
32. Audouy S, Molema G, de Leij L, Hoekstra D (2000) *J Gene Med* **2**: 465-476
33. Marshall J, Nietupski JB, Lee ER, Siegel CS, Rafter PW, Rudginsky SA, Chang CD, Eastman SJ, Harris DJ, Scheule RK, Cheng SH (2000) *J Drug Target* **7**: 453-469
34. Floch V, Delepine P, Guillaume C, Loisel S, Chasse S, Le Bolc'h G, Gobin E, Leroy JP, Ferec C (2000) *Biochim Biophys Acta* **1464**: 95-103
35. Ginsburg I, Ward PA, Varani J (1999) *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**: 325-338
36. Gronroos JO, Laine VJ, Nevalainen TJ (2002) *J Infect Dis* **185**: 1767-1772
37. Scherphof GL, Kamps JA (2001) *Progr Lipid Res* **40**: 149-166
38. El-Kareh AW, Secomb TW (2000) *Neoplasia* **2**: 325-338
39. Hanazono Y, Brown KE, Dunbar CE (2000) *J Hematother Stem Cell Res* **9**: 611-620
40. Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M (2000) *Gene Ther* **7**: 292-299
41. Kawakami S, Sato A, Yamada M, Yamashita F, Hashida M (2001), *S.T.P. Pharm Sci* **11**: 117-120
42. Lavillette D, Russell SJ, Cosset FL (2001) *Curr Opin Biotechnol* **12**: 461-466
43. Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, Eriguchi M, Yanagie H (2001) *Pharm Res* **18**: 1042-1048
44. Li WM, Xue L, Mayer LD, Bally MB (2001) *Biochim Biophys Acta* **1513**: 193-206
45. Harasym TO, Tardi P, Longman SA, Ansell SM, Bally SM, Cullis MB, Choi LS (1995) *Bioconjug Chem* **6**: 187-194
46. Holland J, Hui C, Cullis P, Madden TD (1996) *Biochemistry* **35**: 2618-2624
47. Budker V, Gurevich V, Hagstrom JE, Bortzov F, Wolff JA, (1996) *Nat Biotechnol* **14**: 760-764
48. Mahato RI, Takakura Y, Hashida M (1997) *J Drug Target* **4**: 337-357
49. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger K, Welsh MJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 18997-19007
50. Wattiaux R, Jadot M, Warnier-Pirotte MT, Wattiaux-De Coninck S (1997) *FEBS Lett* **417**: 199-202
51. Wattiaux R, Laurent N, Wattiaux-De Coninck S, Jadot M (2000) *Adv Drug Deliv Rev* **41**: 201-208
52. Delepine P, Guillaume C, Floch V, Loisel S, Yaouanc J, Clement JC, Des Abbayes H, Ferec C (2000) *J Pharm Sci* **89**: 629-638
53. Girao-da-Cruz MT, Simoes S, Pires PP, Nir S, Pedroso-de-Lima MC (2001) *Biochim Biophys Acta* **1510**: 136-151
54. McIntosh DP, Tan XY, Oh P, Schnitzer JE, Levin ER (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 1996-2001
55. Wu-Pong S, Gewirtz DA (1998) *BioPharm* **28**-35
56. Schatzlein AG (2001) *Anticancer Drugs* **12**: 275-304
57. Manzel L, MacFarlane DE (1999) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**: 459-464
58. Lebedeva I, Benimetskaya L, Stein CA, Vilenchik M (2000) *Eur J Pharm Biopharm* **50**: 101-119
59. Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Tokunaga T (1994) *Microbiol Immunol* **38**: 831-836
60. MacFarlane DE, Manzel L (1998) *J Immunol* **160**: 1122-1131
61. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanji H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) *Nature* **408**: 740-745
62. Krieg AM (2002) *Annual Rev Immunol* **20**: 709-760
63. Li WM, Bally MB, Schutze-Redelmeier MP (2001) *Vaccine* **20**: 148-157
64. McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL (2000) *Springer Semin Immunopathol* **22**: 125-132
65. Krieg AM (1999) *J Gene Med* **1**: 56-63

Rybozomy wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV)

Hepatitis delta virus (HDV) ribozymes

MICHAŁ ŁĘGIEWICZ¹, JERZY CIESIOŁKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Ogólna charakterystyka wirusa zapalenia wątroby typu D
 - II-1. Budowa wirionu
 - II-2. Rybozomy *delta* i mechanizm replikacji wirusowego RNA
- III. Struktura rybozymów *delta*
 - III-1. Struktura pierwszorzędowa
 - III-2. Struktura drugorzędowa
 - III-3. Struktura trzeciorzędowa
- IV. Reakcja autokatalitycznego przecinania się rybozymów *delta*
 - IV-1. Mechanizm reakcji
 - IV-2. Rola jonów metali dwuwartościowych
- V. Możliwości praktycznego wykorzystania rybozymów *delta*
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. General characteristics of hepatitis D virus
 - II-1. Virion structure
 - II-2. The delta ribozymes and replication mechanism of the viral RNA
- III. Structure of the delta ribozymes
 - III-1. Primary structure
 - III-2. Secondary structure
 - III-3. Tertiary structure
- IV. Autocatalytic cleavage reaction of the delta ribozymes
 - IV-1. Mechanism of the reaction
 - IV-2. The role of divalent metal ions
- V. The possibilities of practical application of the delta ribozymes
- VI. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: FRET — ang. *fluorescence resonance energy transfer*, rezonansowe przeniesienie energii fluorescencji; HBsAg — białko powierzchniowe wirusa HBV (antygen B); HBV — wirus zapalenia wątroby typu B; HDAg — antygen *delta*; HDV — wirus zapalenia wątroby typu D; HeLa — komórki nabłonka raka szyjki macicy; NAIM — ang. *nucleotide analog interference mapping*, lokalizacja miejsc interferencji wywołanej obecnością analogów nukleotydowych; NMR — ang. *nuclear magnetic resonance*, magnetyczny rezonans jądrowy

I. Wstęp

Dwadzieścia lat temu uważano, że w żywej komórce funkcjonują jedynie biokatalizatory o charakterze białkowym. Przełomem było odkrycie na początku lat 80-tych cząsteczek RNA o właściwościach katalitycznych (rybozymów), które w zasadniczy sposób zmieniło pogląd badaczy na funkcje, jakie RNA może pełnić w przyrodzie [1, 2]. Sfor-

mułowano hipotezę „świata RNA” zakładającą, że w ewolucyjnej przeszłości, przed pojawieniem się DNA i białek, RNA pełnił funkcję zarówno nośnika informacji genetycznej, jak i biokatalizatora. Za hipotezą tą przemawiają nie tylko poznane naturalne rybozomy zdolne do przecinania łańcucha polinukleotydowego RNA. W latach 90-tych, do poszukiwań cząsteczek RNA o właściwościach katalitycznych, wykorzystano metodę selekcji RNA *in vitro* [3-5]. Znalaziono cząsteczki, które znacznie poszerzyły spektrum reakcji katalizowanych przez RNA [6-8]. Okazało się, że RNA może katalizować m. in. reakcję aminoacylacji i syntezy wiązania peptydowego, czyli reakcje o kluczowym znaczeniu dla hipotetycznego „świata RNA”. Jednak odkrycia te rozważano do niedawna jedynie jako potwierdzenie potencjalnych możliwości RNA bez odwoływania się do funkcji, jakie cząsteczki te pełnią aktualnie w przyrodzie.

Zainteresowanie rybozymami i mechanizmami ich działania znacznie wzrosło w ostatnich kilku latach. Przyczyniły się do tego w istotnym stopniu wyniki, jakie otrzymano badając fragmenty RNA wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV), zwane rybozymami HDV lub rybozymami *delta*. Na podstawie informacji uzyskanych w wyniku rozwiązania struktury rybozymu *delta* w kryształach i szczegółowych ba-

¹Dr, ²prof. dr hab.; Pracownia Chemii i Biochemii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, ciesiolk@man.poznan.pl

dań kinetycznych przebiegu reakcji katalizy sformułowano hipotezę, że zachodzi ona według mechanizmu ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej, podobnego do funkcjonującego w wielu enzymach białkowych [9-11]. Wkrótce potem wysunięto hipotezę, że RNA pełni aktywną rolę również podczas procesu syntezy białka na rybosomie i usuwania sekwencji intronowych z prekursorowych mRNA zachodzącego przy udziale spliceosomu [12-14]. Te ostatnie przypuszczenia mają daleko idące konsekwencje. Wcześniej, występujące w naturze rybozomy uważano za enzymatyczne skamieliny z hipotetycznego „świata RNA”. Sądono, że wygenerowały one swoich następców — enzymy białkowe, które w toku ewolucji okazały się stabilniejsze i wydajniejsze. Obecnie wydaje się, że RNA wykazuje właściwości katalityczne znacznie powszechniej niż sądzono. Może być odpowiedzialny za szereg reakcji zachodzących w komórce przy udziale kompleksów rybonukleoproteinowych, w których dotychczas zakładano wyłącznie aktywność katalityczną ich komponentów białkowych.

W artykule przedstawiono pochodzenie, strukturę i właściwości rybozymów *delta* ze szczególnym uwzględnieniem wyników badań, które zrewolucjonizowały pogląd badaczy na zjawisko katalizy RNA. Omówiono także możliwości praktycznego wykorzystania rybozymów *delta* jako narzędzi molekularnych w strategii ukierunkowanej degradacji RNA.

II. Ogólna charakterystyka wirusa zapalenia wątroby typu D

II-1. Budowa wirionu

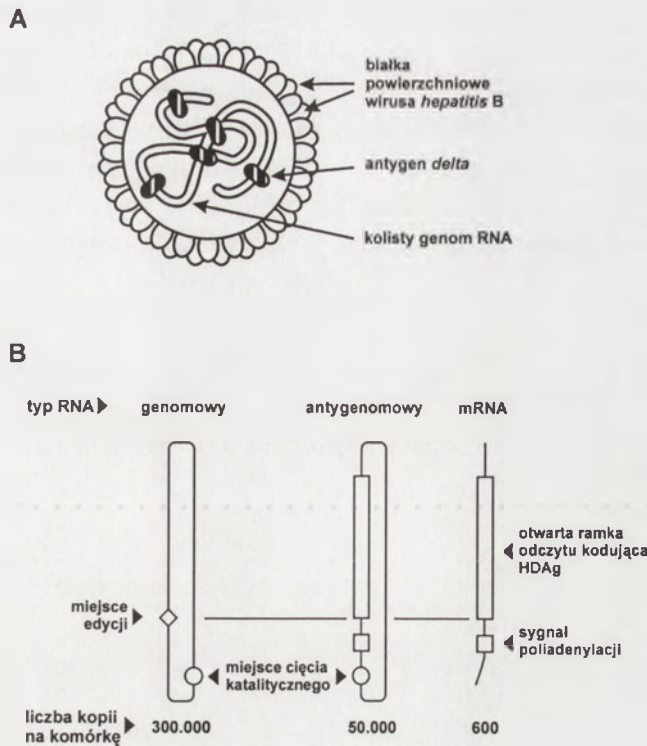
Wirus zapalenia wątroby typu D (ang. *hepatitis delta virus*, HDV) został odkryty przez R i z z e t t o i wsp. w 1977 roku [15]. Początkowo scharakteryzowany został jedynie nowy antygen — antygen *delta* występujący w hepatocytach pacjentów zainfekowanych wirusem zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*, HBV) i został on uznany za nowy rodzaj antygeny kodowanego przez tego wirusa. W 1980 roku wykazano, że antygen *delta* jest kodowany przez nowego wirusa — HDV, który wymaga do swojego cyklu życiowego obecności wirusa HBV w zainfekowanych komórkach, jest więc wirusem satelitarnym [16]. Wirus HBV, jako wirus pomocniczy, dostarcza białek otoczki, które są niezbędne podczas pakowania cząstek wirionów HDV [16-18]. Szczegółowe informacje na temat organizacji genetycznej wirusa HBV oraz białek przez niego kodowanych zostały przedstawione w polskim piśmiennictwie w

pracach przeglądowych autorów S i d o r k i e w i c z i P ł u c i e n n i c z a k [19, 20].

Wirus HDV wykazuje pewne podobieństwo do wirusa HBV, dotyczy ono morfologii wirionu — jego wielkości i składu otoczki (Ryc. 1A). Wirion HDV o średnicy 36-43 nm składa się z nukleokapsydu o średnicy 19 nm oraz zewnętrznej otoczki lipidowo-białkowej [21]. Cząstka wirusa HBV ma podobną średnicę — 42 nm, przy czym średnica nukleokapsydu wynosi 27 nm [22]. W osoczu krwi pacjentów zainfekowanych wirusem HDV wykryto trzy rodzaje cząstek wirusowych: infekcyjne cząstki HBV, infekcyjne cząstki HDV oraz puste, nieinfekcyjne cząstki subwirusowe, których obecność wynika z nadprodukcji białek budujących otoczkę wirusową. Skład otoczki obu wirusów jest podobny, gdyż wirus HDV wykorzystuje wszystkie trzy białka otoczki kodowane przez wirusa HBV: HBsAg-S, HBsAg-M i HBsAg-L [18, 21]. Występują one w otoczce wirusa HDV w ilościowym stosunku odpowiednio: 95:5:1 [23]. Obecność tych białek jest konieczna dla cyklu życiowego wirusa, choć wykazano, że replikacja genomu może odbywać się bez ich udziału. Jednakże nie powstają wówczas infekcyjne wiriony, zdolne do ataku na inne niezainfekowane komórki [17, 21].

Genom wirusa HDV stanowi kowalencyjnie zamknięta, kolista cząsteczka RNA składająca się z ok. 1700 nukleotydów, o nierozgałęzionej strukturze typu ‘pałeczki’ wynikającej z zaangażowania ponad 70% nukleotydów w tworzenie par zasad typu Watsona-Cricka (Ryc. 1B) [24]. Regiony dwuniciowe nie są zbyt długie i nie przekraczają 12 par zasad, są poprzedzielane parami nukleotydów niesparowanych lub jednonukleotydowymi wybrzuszeniami. Podczas replikacji genomowego RNA powstaje nić komplementarna, tzw. antygenomowa oraz nić mRNA.

W skład nukleokapsydu wirusa HDV wchodzi, oprócz kolistej nici genomowego RNA, jedyne kodowane przez ten wirus białko — antygen *delta* (HDAg), obecny w ok. 200 kopiach [25]. Antygen *delta* występuje jako mieszanina dwóch form, w zbliżonej ilości kopii: HDAg-S, złożonej ze 195 aminokwasów oraz HDAg-L, która zawiera łańcuch polipeptydowy wydłużony o dodatkowe 19 aminokwasów na końcu C [17, 18, 21]. Obie formy powstają z tej samej ramki odczytu, a forma dłuższa jest wynikiem procesu edycji RNA prowadzącego do zmiany kodonu stop, UAG, na kodon tryptofanu, UGG. Mechanizm edycji jest związany z aktywnością enzymu deaminazy adenyzykowej działającej na dwuniciowym RNA (ang. *double stranded RNA-activated adenosine deaminase*), który powoduje deaminację



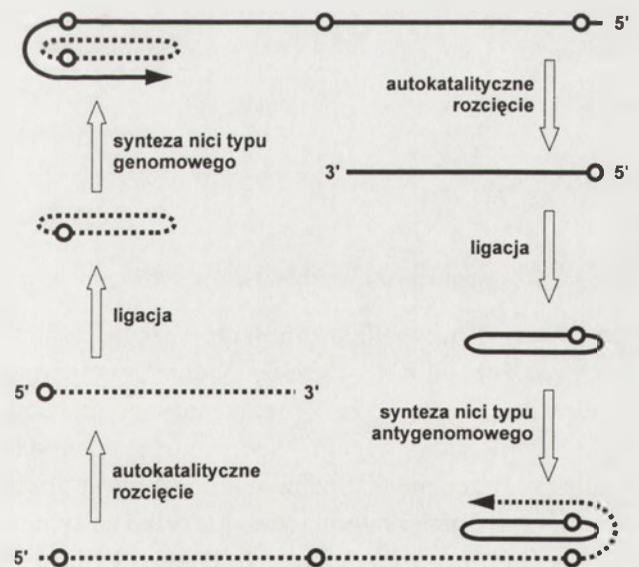
Ryc. 1. Budowa wirionu HDV (A); rodzaje cząstek wirusowego RNA syntetyzowane w zainfekowanej komórce (B).

adenozyny do inozyny [26]. Ta zmiana, powielona następnie dwukrotnie podczas replikacji RNA zależnej od RNA, jest równoznaczna z mutacją adenozyny do guanozyny. Działanie obu form antygeny *delta* jest antagonistyczne — forma HDAg-S jest wymagana w procesie replikacji wirusa [24], natomiast forma HDAg-L hamuje replikację i jest niezbędna dla pakowania wirionów [27, 28].

II-2. Rybozomy delta i mechanizm replikacji wirusowego RNA

W obu niciach wirusowego RNA, zarówno genomowej, jak i powstającej przejściowo podczas replikacji nici antygenomowej, znajdują się regiony wykazujące zdolność autokatalitycznego rozszczepienia łańcucha polinukleotydowego [29-32]. Te fragmenty sekwencji określane są mianem rybozymów *delta* odpowiednio — typu genomowego i antygenomowego. Ich funkcja wiąże się bezpośrednio z procesem replikacji wirusa, którego mechanizm, przedstawiony na Ryc. 2, określany jest jako mechanizm podwójnie toczącego się koła [17, 18, 21]. Proces replikacji przebiega następująco: na matrycy RNA typu genomowego syntetyzowana jest nić typu antygenomowego i synteza rozpoczyna się prawdopodobnie w miejscu odpowiadającym końcowi 5' mRNA antygeny *delta*. Powstający transkrypt składa się z wielokrotnie powtórzonych sekwencji genu wirusa połączonych ze sobą w formę multimeryczną,

a występujące w określonych odstępach sekwencje o aktywności rybozymalnej umożliwiają przecinanie się transkryptu do jednostek monomerycznych. Li-

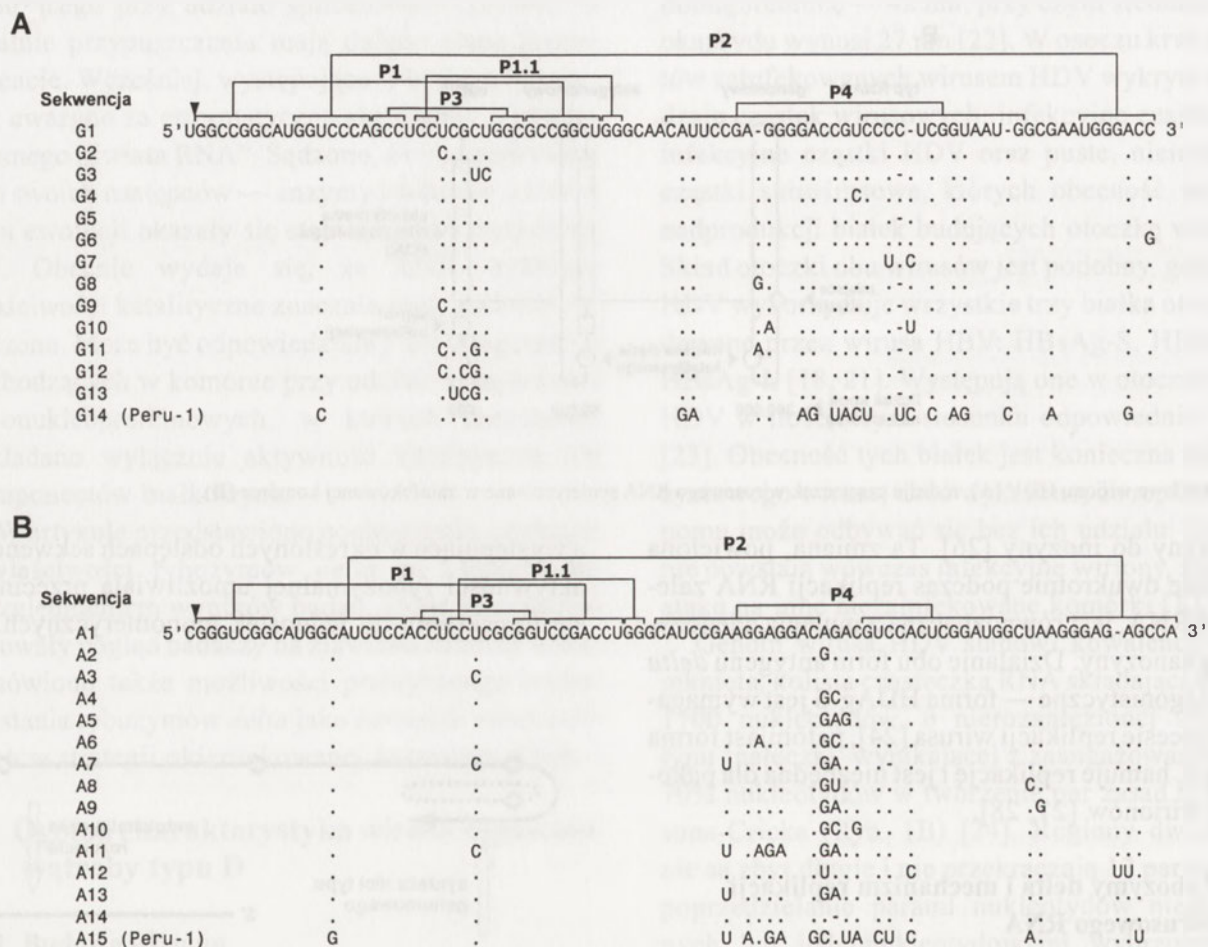


Ryc. 2. Schemat procesu replikacji wirusa HDV zachodzącej według mechanizmu podwójnie toczącego się koła, symbole w postaci kółek oznaczają rybozomy odpowiedzialne za autokatalityczne przecinanie się nici wirusowego RNA.

niowe odcinki RNA typu antygenomowego ulegają następnie ligacji do formy kolistej i służą jako matryce do syntezy RNA typu genomowego. Równolegle

zachodzi synteza mRNA kodujących obydwie formy antygeny *delta*, o długości ok. 800 nukleotydów. Synteza mRNA i replikacja genomu są więc, w przeciwieństwie do innych wirusów RNA, połączone czasowo. Replikacja wirusa HDV przebiega na terenie jądra komórkowego z udziałem polimerazy RNA II — enzymu kodowanego przez genom gospodarza,

C901 a G900 w nici antygenomowej (numeracja wg [37]) [29], natomiast w genomowym RNA zostało ono wyznaczone pomiędzy nukleotydami U685 a G686 [30]. Wykazano, że w obu przypadkach minimalna długość naturalnej sekwencji, która jest zdolna do wydajnej reakcji przecinania się wynosi 85 nukleotydów, z czego 84 znajdują się po stronie 3', a



Ryc. 3. Zestawienie sekwencji regionów rybozymowych wirusowego RNA nici typu genomowego (A) i antygenomowego (B) (na podstawie [57]).

który w tym przypadku katalizuje reakcję syntezy RNA zależnej od RNA [33-35]. Niedawno otrzymane wyniki sugerują, że synteza antygenomowego RNA i mRNA antygeny *delta* mogą zachodzić według różnych mechanizmów, komórkowa polimeraza RNA II byłaby odpowiedzialna tylko za syntezę mRNA [36]. Zaobserwowano, że HDAg-S wiąże się bezpośrednio z tym enzymem stymulując reakcję transkrypcji [35].

III. Struktura rybozymów *delta*

III-1. Struktura pierwszorzędowa

Miejsce autokatalicznego przecinania się wirusowego RNA zidentyfikowano pomiędzy pozycjami

tylko jeden nukleotyd po stronie 5' od miejsca cięcia [38, 39]. Rybozomy *delta* są pierwszymi znanymi cząsteczkami RNA, które posiadają zdolność specyficznego odcięcia tylko jednego nukleotydu w warunkach *in vitro* i jest to istotna cecha odróżniająca je od znanych wcześniej rybozymów, takich jak rybozomy *hairpin* czy *hammerhead*.

Pomimo, że genom wirusa HDV wykazuje wysoką zmienność [37, 40, 41] i ulega ciągłej ewolucji w trakcie infekcji [42, 43], sekwencja odpowiadająca za autokataliczne przecinanie się RNA charakteryzuje się bardzo wysoką zachowawczością [24, 37, 40, 41, 43-47]. Zestawienie sekwencji na Ryc. 3 potwierdza bardzo małą zmienność regionu rybozymalnego. Mutacje obserwowane są w nielicznych pozycjach, w tym głównie w regionach P4 i L4,

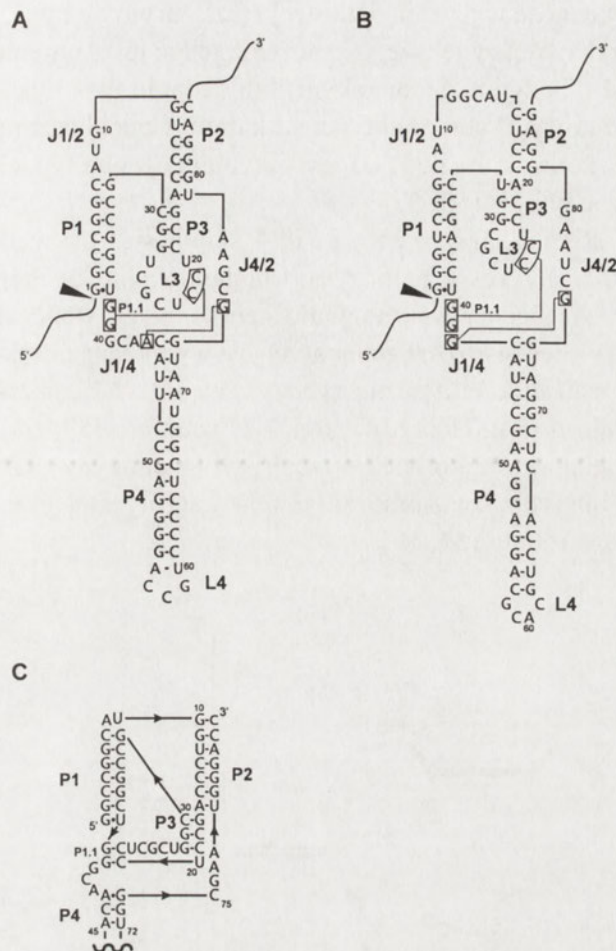
a regiony P1, P1.1 i P3 pozostają niezmiennie. Sekwencja, która charakteryzuje się największym poziomem mutacji, określana jest jako Peru-1 [47-48]. Jednak obecne w niej mutacje mają charakter mutacji kompensujących, dzięki czemu struktura drugorzędowa rybozomu może pozostać niezmienniona.

III-2. Struktura drugorzędowa

Chociaż proponowane kolejne modele strukturalne rybozymów *delta* różniły się znacznie od siebie, to we wszystkich zakładano, że struktury drugorzędowe rybozomu typu genomowego i antygenomowego są bardzo podobne [31, 39, 49, 50]. W modelu typu pseudowęzła, który został zaproponowany przez Perrotta i Been'a w 1991 roku [39], a następnie potwierdzony przez analizę rentgenostrukturalną kryształu w roku 1998 (wyniki tej analizy przedyskutowano w rozdziale następnym), łańcuch polinukleotydowy rybozomu ma długość 85 nukleotydów (Ryc. 4). Osiemdziesiąt cztery nukleotydy występują po stronie 3', a tylko jeden nukleotyd po stronie 5' od miejsca cięcia. Struktura drugorzędowa cząsteczki złożona jest z czterech regionów dwuniciowych, oznaczonych P1, P2, P3 i P4, trzech łączących je regionów jednoniciowych, oznaczonych J1/2, J1/4 i J4/2 oraz dwóch regionów pętlowych, L3 i L4, zamykających regiony P3 i P4. Region dwuniciowy P1 składa się z siedmiu par zasad, z których pierwsza para to oddziaływanie niestandardowe typu G-U.

Istotnych informacji na temat elementów struktury drugorzędowej rybozymów *delta* kluczowych dla ich aktywności katalitycznej dostarczyła metoda ukierunkowanej mutagenyzy. Wykazano, że mutacje zakłócające parowanie zasad w regionie P1 inaktywują rybozym, jednak mutacje o charakterze kompensacyjnym mogą przywrócić aktywność rybozomu zarówno typu genomowego [51, 52], jak i antygenomowego [39, 53]. Mutacje w obrębie pierwszej niestandardowej pary zasad G-U obniżają aktywność rybozomu genomowego [52] oraz antygenomowego [50, 54]. Również mutacja prowadząca do utworzenia w tym miejscu standardowej pary G-C lub A-U powoduje obniżenie aktywności katalitycznej [54]. Wydłużenie lub skrócenie regionu dwuniciowego P1 o dwie pary zasad znosi aktywność rybozomu, natomiast skrócenie o jedną parę znacznie ją obniża [52, 55].

Region dwuniciowy P2 jest zaangażowany w formowanie pseudowęzła i ma długość czterech par zasad w rybozynie typu antygenomowego i sześciu — w genomowym. Badania z wykorzystaniem metody



Ryc. 4. Struktury drugorzędowe rybozymów *delta* typu genomowego (A) i antygenomowego (B), miejsce cięcia katalitycznego oznaczono na rycinie strzałką; schematyczne przedstawienie struktury produktu 3' rybozimu typu genomowego w kryształach (C).

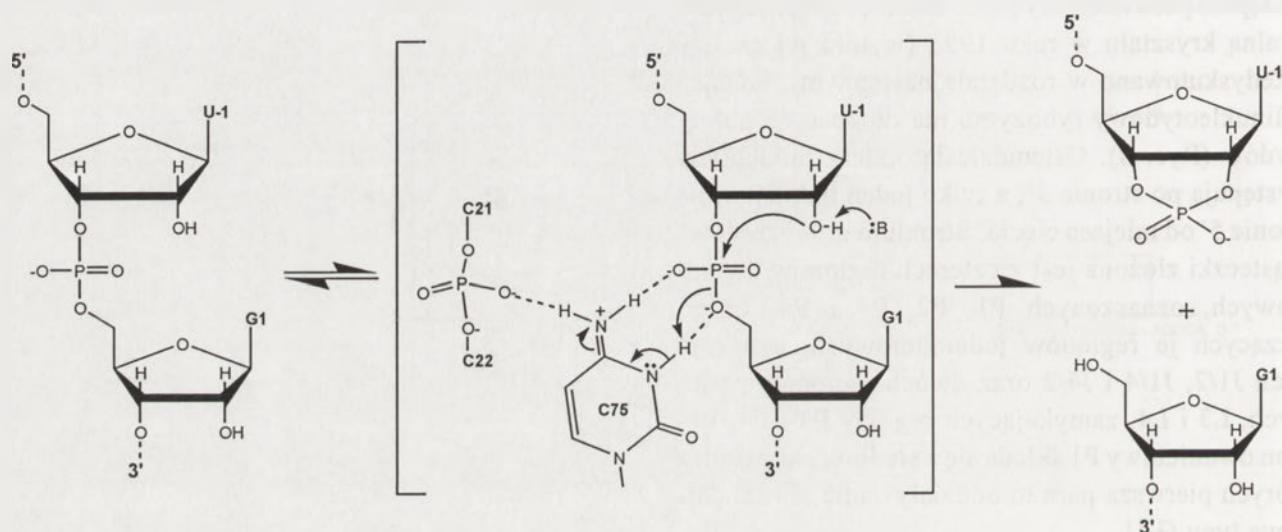
mutagenyzy potwierdzają występowanie tego regionu w formie dwuniciowej w rybozynie typu antygenomowego [39, 53] oraz w genomowym [52].

Region P3 złożony z trzech par zasad tworzy wraz z pętlą L3 strukturę typu spinki, a parowanie odpowiednich zasad potwierdzono w rybozynie antygenomowym [53] i genomowym [52, 55]. Sekwencja pętli L3 obu cząsteczek jest bardzo podobna, z jedyną różnicą, że w rybozynie genomowym występuje dodatkowa reszta urydyny po stronie 3' pętli. Modyfikacje łańcucha fosfodiesterowego polegające na podstawieniu niewiążących atomów tlenu atomami siarki pomiędzy resztami C21 i C22 w rybozynie genomowym [56] oraz pomiędzy C24 i C25 w antygenomowym [57] powodują obniżenie aktywności rybozimu. Wyniki te wskazują, że reszty leżące po stronie 5' pętli L3 znajdują się w bliskim sąsiedztwie miejsca katalitycznego. Przesłanki świadczące o istotnej roli tych reszt w katalizie przedstawiono w

pracy przeglądowej autorów Shih i Been [58]. Obecność w pętli dodatkowej reszty urydyny lub jej brak nie ma większego znaczenia, choć jej usunięcie (w rybozymie genomowym) lub dodanie (w antygenomowym) obniża aktywność katalityczną. Sugeruje to, że struktura pętli L3 jest optymalna w obu typach rybozymów [55, 57].

Region J1/4, łączący P1 i P4, składa się z sekwencji trzech reszt guanozyny i dodatkowej sekwencji CAA obecnej w rybozymie genomowym. Podczas gdy obecność reszt guanozyny jest wymagana dla aktywności katalitycznej rybozymów [48, 54], pozostałe trzy nukleotydy mogą być usunięte [59, 60]. Zmiana którejkolwiek z trzech reszt guanozyny na A, C lub U obniża istotnie aktywność katalityczną takiego wariantu [54, 59].

metodami sondowania enzymatycznego i chemicznego oraz metodą fotozszywania [57]. Istotnych informacji dostarczyła również metoda selekcji RNA *in vitro*. Kawakami i wsp. [62] otrzymali nieaktywne warianty rybozymu *delta* typu genomowego z pojedynczymi mutacjami w regionie pętlowym L3. Zidentyfikowano w ten sposób nukleotydy o kluczowym znaczeniu dla aktywności katalitycznej rybozymu. Mutacje U20a, C21a/g/u, C24u lub G25c powodowały jej obniżenie do poziomu 10% w porównaniu do aktywności rybozymu typu dzikiego. Natomiast mutacje C22a/g/u, C26a/g/u lub U27a/g/c nie powodowały znaczących zmian. Ponadto, otrzymano dwa nieaktywne warianty z siedmioma nukleotydami w pętli L3 z delecją C21 lub C22 [62]. W innym doświadczeniu selekcji *in vitro*, przeprowadzonym



Ryc. 5. Proponowany mechanizm kwasowo-zasadowej katalizy RNA w rybozymach *delta*, kluczową rolę odgrywają reszta cytydyny C75, w której atom azotu N3 uczestniczy w reakcji przeniesienia protonu oraz zjonizowany hydrat jonu Mg^{2+} pełniący funkcję zasady (na rycinie oznaczony symbolem: B).

Wykazano, że choć region P4 stabilizuje strukturę cząsteczki to może być skrócony do kilku par zasad bez utraty aktywności katalitycznej rybozymu [53, 55, 60].

Region J4/2, łączący segmenty dwuniciowe P4 i P2, w rybozymie antygenomowym składa się z sześciu, a w genomowym z pięciu nukleotydów. Przynajmniej jeden nukleotyd tego regionu jest szczególnie istotny dla reakcji katalizy, w rybozymie genomowym jest to C75. Jakakolwiek jego zamiana inaktywuje rybozym [59]. W rybozymie antygenomowym analogiczny nukleotyd, C76, jest również istotny [54]. Analiza produktów zszywania fotochemicznego dostarczyła dowodu na bliskie sąsiedztwo reszty C76 i miejsca cięcia katalitycznego w rybozymie antygenomowym [61].

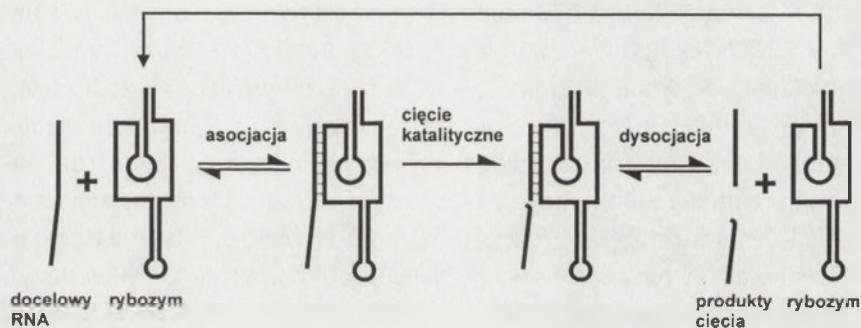
Strukturę drugorzędową rybozymów *delta* typu pseudowęzła potwierdzono w wielu laboratoriach

przez Nishikawa i wsp. [63], potwierdzono kluczową rolę następujących nukleotydów w regionach jednoniciowych: C21, G38 i C75. W wyselekcjonowanych cząsteczkach, które wykazywały aktywność katalityczną, mutacje występowały poza tymi pozycjami i w najbardziej aktywnym wariantcie były to mutacje: C26u, C41u i G76u [63].

Podobnie jak dla innych rybozymów, również w przypadku rybozymów *delta* skonstruowano szereg wariantów działających w układzie *trans* [61, 63, 92, 115]. Łańcuch oligonukleotydowy zostaje przedzielony na dwie cząsteczki RNA, z których jedna pełni funkcję rybozymu, a druga substratu przecinanego w reakcji katalizy. Spośród przetestowanych dwucząsteczkowych form rybozymu, w badaniach najczęściej wykorzystywane są konstrukty, w których rybozym przedzielony został w jednoniciowym regionie J1/2 lub w pętli zamykającej helisę P4.

III-3. Struktura trzeciorzędowa

W 1998 roku w laboratorium D o u d n y oznaczono strukturę w kryształach produktu 3' rybozomu *delta* typu genomowego [9]. Wiadomo, że rybozym posiada zdolność odcinania pojedynczego nukleotydu z końca 3'. W rozwiązanej strukturze „brakuje” tylko tego jednego nukleotydu i wobec tego sądzi się, że dobrze reprezentuje ona organizację przestrzenną cząsteczki aktywnej katalitycznie. Rozwiązana struktura potwierdziła przewidywany wcześniej model rybozomu typu pseudowęzła i jednocześnie ujawniła występowanie dodatkowych oddziaływań: obecność drugiego pseudowęzła, związanego z powstaniem helisy P1.1 oraz niestandardowej pary zasad, A43-G74 (Ryc. 4A, C). Helisa P1.1, złożona tylko z dwóch par zasad: G38-C22 i G39-C21, ma bardzo istotne znaczenie dla zwinięcia się łańcucha polinukleotydowego w strukturę przestrzenną, w której



Ryc. 6. Schemat zastosowania rybozomu *delta* do degradacji docelowego RNA, rybozym działający w układzie *trans* może wykazywać obrót cząsteczkowy – przecinać więcej niż jedną cząsteczkę substratu.

jednociowe regiony L3 i J1/4 oddziałują ze sobą. Helisa P1 tworzy współosiowy ciąg oddziaływań warstwowych z helisami P1.1 i P4, podczas gdy helisa P2 oddziałuje warstwowo z helisą P3. Oba te ciągi oddziaływań warstwowych są ułożone obok siebie, a łączy je pięć przekrzyżowań oraz helisa P1.1. Struktura stabilizowana jest przez szereg dodatkowych oddziaływań trzeciorzędowych: oddziaływanie warstwowe pary G1-U37 ze szczytem helisy P1.1, oddziaływanie P1, P2 i J1/2 tworzące osłonę dla C30 i G31, trójnukleotydowe oddziaływanie stabilizujące przekrzyżowanie P3-P1, oddziaływania warstwowe w obrębie helisy P3 kontynuowane są przez U20 i G25, C75 przemieszczona jest do wnętrza rdzenia struktury rybozomu i dodatkowo stabilizowana poprzez wiązanie wodorowe atomu N4 z atomem tlenu C22 i oddziaływanie warstwowe z A78 [9]. Kluczową rolę helisy P1.1 w tworzeniu aktywnej katalitycznej struktury rybozomu potwierdzono metodą ukierunkowanej mutagenetyki wykazując, że warianty

zachowują aktywność, o ile standardowe pary zasad zostają zachowane [64]. Podobne rezultaty uzyskali N i s h i k a w a i wsp. [65], którzy wykorzystali metodę selekcji RNA *in vitro* do poszukiwania aktywnych wariantów rybozomu z wyjściowej biblioteki kombinatorycznej zawierającej nukleotydy typu *random* wprowadzone w cztery pozycje odpowiedzialne za tworzenie helisy P1.1. Istnienie helisy P1.1 w cząsteczce rybozomu w roztworze, a także obecność niestandardowej pary zasad, A43-G74 w rybozymie genomowym lub G42-G75 w antygenomowym, potwierdzono również za pomocą techniki NMR [66].

Wyjątkowo zwarta struktura rybozomu *delta* nasywa pytanie, w jaki sposób łańcuch polinukleotydowy związa się w aktywną katalityczną formę podczas replikacji wirusowego RNA. Przypuszczano, że powstająca nić RNA tworzy sekwencyjnie odpowiednie motywy struktury drugorzędowej rybozomu, gdy

tylko zostanie zsyntetyzowany odpowiedni fragment RNA [18]. Alternatywnie, multimeryczny transkrypt pozostaje w formie nieaktywnej katalitycznie do czasu oddziaływania z bliżej niezidentyfikowanymi czynnikami białkowymi o charakterze chaperonów, które uaktywniają rybozym [17].

M a t y s i a k i wsp. [67] przeprowadzili badania modelowe kolejnych stadiów związania się rybozomu *delta* typu genomowego zachodzącego podczas transkrypcji wirusowego RNA. Zsyntetyzowano cztery fragmenty rybozomu o wzrastającej długości w kierunku końca 3' odpowiadające kolejnym etapom syntezy regionu rybozymalnego, a następnie analizowano ich strukturę metodami biochemicznymi. Wykazano, że zasadniczo elementy struktury drugorzędowej rybozomu tworzą się, gdy tylko zsyntetyzowany zostanie odpowiedni fragment RNA: dotyczy to helisy P1 i P4. Jednakże region odpowiadający spince P3/L3 tworzy początkowo inną strukturę, również w formie spinki. W trakcie dalszej elongacji

łańcucha RNA ulega ona reorganizacji, a następnie utworzona zostaje finalna struktura rybozomu typu pseudowęzła [67]. Przegrupowanie regionu P3/L3 zostało potwierdzone wynikami mapowania dostępności do hybrydyzacji otrzymanych fragmentów rybozomu z wykorzystaniem oligodeoksyrybonukleotydów i cięcia RNAzą H [68], jak również danymi z modelowania komputerowego zwijania się łańcucha polinukleotydowego podczas procesu elongacji [69].

Na strukturę rybozymów *delta*, a w konsekwencji ich aktywność katalityczną, wpływają przyległe do nich sekwencje wirusowego RNA. W rybozymie typu antygenomowego możliwe jest utworzenie krótkiej helisy P2a, w wyniku oddziaływania 4-nukleotydowej sekwencji $_{10}\text{UGGC}_{13}$ regionu J1/2 z fragmentem sekwencji wirusowego RNA przyległym do końca 3' rybozomu [70, 71]. Rybozym wykazuje małą aktywność w warunkach niskiej siły jonowej, natomiast preinkubacja w 100 mM NaCl, przed cięciem indukowanym jonami Mg^{2+} , znacznie stymuluje reakcję katalizy. Sugerowano, że helisa P2a może pełnić istotną rolę w mechanizmie odpowiedzialnym za kontrolę autokatalitycznego przecinania się rybozomu *in vivo* [70]. W rybozymie typu genomowego obecność 30-nukleotydowej sekwencji wirusowego RNA poprzedzającej miejsce cięcia hamuje jego aktywność katalityczną [72]. Natomiast jej wydłużenie powodowało przywrócenie aktywności. Obserwowany efekt tłumaczyć można alternatywnym porównaniem się fragmentu poprzedzającego miejsce cięcia z początkowymi nukleotydami końca 3' rybozomu, które uniemożliwia formowanie się helisy P2 [72]. Gdy rybozym mógł przyjmować alternatywne struktury drugorzędowe, obecność mocznika zwiększała jego aktywność, lecz gdy w wyniku mutacji punktowych możliwość parowania alternatywnego została zlikwidowana, efektu nie obserwowano [73]. Struktury RNA typu pseudowęzła tworzą się przez przechwycenie niezwinionych fragmentów łańcucha polinukleotydowego przez komplementarny fragment nici RNA. Sądzi się, że szybkość zwijania się wirusowego RNA *in vivo* zależeć będzie w większym stopniu od zwiększenia siły oddziaływań występujących w strukturze natywnej rybozomu niż osłabienia oddziaływań alternatywnych [73].

IV. Reakcja autokatalitycznego przecinania się rybozymów *delta*

IV-1. Mechanizm reakcji

W reakcji autokatalitycznego przecinania się rybozomu *delta* powstają dwa produkty, 5' i 3', z któ-

rych pierwszy zakończony jest 2',3'-cyklicznym fosforanem, a drugi grupą 5'-hydroksylową [30, 31] (Ryc. 5). Stałe szybkości reakcji dla wariantów rybozomu działających w układzie *cis* osiągają w optymalnych warunkach 30-40 min^{-1} , natomiast dla wariantów *trans* są ok. 10-krotnie niższe. Mechanizm reakcji polega na wewnątrzcząsteczkowym ataku nukleofilowym atomu tlenu grupy 2'-OH reszty rybozy na atom fosforu wiązania fosfodiesterowego. Następuje rozerwanie wiązania w reakcji mającej charakter transestryfikacji. Początkowo zakładano, że rybozomy *delta* należące do grupy tzw. małych rybozymów są metaloenzymami, a jony metali dwuwartościowych pełnią kluczową rolę w unikalnym, lecz wspólnym dla tych cząsteczek mechanizmie reakcji [74]. W proponowanym mechanizmie zjonizowany hydrat jonu metalu odrywa proton od grupy 2'-OH reszty rybozy ułatwiając jej atak nukleofilowy. Jednak badania ostatnich kilku lat wykazały, że różne rybozomy reprezentują odmienny sposób realizacji przedstawionego powyżej ogólnego mechanizmu reakcji katalizy. Rybozomy nie są już traktowane jako metaloenzymy w poprzednim tego słowa znaczeniu.

Przełom w rozumieniu mechanizmu działania rybozymów *delta* nastąpił dzięki pracom prowadzonym w trzech laboratoriach amerykańskich: D o u d n y, B e e n ' a i B e v i l a c q u a. Struktura krystalograficzna produktu 3' rybozomu typu genomowego rozwiązana w laboratorium Doudny [9, 75] wykazała, że grupa 5'-OH łańcucha RNA, z którą związany był odcinany w reakcji katalizy oligonukleotyd — produkt 5', jest schowana głęboko w strukturze przestrzennej cząsteczki i otoczona przez nukleotydy regionów P3, L3, J1/3 i J4/2. Ponadto, w jej bliskim sąsiedztwie znajduje się atom N3 reszty C75. Reszta C75 jest chroniona przed cząsteczkami rozpuszczalnika i mieści się w regionie o niskim potencjale elektrostatycznym wśród kilku ujemnie naładowanych grup fosforanowych. Takie położenie może zwiększać wartość pK_a atomu azotu N3 grupy iminowej C75. Wartość pK_a zwiększona do blisko 7 umożliwiałaby tej reszcie uczestniczenie w katalizie kwasowo-zasadowej, podobnie jak działa reszta histydyny w enzymach białkowych. Zaproponowano, że C75 działa jako akceptor protonu od grupy 2'-OH reszty rybozy w miejscu cięcia katalitycznego. Tak więc, po raz pierwszy założono, że zasada azotowa RNA może uczestniczyć w katalizie kwasowo-zasadowej [9, 75]. Doniesienia na temat cząsteczek RNA, które charakteryzują się przesuniętymi wartościami pK_a zasad ku bardziej neutralnemu były znane już wcześniej [76, 77].

W celu weryfikacji domniemanego mechanizmu reakcji katalizy zbadano, czy w rybozynie *delta* typu antygenomowego C76, nukleotyd analogiczny do C75 w rybozynie genomowym, jest niezbędny dla jego aktywności katalitycznej [10]. Punktowe mutanty rybozomu C76u oraz C76g były nieaktywne w standardowych warunkach reakcji, lecz dodanie do reakcji nukleozydu — cytozyny — powodowało przywrócenie ich aktywności. Cytozynę zastąpiono następnie imidazolem i okazało się, że aktywność obu mutantów została również przywrócona. Aby wykluczyć możliwość, że imidazol może strukturalnie kompensować mutację nukleotydu w pozycji 76 i nie brać bezpośredniego udziału w katalizie kwasowo-zasadowej, zamiast imidazolu zastosowano pirazol (1,2-diazol), który jest strukturalnym analogiem imidazolu, lecz znacznie słabszą zasadą. W tym przypadku nie dochodziło jednak do przywrócenia aktywności katalitycznej mutantów. Przypuszcza się, że imidazol działa w reakcji jako zasada akceptująca proton od grupy 2'-OH reszty rybozy w miejscu cięcia katalitycznego [10].

Podobne do powyższych badania przeprowadzone w laboratorium Bevilacqua [11] dla rybozomu *delta* typu genomowego wykazały, że mutant C75u nie wykazuje aktywności katalitycznej, a mutant C75a jest 270 razy mniej aktywny niż rybozym typu dzikiego. Założono, że zasadą jest zjonizowany hydrat jonu metalu dwuwartościowego, a reszta C75 pełni funkcję kwasu w mechanizmie reakcji [11] (Ryc. 5). Istotnie, niedawno otrzymane wyniki potwierdzają, że protonowana forma C75 jest ważna dla katalizy. Wykorzystując technikę NAIM (ang. *nucleotide analog interference mapping*), Oyeleri i wsp. [78] wykazali, że atom azotu N3 reszty C75 uczestniczy w transferze protonu. Natomiast N4 oddziałuje poprzez wiązanie wodorowe z atomem tlenu *pro-R_P* reszty C22, co w konsekwencji powoduje wzrost zasadowości N3 reszty C75. Jest to zgodne z obserwacją, że rybozym traci aktywność gdy atom tlenu *pro-R_P* reszty C22 jest zastąpiony atomem siarki. Autorzy sugerują, że zmiana wartości pK_a kluczowej reszty cytydyny ma miejsce jedynie w stanie nieprzeciętym i/lub przejściowym, lecz nie w produkcie 3' reakcji [78]. Faktycznie, bezpośrednia próba zmierzenia wartości pK_a w produkcie 3' rybozomu wskazuje na występowanie C75 w formie deprotonowanej [79]. Jednak również w stanie przejściowym nie wykazano znacznego przesunięcia wartości pK_a tej reszty, co zgodnie z interpretacją innych autorów może wynikać z niepoprawnego zwinięcia cząsteczki lub znacznego zróżnicowania strukturalnego i elektrostatycznego w lokalnym otoczeniu reszty C75

w stanie przejściowym w porównaniu do stanu przed i po reakcji katalizy [80].

Interesujących wyników dostarczyły badania rybozomu *delta* przeprowadzone z wykorzystaniem techniki FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*) [80]. Do przeciwległych końców regionów helikalnych P4 i P2 w odpowiednio skonstruowanym, trójcząsteczkowym wariacie rybozomu, działającym w układzie *trans*, przyłączono barwniki fluorescencyjne typu donor-akceptor. Umożliwiły one określenie zakresu zmian konformacyjnych zachodzących podczas reakcji cięcia. Okazało się, że po utworzeniu się kompleksu rybozym-substrat odległość pomiędzy barwnikami jest nieznacznie mniejsza (53Å) w porównaniu do wolnego rybozomu (56Å), natomiast po reakcji cięcia, w kompleksie rybozym-produkt, odpowiednia odległość jest znacznie większa (68Å). Nie wiadomo jednak, w którym stadium konformacyjnym następuje przecięcie łańcucha RNA [80].

IV-2. Rola jonów metali dwuwartościowych

Jony metali dwuwartościowych są bezwzględnie wymagane dla aktywności katalitycznej rybozymów *delta* w przeciwieństwie do rybozymów: *hammerhead*, *hairpin* czy *VS*, które są również aktywne w obecności wysokiego stężenia jonów jednowartościowych [81]. Nieoczekiwanie w strukturze krystalicznej produktu 3' rybozomu *delta* typu genomowego nie odnaleziono ściśle związanych jonów metali [9, 75]. Należy jednak pamiętać, że analizowana cząsteczka nie zawierała reszty fosforanowej i nukleozydu, bezpośrednio przyległych do miejsca cięcia katalitycznego od strony 5', które mogłyby potencjalnie uczestniczyć w wiązaniu jonu metalu. Z drugiej strony, istnieje szereg obserwacji eksperymentalnych wskazujących na istnienie miejsc silnego wiązania jonów metali dwuwartościowych w rybozymach *delta*. Wykazano, że podczas gdy wiązanie fosfodiesterowe 3',5' w miejscu cięcia katalitycznego w rybozynie antygenomowym jest przecinane nieznacznie efektywniej w obecności Ca^{2+} niż Mg^{2+} , to wiązanie 2',5' jest przecinane w obecności Mg^{2+} lub Mn^{2+} , ale nie Ca^{2+} [82]. Ta dramatyczna różnica zdecydowanie potwierdza kluczową rolę jonu metalu w miejscu cięcia. Również wyniki otrzymane niedawno techniką NMR wskazują na wiązanie jonu Mg^{2+} w sąsiedztwie dwóch par zasad: G1-U39 helisy P1 i G41-C28 helisy P1.1 (G39-C21 w przypadku rybozomu genomowego) [66]. Z drugiej strony, wyniki badań tzw. efektu tio-podstawienia dla reszty fosforanowej w miejscu cięcia są niejednoznaczne [74,

83-86]. Aktywność katalityczna tio-podstawionych wariantów w obecności jonów Mg^{2+} była obniżona, lecz nie zaobserwowano jej oczekiwanego wzrostu w obecności jonów o większym powinowactwie do atomu siarki. Brak jednoznacznie interpretowalnego efektu sugeruje, że w rybozymbach *delta* jon Mg^{2+} nie jest skoordynowany bezpośrednio z atomem tlenu reszty fosforanowej w miejscu cięcia katalitycznego [56].

Informacji na temat jonów metali dwuwartościowych związanych w rybozymbach *delta* dostarczyły również wyniki specyficznego cięcia RNA indukowanego w obecności tych jonów [87-90]. Cięcia zaobserwowano w regionie J4/2 rybozymbu genomowego w obecności jonów Pb^{2+} [91], a także w obecności jonów Ca^{2+} , Mn^{2+} i Eu^{3+} [67]. Natomiast w rybozymbie antygenomowym, działającym w układzie *trans*, zaobserwowano cięcie w obecności jonów Mg^{2+} w dolnej części regionu dwuniciowego P2 przy G81 [92]. Reakcja była przy tym zależna od utworzenia standardowej pary zasad U4-A36 w obrębie helisy P1 i obecności reszty C76 [93].

Obecnie sądzi się, że w rybozymbie *delta* występują dwa rodzaje związanych specyficznymi jonami metali dwuwartościowych; jony pełniące funkcję katalityczną oraz strukturalną [94]. Jon strukturalny wiąże się silniej do rybozymbu w niskim pH, natomiast katalityczny w wyższym. Jony metali dwuwartościowych w fizjologicznym zakresie stężeń nie indukują reakcji, natomiast efektywnie współzawodniczą z wiążącym się z cząsteczką dwuwartościowym jonem strukturalnym i znacznie słabiej z jonem o charakterze katalitycznym. Wykorzystując nieliniowy model Boltzmana-Poissona obliczono potencjały powierzchniowe wiązania jonów metali dwuwartościowych z cząsteczką rybozymbu. Okazało się, że w pobliżu miejsca cięcia katalitycznego znajduje się szczelina charakteryzująca się wysokim potencjałem ujemnym, która może być miejscem silnego wiązania jonu metalu [94].

V. Możliwości praktycznego wykorzystania rybozymbów *delta*

Rybozymy *delta* są jedynymi poznanymi rybozymbami, dla których naturalnym środowiskiem działania jest komórka zwierzęca. Z tego względu są szczególnie atrakcyjne jako potencjalne narzędzia molekularne w strategii ukierunkowanej degradacji RNA (Ryc. 6). Jak dotychczas, w strategii tej najczęściej wykorzystywane są rybozymy *hammerhead* i *hairpin* [95-102]. Przeprowadzone niedawno szczegółowe badania kinetyki reakcji cięcia rybozymbów

delta działających w układzie *trans* mogą być bardzo pomocne podczas konstruowania wariantów o pożądanej aktywności i wykazujących obrót [103-108]. Pewne charakterystyczne właściwości rybozymbów *delta* mogą okazać się szczególnie korzystne. Przede wszystkim, rybozymy *delta* są najszybciej działającymi wśród poznanych występujących w naturze rybozymbów. W warunkach niskiego stężenia jonów Mg^{2+} , stałe szybkości reakcji rybozymbów *hammerhead* i *hairpin* są znacznie niższe [55, 109]. Ponadto, rybozymy *delta* charakteryzują się wyjątkowo upakowaną strukturą, która chroni je przed atakiem rybonukleaz i zapewnia im dużą trwałość w komórce. Ostatnie doniesienia wskazują, że czas półtrwania rybozymbu *delta* inkubowanego w obecności ekstraktu komórkowego osiąga 112 godzin, a po 10 dniach pozostaje jeszcze ok. 20% cząsteczek. Wysoka trwałość rybozymbu nie jest wynikiem oddziaływania z białkami komórkowymi, gdyż brak produktów fotozszywania zdaje się zaprzeczać takim oddziaływaniom [110]. Istotną zaletą rybozymbów *delta* jest to, że przecinają one cząsteczkę substratu za dowolnie wybranym nukleotydem (Ryc. 4). Kolejne siedem nukleotydów w cząsteczce docelowej RNA musi być komplementarne do fragmentu sekwencji rybozymbu, który tworzy region dwuniciowy P1. Wiadomo, że dopuszczalne są pewne zmiany w tym regionie, przy zachowaniu standardowych par zasad. Długość helisy P1 wynosząca siedem par zasad jest stosunkowo niewielka, co może powodować niespecyficzne wiązanie substratu RNA, a w konsekwencji, degradację więcej niż jednego rodzaju cząsteczek RNA. Helisa P1 nie może być jednak wydłużona, ponieważ powoduje to utratę aktywności rybozymbu. W rybozymbie genomowym wydłużenie jej do ośmiu lub dziewięciu par zasad znosi aktywność katalityczną [111]. Wykazano także, że skrócenie helisy P1 o jedną parę zasad prowadzi do obniżenia aktywności rybozymbu antygenomowego o jeden rząd wielkości [112].

Sekwencja RNA, która w rybozymbach *delta* bezpośrednio poprzedza miejsce cięcia katalitycznego ma istotne znaczenie przy planowaniu miejsca ataku docelowej cząsteczki RNA. Metodą wprowadzania mutacji zarówno pojedynczych, jak i wielokrotnych, określono optymalną sekwencję nukleotydów w regionie od -1 do -4 w rybozymbie typu antygenomowego, która przyjmuje postać: $_{-1}HRHY_{-4}$, gdzie H oznacza U, C lub A, R — purynę, a Y — pirymidynę [113]. Zatem, choć region ten nie jest częścią helisy P1, ustalone preferencje należy uwzględnić w wyborze miejsca ataku w cząsteczce docelowej. Optymalna sekwencja w obrębie helisy P1 ma postać:

GNNHNNN_7 i wobec tego, 11-nukleotydomowa sekwencja preferencyjnie rozpoznawana przez rybozom *delta* typu antygenomowego to: $\text{YHRH}^{\dagger}\text{GN-NHNNN}_7$ [112, 113]. Obecność reszty pirymidyny w pozycji -1 zwiększa reaktywność w porównaniu do reszty purynowej, jednak w większym stopniu w reakcji indukowanej w obecności jonów Ca^{2+} , niż Mg^{2+} [114]. Określono również, jaki wpływ na szybkość reakcji cięcia w rybozynie działającym w układzie *trans* ma długość ośmionukleotydomowej sekwencji powyżej miejsca cięcia. Aktywność katalityczna rybozomu wzrastała ze wzrostem długości tej sekwencji do trzech nukleotydów, osiągając trzykrotnie wyższą wartość w porównaniu do sytuacji, gdy tylko jeden nukleotyd był przed miejscem cięcia. Natomiast, gdy długość sekwencji przekroczyła 5 nukleotydów obserwowano nieznaczny spadek aktywności. Podobna zależność charakteryzowała wartości stałych dysocjacji K_d wyznaczone dla rybozomu i odpowiednich oligonukleotydomowych substratów [114].

Specyficzne przecinanie cząsteczki mRNA przez rybozom *delta* typu antygenomowego działający w układzie *trans* zademonstrowano po raz pierwszy wykorzystując mRNA kodujący białko wirusa HDV, dwie izoformy antygeny *delta* [115]. Z dziewięciu badanych rybozomów rozpoznających sekwencję YGNNNNNN, trzy indukowały cięcie docelowego mRNA *in vitro*. Chociaż stałe szybkości reakcji były ok. 50-krotnie niższe niż wyznaczone dla krótkich substratów oligorybonukleotydomowych, rybozomy wykazywały obrót cząsteczkowy, cechą bardzo istotną dla zastosowań praktycznych [115]. Badano także efektywność różnych sposobów dostarczenia rybozomu na teren komórki. Porównanie elektroporacji i lipofekcji wykazało, że ten ostatni sposób jest bardziej efektywny, gdyż elektroporacja powodowała destrukcję znacznej ilości komórek [110]. Skonstruowano wektory ekspresyjne zawierające sekwencje rybozomów *delta* pod kontrolą promotorów tRNA lub U6 snRNA i potwierdzono oczekiwaną lokalizację transkryptów w cytoplazmie lub w jądrze komórkowym. Rybozomy znajdujące się w cytoplazmie były znacznie bardziej aktywne i efektywnie hamowały ekspresję chimerycznych genów *BCR-ABL-lucyferaza* oraz *ABL-lucyferaza* w transfekowanych komórkach HeLa [116].

Rybozomy *delta* wykorzystywane są także jako specyficzne narzędzia biochemiczne. W reakcji transkrypcji RNA *in vitro* z wykorzystaniem polimerazy RNA faga T7 otrzymuje się cząsteczki RNA heterogenne na końcu 3', a różniące się obecnością od jednego do kilku dodatkowych nukleotydów przypadkowo wbudowanych przez polimerazę. Zaplanowa-

nie matrycy DNA w ten sposób, aby powstający transkrypt RNA zawierał na swoim końcu 3' sekwencję rybozomu *delta* umożliwia generowanie oligomerów RNA o zaplanowanych homogennych końcach 3' [117, 118].

VI. Uwagi końcowe

Intensywnie prowadzone w ostatnich kilku latach badania rybozomów *delta* dostarczyły ważnych informacji o ich strukturze i właściwościach. Spektakularnym osiągnięciem było poznanie struktury przestrzennej rybozomu typu genomowego w kryształach oraz wykazanie, że łańcuch RNA uczestniczy bezpośrednio w mechanizmie reakcji katalizy. Odkrycia te sprawiły, że z cząsteczek o stosunkowo słabo poznanej strukturze i właściwościach, rybozomy *delta* stały się poligonem doświadczalnym dla badań zjawiska katalizy RNA. Badań mechanizmu reakcji cięcia, roli jaką jony metali dwuwartościowych pełnią w katalizie i w tworzeniu struktury rybozomu, a także procesów zwijania się RNA w strukturę wykazującą aktywność biologiczną.

Hipoteza, że zasady nukleinowe mogą aktywnie uczestniczyć w reakcjach katalizy kwasowo-zasadowej, przyczyniła się do zmiany poglądu badaczy na mechanizm działania znanych rybozomów i stymuluje dalsze poszukiwania cząsteczek RNA o właściwościach katalitycznych. Niedawno rozwiązana struktura krystalograficzna rybozomu *hairpin* wskazuje na aktywną rolę RNA również w działaniu tego rybozomu [119]. Ponadto, rozkład 23S rRNA w podjednostce 50S rybosomu w kryształach [12, 13] oraz wyniki badań kompleksu U2 i U6 snRNA [14] sugerują, że za syntezę wiązania peptydomowego i usuwanie sekwencji intro-nowych z mRNA odpowiedzialne są właściwości katalityczne cząsteczek RNA, wchodzących w skład rybosomu i spliceosomu. Hipotezy te wymagają jednakże potwierdzenia.

W ostatnich latach scharakteryzowano szczegółowo właściwości katalityczne rybozomów *delta* działających w układzie *trans* o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym w strategii ukierunkowanej degradacji RNA. Zidentyfikowano szereg czynników wpływających m.in. na oddziaływanie rybozom-substrat, obrót cząsteczkowy rybozomu i aktywność katalityczną wariantów strukturalnych. Pomimo osiągniętego postępu, niezbędne jest prowadzenie dalszych prac zmierzających do zastosowania rybozomów *delta* jako narzędzi molekularnych w biotechnologii lub czynników terapeutycznych w medycynie.

Podziękowania

Praca finansowana z grantu KBN 6P04B01720.

Artykuł otrzymano 28 października 2002
Zaakceptowano do druku 29 stycznia 2003

Piśmiennictwo

1. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR (1982) *Cell* 31: 147-157
2. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S (1983) *Cell* 35: 849-857
3. Tuerk C, Gold L (1990) *Science* 249: 505-510
4. Ellington AD, Szostak JW (1990) *Nature* 346: 818-822
5. Robertson DL, Joyce GF (1990) *Nature* 344: 467-468
6. Yarus M, Illangasekare M (1999) W: Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF (red) *The RNA World, Second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, str. 183-196
7. Ellington AD, Robertson MP (2001) W: Soll D, Nishimura S, Moore P (red) *RNA*. Elsevier Science Ltd., str. 155-186
8. Joyce GF (2002) *Nature* 418: 214-221
9. Ferré-D'Amaré A R, Zhou K, Doudna J A (1998) *Nature* 395: 567-574
10. Perrotta A T, Shih I, Been M D (1999) *Science* 286: 123-126
11. Nakano S, Chadalavada DM, Bevilacqua PC (2000) *Science* 287: 1493-1497
12. Nissen P, Ban N, Hansen J, Moore P B, Steitz T A (2000) *Science* 289: 920-930
13. Polacek N, Gaynor M, Yassin A, Mankin A S (2001) *Nature* 411: 498-501
14. Valadkan S, Manley J L (2001) *Nature* 413: 701-707
15. Rizzetto M, Canese M G, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G (1977) *Gut* 18: 997-1003
16. Rizzetto M, Hoyer B, Canese M G, Shih J W, Purcell R H, Gerin J L (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6124-6128
17. Lazinski D W, Taylor J M (1995) *RNA* 1: 225-233
18. Lai M M (1995) *Annu Rev Biochem* 64: 259-286
19. Sidorkiewicz M, Płucienniczak A (1993) *Post Biochem* 39: 99-104
20. Sidorkiewicz M, Płucienniczak A (1994) *Post Biochem* 40: 143-149
21. Taylor J M (1996) W: Fields B N, Knipe D M, Howley P M (red) *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, str. 2809-2818
22. Dane D S, Cameron C H, Briggs M (1970) *Lancet* 1: 695-698
23. Bonino F, Heermann K H, Rizzetto M, Gerlich W H (1986) *J Virol* 58: 945-950
24. Kuo M Y, Goldberg J, Coates L, Mason W, Gerin J, Taylor J (1988) *J Virol* 62: 1855-1861
25. Gudima S, Chang J, Moraleda G, Azvolinsky A, Taylor J (2002) *J Virol* 76: 3709-3719
26. Casey J L, Gerin J L (1995) W: Dinter-Gottlieb G (red) *The Unique Hepatitis delta Virus*. Springer-Verlag, New York, str. 111-124
27. Chang F L, Chen P J, Tu S J, Wang C J, Chen D S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8490-8494
28. Ryu W S, Bayer M, Taylor J (1992) *J Virol* 66: 2310-2315
29. Sharmeen L, Kuo M Y, Dinter-Gottlieb G, Taylor J (1988) *J Virol* 62: 2674-2679
30. Kuo M Y, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J (1988) *J Virol* 62: 4439-4444
31. Wu H N, Lin Y J, Lin F P, Makino S, Chang M F, Lai M M (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1831-1835
32. Wu H N, Lai M M (1989) *Science* 243: 652-654
33. Fu T B, Taylor J (1993) *J Virol* 67: 6965-6972
34. Filipovska J, Konarska M M (2000) *RNA* 6: 41-54
35. Yamaguchi Y, Filipovska J, Yano K, Furuya A, Inukai N, Narita T, Wada T, Sugimoto S, Konarska M M, Handa H (2001) *Science* 293: 124-127
36. Modahl L E, Macnaughton T B, Zhu N, Johnson D L, Lai M M (2000) *Mol Cell Biol* 20: 6030-6039
37. Wang K S, Choo Q L, Weiner A J, Ou J H, Najarian R C, Thayer R M, Mullenbach G T, Denniston K J, Gerin J L, Houghton M (1986) *Nature* 323: 508-514
38. Perrotta A T, Been M D (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 6821-6827
39. Perrotta A T, Been M D (1991) *Nature* 350: 434-436
40. Chao Y C, Chang M F, Gust I, Lai M M (1990) *Virology* 178: 384-392
41. Chao M, Hsieh S Y, Taylor J (1991) *J Virol* 65: 4057-4062
42. Imazeki F, Omata M, Ohto M (1990) *J Virol* 64: 5594-5599
43. Lee C M, Bih F Y, Chao Y C, Govindarajan S, Lai M M (1992) *Virology* 188: 265-273
44. Makino S, Chang M F, Shieh C K, Kamahora T, Vannier D M, Govindarajan S, Lai M M (1987) *Nature* 329: 343-346
45. Saldanha J A, Thomas H C, Monjardino J P (1990) *J Gen Virol* 71: 1603-1606
46. Kos T, Molijn A, van Doorn L J, van Belkum A, Dubbeld M, Schellekens H (1991) *J Med Virol* 34: 268-279
47. Casey J L, Brown T L, Colan E J, Wignall F S, Gerin J L (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9016-9020
48. Tanner N K (1995) W: Dinter-Gottlieb G (red) *The Unique Hepatitis Delta Virus*. Springer-Verlag, New York, str. 11-29
49. Branch A D, Robertson H D (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10163-10167
50. Wu H N, Huang Z S (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 5937-5941
51. Kumar P K, Suh Y A, Taira K, Nishikawa S (1993) *FASEB J* 7: 124-129
52. Wu H N, Lee J Y, Huang H W, Huang Y S, Hsueh T G (1993) *Nucleic Acids Res* 21: 4193-4199
53. Been M D, Perrotta A T, Rosenstein S P (1992) *Biochemistry* 31: 11843-11852
54. Perrotta A T, Been M D (1996) *Nucleic Acids Res* 24: 1314-1321
55. Thill G, Vasseur M, Tanner N K (1993) *Biochemistry* 32: 4254-4262
56. Jeoung Y H, Kumar P K, Suh Y A, Taira K, Nishikawa S (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 3722-3727
57. Been M D, Wickham G S (1997) *Eur J Biochem* 247: 741-753
58. Shih I, Been M D (2002) *Annu Rev Biochem* 71: 887-917
59. Tanner N K, Schaff S, Thill G, Petit-Koskas E, Crain-Denoyelle A M, Westhof E (1994) *Curr Biol* 4: 488-498
60. Been M D, Perrotta A T (1995) *RNA* 1: 1061-1070
61. Bravo C, Lescure F, Laugaa P, Fourrey J L, Favre A (1996) *Nucleic Acids Res* 24: 1351-1359
62. Kawakami J, Kumar P K, Suh Y A, Nishikawa F, Kawakami K, Taira K, Ohtsuka E, Nishikawa S (1993) *Eur J Biochem* 217: 29-36
63. Nishikawa F, Kawakami J, Chiba A, Shirai M, Kumar P K, Nishikawa S (1996) *Eur J Biochem* 237: 712-718
64. Wadkins T S, Perrotta A T, Ferré-D'Amaré A R, Doudna J A, Been M D (1999) *RNA* 5: 720-727
65. Nishikawa F, Nishikawa S (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 925-931
66. Tanaka Y, Hori T, Tagaya M, Sakamoto T, Kurihara Y, Katahira M, Uesugi S (2002) *Nucleic Acids Res* 30: 766-774
67. Matysiak M, Wrzesiński J, Ciesiołka J (1999) *J Mol Biol* 291: 283-294
68. Wrzesiński J, Łęgicwicz M, Ciesiołka J (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 1785-1793
69. Isambert H, Siggia E D (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6515-6520
70. Perrotta A T, Been M D (1998) *J Mol Biol* 279: 361-373

71. Perrotta A T, Nikiforova O, Been MD (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 795-802
72. Chadalavada D M, Knudsen S M, Nakano S, Bevilacqua P C (2000) *J Mol Biol* **301**: 349-367
73. Chadalavada D M, Senchak S E, Bevilacqua P C (2002) *J Mol Biol* **317**: 559-575
74. Warashina M, Takagi Y, Stec W J, Taira K (2000) *Curr Opin Biotechnol* **11**: 354-362
75. Ferré-D' Amaré A R, Doudna J A (2000) *J Mol Biol* **295**: 541-556
76. Connell G J, Yarus M (1994) *Science* **264**: 1137-1141
77. Narlikar G J, Herschlag D (1997) *Annu Rev Biochem* **66**: 19-59
78. Oyelere A K, Kardon J R, Strobel S A (2002) *Biochemistry* **41**: 3667-3675
79. Lupták A, Ferré-D' Amaré A R, Zhou K, Zilm K W, Doudna J A (2001) *J Am Chem Soc* **123**: 8447-8452
80. Pereira M J B, Haris D A, Rueda D, Walter N G (2002) *Biochemistry* **41**: 730-740
81. Murray J B, Seyhan A A, Walter N G, Burke J M, Scott W G (1998) *Chem Biol* **5**: 587-595
82. Shih I H, Been MD (1999) *RNA* **5**: 1140-1148
83. Zhou D M, He Q C, Zhou J M, Taira K (1998) *FEBS Lett* **431**: 154-160
84. Warashina M, Kuwabara T, Nakamatsu Y, Taira K (1999) *Chem Biol* **6**: 237-250
85. Scott E C, Uhlenbeck O C (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 479-484
86. Wang S, Karbstein K, Peracchi A, Beigelman L, Herschlag D (1999) *Biochemistry* **38**: 14363-14378
87. Ciesiołka J, Wrzesiński J, Górnicki P, Podkowiński J, Krzyżosiak W J (1989) *Eur J Biochem* **186**: 71-77
88. Kazakov S, Altman S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9193-9197
89. Streicher B, Westhof E, Schroeder R (1996) *EMBO J* **15**: 2556-2564
90. Ciesiołka J (1999) W: Barciszewski J, Clark B F C (red) *RNA Biochemistry and Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, str. 111-122
91. Rogers J, Chang A H, von Ahlsen U, Schroeder R, Davies J (1996) *J Mol Biol* **259**: 916-925
92. Lafontaine D A, Ananvoranich S, Perreault J (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 3236-3243
93. Ananvoranich S, Lafontaine D A, Perreault J P (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 1473-1479
94. Nakano S, Proctor D J, Bevilacqua P C (2001) *Biochemistry* **40**: 12022-12038
95. Szymański M, Barciszewski J (1995) *Post Biol Kom sup* **6**: 13-25
96. MacPherson J L, Ely J A, Sun L Q, Symonds G P (1999) *Frontiers in Bioscience* **4**: 497-505
97. Rossi J J (1999) *Chem Biol* **6**: 33-37
98. Goodchild J (2000) *Curr Op Mol Therapeutics* **2**: 272-281
99. Sullenger B A, Gilboa E (2002) *Nature* **418**: 252-258
100. Shaw L C, Whalen P O, Drenser K A, Yan W, Hawsirth W W, Lewin A S (2000) *Methods Enz* **316**: 761-776
101. Bramlage B, Luzzi E, Eckstein F (1998) *Trends Biotechnol* **16**: 434-438
102. Dutkiewicz D, Ciesiołka J (2002) *Biotechnologia* **56**: 57-70
103. Perrotta A T, Been MD (1992) *Biochemistry* **31**: 16-21
104. Poisson V, Mercure S, Lafontaine D A, Perreault J P (1997) *Nucleic Acids Symp Series* **36**: 83-85
105. Fauzi H, Kawakami J, Nishikawa F, Nishikawa S (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 3124-3130
106. Mercure S, Lafontaine D A, Ananvoranich S, Perreault J (1998) *Biochemistry* **37**: 16975-16982
107. Shih I H, Been MD (2000) *Biochemistry* **39**: 9055-9066
108. Ananvoranich S, Fiola K, Ouellet J, Deschenes P, Perreault J P (2001) *Methods Enz* **341**: 553-566
109. Wu H N, Lai M M (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 5575-5579
110. Lèvesque D, Choufani S, Perreault J P (2002) *RNA* **8**: 464-477
111. Nishikawa F, Roy M, Fauzi H, Nishikawa S (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 403-410
112. Ananvoranich S, Perreault J P (1998) *J Biol Chem* **273**: 13182-13188
113. Deschenes P, Lafontaine D A, Charland S, Perreault J P (2000) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **10**: 53-61
114. Shih I H, Been M D (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **4**: 1489-94
115. Roy G, Ananvoranich S, Perreault J P (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 942-948
116. Kato Y, Kuwabara T, Warashina M, Toda H, Taira K (2001) *J Biol Chem* **18**: 15378-15385
117. Pattnaik A K, Ball L A, LeGrone A W, Wertz G W (1992) *Cell* **69**: 1011-1020
118. Schürer H, Lang K, Schuster J, Mörl M (2002) *Nucleic Acids Res* **12**: e56
119. Rupert P B, Ferré-D' Amaré A R (2001) *Nature* **410**: 780-786

Białka szoku zimna mikroorganizmów

Microbial cold shock proteins

AGNIESZKA KAUFMAN¹, MARIANNA TURKIEWICZ²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wpływ niskiej temperatury na komórki
- III. Białka szoku zimna *Escherichia coli*
 - III-1. Rodzina białek CspA
 - III-2. Regulacja ekspresji genów Csp *E. coli*
- IV. Białka szoku zimna innych bakterii
 - IV-1. Csp bakterii mezofilnych
 - IV-2. Csp bakterii zimnolubnych
 - IV-3. Csp bakterii termofilnych
- V. Białka szoku zimna drobnoustrojów eukariotycznych
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: BPTI — inhibitor trypsyny z trzustki wołu (ang. *bovine pancreatic trypsin inhibitor*); Cap — białko aklimatyzacji do zimna (ang. *cold acclimation protein*); CsdA — (ang. *cold shock domain protein A*) — białko A zawierające domenę szoku zimna, wykazujące aktywność helikazy zależnej od ATP; Csp — białko szoku zimna (ang. *cold shock protein*); CspA ÷ CspI — rodzina CspA białek szoku zimna; DB — (ang. *downstream box*) — fragment mRNA białek szoku zimna zaangażowany w regulację ich ekspresji; H-NS — (ang. *histone — like protein*) — białko wiążące się z DNA; Hpr — zawierające histydyne białko — przenośnik jonów fosforanowych (ang. *histidine — containing phosphocarrier protein*), wchodzi w skład wieloenzymowego kompleksu bakteryjnej fosfotransferazy; Hsp — białko szoku ciepła (ang. *heat shock protein*); IF-2 — czynnik inicjacji translacji (ang. *initiation factor*); INP — białka nukleacyjne lodu (ang. *ice nucleating proteins*); L2, L7, L12 — białka dużej podjednostki rybosomalnej; mRNA — informacyjny RNA (ang. *messenger RNA*); NMR — spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego; NusA — (ang. *N utilization substance protein A*) — białko uczestniczące w transkrypcji; OB — rodzina białek wiążących oligonukleotydy *OB-fold proteins* (ang. *oligonucleotide binding*); RbfA — (ang. *ribosome binding factor*) — białko wiążące rybosom; RNP — region w cząsteczce białka opiekuńczego (chaperonowego) odpowiedzialny za wiązanie RNA i ssDNA; rRNA — rybosomalny RNA; S6, S12, S17 — białka małej podjednostki rybosomalnej; 16S rRNA — jeden z rRNA o współczynniku sedymentacji 16S; ssDNA — pojedyncza nić DNA; TF — czynnik transkrypcyjny

Contents:

- I. Introduction
- II. Effects of low temperature on microorganisms
- III. Cold shock proteins of *Escherichia coli*
 - III-1. Family of CspA proteins
 - III-2. Regulation of expression of Csp genes of *E. coli*
- IV. Cold shock proteins from other bacteria
 - IV-1. Csp from mesophilic bacteria
 - IV-2. Csp from psychrophilic bacteria
 - IV-3. Csp from thermophilic bacteria
- V. Cold shock proteins of eukaryotic microorganisms
- VI. Conclusions

(ang. *transcriptional factor*); THP — białko termicznej histerezy (ang. *thermal hysteresis protein*); Tip, Tir — białka indukowane zmianą temperatury (ang. *temperature inducible proteins*); UP — (ang. *upstream element*) — sekwencja mRNA bogata w pary AU; 5'-UTR — (ang. *5'-untranslated region*) — niekodujący fragment genów białek szoku zimna, bierze udział w regulacji ich ekspresji; WNKT — wielonienasycone niezbędne kwasy tłuszczowe; Y-box — zawierająca domenę szoku zimna rodzina białek eukariontów

I. Wstęp

Trwające od końca lat 60-tych prace nad wpływem niskiej temperatury na komórki i syntezę białek w tych warunkach [1-3], zaowocowały opisaniem w 1987 roku przez Jones i in. [4] pierwszego białka szoku zimna, CspA z *Escherichia coli*. Dziś wiadomo już, że zarówno w komórkach *Prokaryota*, jak i *Eukaryota*, w wyniku nagłego obniżenia temperatury następuje indukcja biosyntezy białek szoku zimna. Nie tylko zresztą spadek temperatury stymuluje syntezę Csp, ale i inne stresy: promieniowanie UV, zmiany pH, ciśnienia, zasolenia, obecność niektórych substancji biologicznie czynnych, np. antybiotyków, a nawet limitowanie źródła węgla, bądź rozcieńczenie kultury [5]. Podstawową funkcją tych białek jest niwelowanie niekorzystnego wpływu środowiska, w szczególności skutków obniżenia temperatury [6].

Najlepiej poznanym dotychczas białkiem szoku zimna jest wspomniane już CspA *E. coli*. Jego struk-

¹ Mgr inż., ² dr hab. prof. PŁ; Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź; e-mail: ¹akauf@w-s.pl, ²mtur@ck-sg.p.lodz.pl

tura, funkcja i regulacja syntezy na poziomie transkrypcji, translacji i stabilności mRNA, były i są intensywnie i szczegółowo badane. Białka homologiczne do CspA *E. coli* zostały zidentyfikowane u wielu innych mikroorganizmów, nie tylko bakterii, ale i pleśni [6, 7].

Wysoki stopień homologii oraz znaczna konserwatywność miejsc promotorowych genów białek szoku zimna u różnych gatunków świadczą, że rola Csp jest nie tylko związana z procesem adaptacji do niskich temperatur (tworzeniem tolerancji na temperatury niższe od fizjologicznych), ale że ich obecność jest prawdopodobnie konieczna do prawidłowego wzrostu i rozwoju komórek także w warunkach normalnych, bezstresowych.

Białka szoku zimna są ewolucyjnie bardzo stare. Uważa się, że ich przodek mógł się pojawić nawet 3,5 mld lat temu, w początkach ewolucji organizmów jednokomórkowych [8].

II. Wpływ niskiej temperatury na komórki

W przeciwieństwie do skutków podwyższenia temperatury (szok ciepła) i odpowiedzi na taką zmianę, które okazały się uniwersalne, w przypadku obniżenia temperatury nie jest to już tak oczywiste. Ogólnie wiadomo, że znaczny wzrost temperatury powoduje termiczną denaturację kwasów nukleinowych i białek — ich rozfałdowanie, ale także agregację, prowadzącą do utraty właściwości funkcjonalnych. Mechanizm obronny komórki jest w takim przypadku zawsze podobny i ściśle związany z syntezą zestawu dobrze już znanych białek szoku ciepła Hsp, mających charakter uniwersalny i silnie konserwatywny. Działają one jako molekularne chaperony, stabilizują strukturę białek, zapobiegając ich termicznej denaturacji, umożliwiają renaturację uszkodzonych cząsteczek i w końcu działają jako enzymy proteolityczne, tzw. proteazy szoku termicznego, usuwając z komórki nieodwracalnie uszkodzone białka [9-14].

Odpowiedź komórki na obniżenie temperatury jest o wiele bardziej złożona i znacznie słabiej poznana, a do najpoważniejszych skutków szoku zimna należą:

- utrata płynności membran komórkowych, przejawiająca się przejściem z fazy ciekłego krystalitu do fazy żelu, co prowadzi do istotnych zaburzeń, a nawet zahamowania transportu jonów i innych niezbędnych dla komórki substancji;
- usztywnienie struktury drugorzędowej kwasów nukleinowych i trudności w otwarciu podwójnej helisy DNA, ze względu na jego zbyt wysoką su-

perhelikalną gęstość, a co za tym idzie obniżenie tempa replikacji DNA oraz transkrypcji i translacji mRNA. Zahamowanie syntezy białka pod wpływem szoku zimna wynika także z trudności w formowaniu się polisomów oraz translacyjnie kompetentnych rybosomów, które przechodzą w tzw. stan nietranslacyjny, wrażliwy na niską temperaturę (ang. *cold-sensitive*);

- spadek szybkości fałdowania się białek, a zwłaszcza tworzenia się mostków disiarczkowych;
- obniżenie szybkości reakcji enzymatycznych, ograniczające tempo metabolizmu;
- formowanie się kryształków lodu, które w sposób mechaniczny mogą uszkadzać komórkę [15].

Warto zaznaczyć, że z takimi samymi problemami muszą się również uporać mikroorganizmy bytujące w permanentnie zimnych środowiskach, stanowiące prawdopodobnie najliczniejszą grupę drobnoustrojów, bowiem ponad 80% biosfery (a dla mórz i oceanów nawet przeszło 90%) to obszary o temperaturze poniżej 5°C [16]. Oczywiście, w ich przypadku wymienione efekty nie są związane z nagłym obniżeniem się temperatury, a wynikają z nieprzerwanego bytowania w zimnie, np. w obszarach polarnych. W drodze ewolucji mikroorganizmy te wykształciły wiele mechanizmów adaptacji do życia w niskich temperaturach. I tak np. dla zachowania płynności błon, w ich fosfolipidach nie tylko, podobnie jak u innych organizmów poddawanych szokowi zimna, wzrasta ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych, ale także zawartość kwasów rozgałęzionych, zarówno izomerów *anteizo*, jak i *izo* [17], co nie jest już równie uniwersalne jak wzrost stopnia nienasycenia łańcuchów węglowodorowych odpowiedzią na niską temperaturę, a w sposób zasadniczy zwiększa giętkość fosfolipidów membranowych. Mikroorganizmy pochodzące z takich środowisk produkują również adaptowane do zimna enzymy, zwane często psychrozymami. Ich skuteczność katalityczna w niskich temperaturach, mierzona wartościami stałej katalitycznej k_{kat} i stałej specyficzności k_{kat}/K_m [18, 19] jest wyższa niż homologicznych enzymów drobnoustrojów mezofilnych i wynika nie ze zmian w molekularnym mechanizmie katalizy, a ze zwiększonej elastyczności cząsteczek, zawierających np. dodatkowe powierzchniowe pętle polarne. Obecność takiej pętli stwierdziliśmy w doskonale zaadaptowanej do działania w niskiej temperaturze subtylizynopodobnej proteinazie antarktycznych drożdży [20]. Co więcej, tempo biosyntezy białek katalitycznych u mikroorganizmów z permanentnie zimnych biotopów jest w temperaturach fizjologicznych często nawet kilkakrotnie wyższe aniżeli w temperaturach

optymalnych dla wzrostu tych szczepów. Taką temperaturozależność wykazaliśmy w naszym zespole badając biosyntezę kilku antarktycznych proteinaz, m. in. metaloproteinazy *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov [21, 22] oraz unikatowej pozakomorkowej subtilazy endemicznych drożdży *Leucosporidium antarcticum* [23].

Istotnym przystosowaniem do zimna, zwłaszcza w warunkach spadku temperatury poniżej punktu zrzepnięcia wody, jest również synteza białek zapobiegających powstawaniu dużych kryształków lodu (ang. *antifreeze proteins*), zwanych także białkami termicznej histerezy (THP) [24, 25] oraz synteza tzw. białek nukleacyjnych lodu (INP). Te pierwsze adsorbując się na zarodkach heksagonalnych kryształków lodu nie dopuszczają do ich wzrostu, te drugie same działają jako zarodki krystalizacji, jedna-

III. Białka szoku zimna *Escherichia coli*

Odpowiedź na stres zimna została najlepiej poznana i udokumentowana dla mezofilnych bakterii *Escherichia coli*. Wykazano, że obniżenie temperatury hodowli tych mikroorganizmów z 37°C do 10°C powoduje zahamowanie syntezy większości białek komórkowych. I tak np. dwie godziny po obniżeniu temperatury w elektroforezie dwukierunkowej lizatów komórkowych *E. coli* można wykryć jedynie ok. 30 ÷ 40 białek, z których 14 to typowe Csp [4]. Większość z nich została już zidentyfikowana. CspA, B, G, i I oraz CsdA, RbfA, NusA i PNP-aza (Tabela 1) zaliczono do tzw. pierwszej klasy białek szoku zimna, które w optymalnej temperaturze wzrostu *E. coli* (37°C) są produkowane w znikomych ilościach, natomiast w temperaturze niższej następuje gwałtowna

Tabela 1

Białka szoku zimna *E. coli* [6]

Białko	Funkcja
Klasa I (>100 krotna indukcja biosyntezy)	
Rodzina białek CspA:	
CspA	chaperon RNA/DNA
CspB	chaperon RNA/DNA
CspG	chaperon RNA/DNA
Cspl	chaperon RNA/DNA
CsdA	związane z rybosomami białko o masie 70 kDa i aktywności helikazy RNA
RbfA	czynnik o masie 15 kDa wiążący rybosomy
NusA	uczestniczy w procesach terminacji i antyterminacji transkrypcji
PNP-aza	fosforylaza polinukleotydowa
Klasa II (<10 krotna indukcja biosyntezy)	
RecA	czynnik rekombinacji
GyrA	podjednostka α gyrazy DNA o aktywności topozomerazy
IF-2	czynnik inicjacji translacji
H-NS	białko wiążące DNA

kże powstające z ich udziałem kryształki lodu mają minimalne rozmiary, nie zagrażające integralności komórki [25]. Obydwa rodzaje białek są wytwarzane głównie u ektotermicznych eukariontów; THP znaleziono dotąd tylko u kilku taksonów *Prokaryota* (*Rhodococcus erythropolis*, *Micrococcus cyphilus* i *Pseudomonas putida*) [26]. W końcu efektem niskiej temperatury jest biosynteza białek szoku zimna, Csp, które są zaangażowane w zwiększanie efektywności replikacji, transkrypcji i translacji w niskiej temperaturze, bowiem w takich warunkach dochodzi do znacznego spowolnienia, a nawet zahamowania wszystkich tych procesów [6, 8].

indukcja ich biosyntezy do bardzo wysokiego poziomu. Są one odpowiedzialne za zainicjowanie właściwej odpowiedzi komórki na zmianę temperatury poprzez biosyntezę specyficznych białek zawierających domenę szoku zimna (ang. *cold-shock domain proteins*), nie wymagających do biosyntezy dodatkowych czynników translacyjnych, które w warunkach obniżonej temperatury są nieaktywne. Celem tego etapu jest wyposażenie komórki w czynniki zastępcze, umożliwiające prawidłowy przebieg procesów transkrypcji i translacji wszystkich białek komórkowych w panujących warunkach niskiej temperatury. Działają one jako chaperony oraz aktywatory transkrypcji i translacji [4, 6, 27, 28].

CspA, B, G i I są najprawdopodobniej chaperonami ssRNA/DNA [28, 29], CsdA jest związanym z rybosomami białkiem o aktywności helikazy RNA, które ma zdolność przywracania pierwotnej konformacji cząsteczkom RNA, mającym w niskiej temperaturze tendencję do nieprawidłowego zwijania się [30]. Należy ono do rodziny helikaz RNA zależnych od ATP i zawierających motyw sekwencyjny DEAD (tzw. *DEAD-box helicases*) [25, 31]. RbfA jest białkiem o dużym powinowactwie do podjednostki 30S (tworzy kompleks z 5'-terminalną helisą 16S rRNA) [32], NusA uczestniczy w procesach terminacji i antyterminacji transkrypcji [33], a PNP-aza (fosforylaza polinukleotydowa) jest zaangażowana w degradację mRNA [34]. Uważa się, że białka szoku zimna CsdA, RbfA oraz czynnik inicjacji translacji IF2, również zaliczany do Csp, wiążąc się z podjednostkami rybosomów powodują ich przejście ze stanu nietranslacyjnego, wrażliwego na zimno, do stanu translacyjnego, odpornego na zimno (ang. *cold-resistant*).

Do drugiej klasy białek szoku zimna, które u *E. coli* są obecne także w 37°C należą: czynnik rekombinacji RecA [35], zaangażowany również w indukcję odpowiedzi SOS, koniecznej do naprawy DNA i będącej ważną częścią ogólnej odpowiedzi komórki na zimno, wspomniany już białkowy czynnik inicjacji translacji IF-2 [4], H-NS — niezbędne dla wzrostu białko wiążące się z DNA nukleoidu [36]; GyrA — podjednostka α gyrazy DNA o aktywności topoizomerazy [37] oraz czynnik transkrypcyjny TF [38] [Tabela 1]. Indukcja ich biosyntezy w wyniku obniżenia temperatury nie jest aż tak gwałtowna jak w przypadku białek klasy pierwszej, prowadzi bowiem do ok. 10-krotnego wzrostu ich stężenia. Prawdopodobnie Csp klasy drugiej pełnią funkcje naprawcze. Dzięki ich obecności możliwa jest dalsza synteza i fałdowanie białek w niskiej temperaturze oraz przywracanie białkom uszkodzonym w wyniku obniżenia temperatury ich funkcjonalnych właściwości poprzez powtórne, prawidłowe zwinięcie łańcucha polipeptydowego (*refolding*). Ogólnie ujmując, Csp klasy drugiej są zaangażowane w ustalenie się „nowej” równowagi w komórce, pozwalając jej w ten sposób na dalszy wzrost i rozwój w warunkach obniżonej temperatury. Podczas przedłużającego się szoku zimna białka te są syntetyzowane w sposób ciągły [27].

III-1. Rodzina białek CspA

Jak wspomniano, głównym białkiem szoku zimna *E. coli* jest CspA, małe białko o masie cząsteczkowej

ok. 7,4 kDa wykryte przez Jones i wsp. [4]. W wyniku nagłego obniżenia temperatury tempo jego biosyntezy gwałtownie wzrasta, tak, że może ono stanowić aż do 13% (10^6 kopii na komórkę) wszystkich białek komórkowych, syntetyzowanych w fazie aklimatyzacji [39]. Co więcej, CspA jest niezbędne dla rozpoczęcia i regulacji syntezy innych białek szoku zimna *E. coli* [40].

CspA zbudowane jest z 70 aminokwasów. Trójwymiarowa struktura tego białka została określona metodami krystalografii (Schindelin i in. 1994) [41] oraz spektroskopii NMR (Newkirk i in. 1994) [42]. Zarówno w roztworach wodnych, jak i po wykryształizowaniu, CspA występuje w postaci monomeru. Stwierdzono, że łańcuch polipeptydowy tego białka ma strukturę β -fałdową i nie zawiera obszarów helikalnych. W cząsteczce występuje pięć odcinków o konformacji β -przeciwrownoległej (od β_1 do β_5), tworzących strukturę $(\beta)_5$ -beczułki z umieszczonymi na zewnątrz po jednej stronie molekuly resztami aromatycznymi, głównie fenyloalaniny (6 reszt) oraz tryptofanu, tyrozyny i histydyny. W obrębie fragmentów β_2 i β_3 zostały zidentyfikowane dwa miejsca, RNP1 i RNP2 (Ryc. 1A), mające zdolność preferencyjnego wiązania bogatych w pirymidyny odcinków jednoniciowego RNA i ssDNA, co potwierdza chaperonowy charakter tego białka i wskazuje, że może ono destabilizować wtórne struktury kwasów nukleinowych, istotnie utrudniając inicjację translacji [27, 28, 43]. Struktura $(\beta)_5$ -beczułki, charakterystyczna dla CspA i innych małych białek szoku zimna, występuje także jako domena w licznych białkach niezwiązanych z tym stresem, natomiast mających zdolność wiązania się z oligonukleotydami lub oligosacharydami — tzw. białek *OB-fold*. Należy do nich m. in. czynnik inicjacji translacji aIFa z archeona *Methanococcus janaschi*, czynnik terminacji transkrypcji Rho z *E. coli*, białka rybosomalne: L2 z *Bacillus stearothermophilus* oraz S12 i S17 z *Thermus thermophilus*, a także liczne białka eukariotyczne, np. *Y-box* (por. rozdział V) [5].

Ewolucyjna rodzina białek CspA obejmuje u *E. coli* dziewięć białek, od CspA do CspI, które wykazują różny, ale stosunkowo wysoki stopień homologii, zawierają od 69 do 74 aminokwasów i mogą znacznie się różnić punktem izoelektrycznym, który mieści się w zakresie od 5, 53 do 10, 72 [28, 44]. Biosynteza nie wszystkich z nich jest indukowana obniżeniem temperatury i może podlegać odmiennej regulacji. Udowodniono, że tylko CspA, B, G i I są typowymi białkami szoku zimna, a ich synteza jest regulowana na poziomie transkrypcji, translacji i stabilności mRNA [27, 39, 44, 45]. Stwierdzono rów-

niez, że w wyniku delekcji genu *cspA*, funkcje białka CspA przejmują CspB i G. Biosynteza CspD jest indukowana przy braku składników odżywczych, np. glukozy, natomiast CspC i E są syntetyzowane w sposób ciągły podczas wzrostu komórek w warunkach normalnych i prawdopodobnie odgrywają ważną rolę w kondensacji nukleoidu [28].

Szczegółowe badania poziomu stężenia CspA w różnych fazach wzrostu *E. coli* w 37°C wykazały, że i to białko jest syntetyzowane w warunkach bezstresowych, bowiem w początkach fazy eksponencjalnego wzrostu jego stężenie osiąga ok. 50 μM, jednak pod koniec tej fazy jest już prawie niewykrywalne [46]. Oznacza to, że CspA odgrywa jakąś ważną, choć nie w pełni jeszcze zrozumiałą rolę w prawidłowym wzroście komórek *E. coli* w warunkach normalnych. Dla porównania należy dodać, że po szoku zimna, w końcu fazy aklimatyzacji stężenie tego białka wynosi 100 μM, jest więc tylko 2-krotnie wyższe. Te wyniki wskazują na potrzebę przeprowadzenia szerszych badań poziomu ekspresji CspA w różnych warunkach i fazach wzrostu kultur *E. coli*.

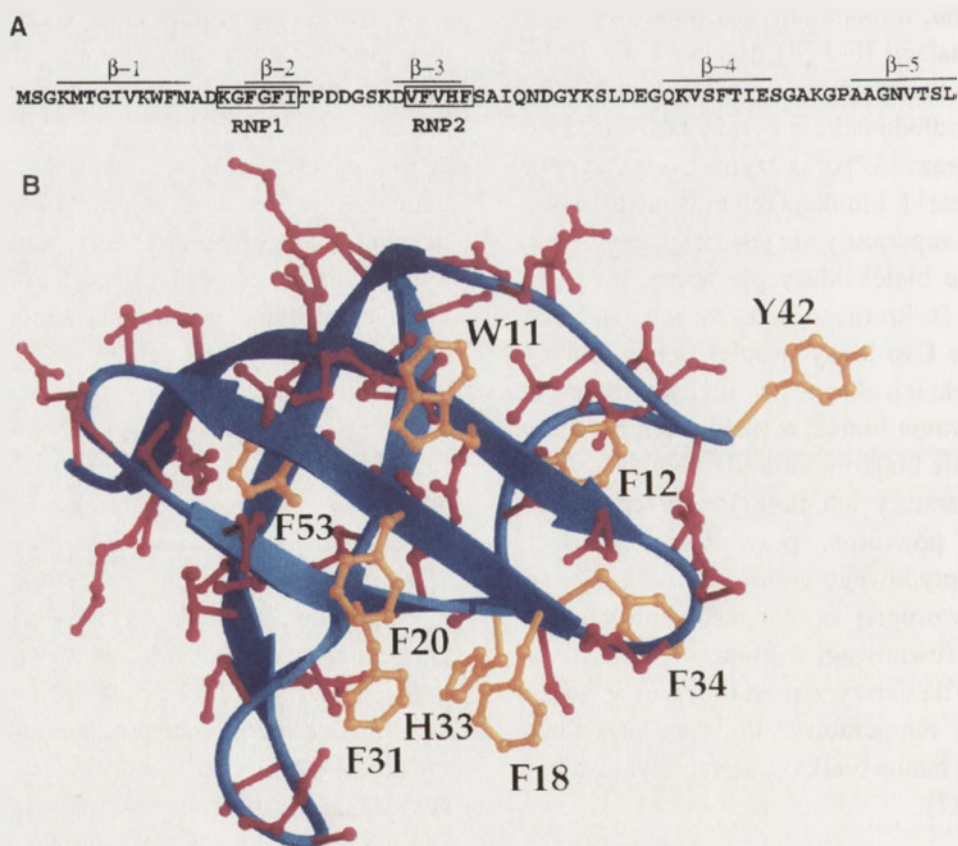
Białka rodziny CspA podzielono dodatkowo na dwie podgrupy, różniące się między sobą pochodzeniem ewolucyjnym. W jednej z nich znalazły się

CspF i H, a w drugiej pozostałe, homologiczne do CspA białka: A, B, G, I, C i E [44]. Lokalizacja genów *csp* w chromosomie *E. coli* sugeruje, że rodzina tych białek, regulujących odpowiedź komórek na różne stropy środowiskowe, powstała najprawdopodobniej w wyniku wielokrotnej duplikacji pierwotnego genu.

CspF i H, również zaliczane do ewolucyjnej rodziny białek CspA, są najściślej powiązane z tą grupą białek, jak i ze zidentyfikowanymi, homologicznymi do nich białkami eukariontów z domeną szoku zimna. Przede wszystkim nie wykazują wspólnej dla tych białek cechy — nie są bogate w aminokwasy aromatyczne i zawierają, odpowiednio, zaledwie 3 i 4 takie reszty, podczas gdy w CspA występuje ich aż 9 (Ryc. 1B). Przypuszcza się, że te białka mają zdolność wiązania się z dwuniciowym DNA. Nie wiadomo, czy pełnią jakąś rolę w odpowiedzi komórek *E. coli* na szok zimna [28].

III-2. Regulacja ekspresji genów *csp E. coli*

Dotychczasowe badania wskazują, że ekspresja genów *csp E. coli* jest regulowana na trzech poziomach: transkrypcji, stabilności mRNA i translacji,

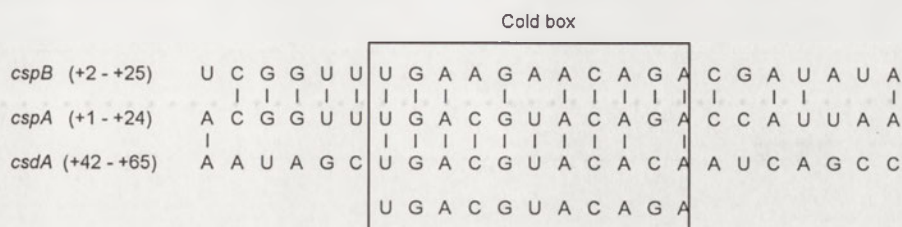


Ryc. 1. Trójwymiarowa struktura CspA *E. coli*. A: Sekwencja aminokwasów CspA; fragmenty odpowiadające regionom β_1 - β_5 są zaznaczone liniami na górze; miejsca wiążące RNA: RNP1 i RNP2 zostały wzięte w ramkę; B: Struktura CspA *E. coli* uzyskana techniką NMR [28].

jednakże molekularne mechanizmy tych procesów są znane tylko w zarysie.

Istotną rolę pełni w nich kilka sekwencji obecnych w genach *cspA*, *B*, *G*, *I* i innych regulowanych szokiem zimna białek *E. coli*, a także w ich transkryptach:

— wyjątkowo długi (w przypadku *cspA* liczący 159 nukleotydów) niekodujący liderowy region 5'-UTR (Ryc. 2), zawierający przy 5'-końcu unikatowy, silnie konserwowany odcinek 11 par za-



Ryc. 2. Homologiczne sekwencje w regionie 5'-UTR *cspA*, *cspB* i *csdA* *E. coli*; zakreślony został silnie konserwatywny region 11. zasad, tzw. „cold box” [50].

sad, zwany „cold-box”. Stanowi on tzw. miejsce przerwy w transkrypcji (ang. *transcriptional pausing site*), któremu przypisuje się szczególne znaczenie w represji tego procesu;

- 14-zasadowa sekwencja, „downstream-box” (DB), zlokalizowana w regionie kodującym, w odległości 12 par zasad za kodonem inicjacji CspA (Rys. 3), komplementarna do jednej z sekwencji w 16S rRNA, leżącej w pobliżu dekodującego obszaru jego cząsteczki (ang. *RBS* — *decoding region*). DB występuje również w *cspB* i *G* oraz w *csdA* i *rbfA* *E. coli*;
- sekwencja „upstream-box” (UP) zlokalizowana w 5'-UTR *cspA*, *B*, *G* i *I* *E. coli*, 11 zasad powyżej sekwencji Shine — Dalgarno. UP jest również komplementarna do jednego z obszarów w 16S rRNA. Delecja fragmentu 5'-UTR, zawierającego UP znacznie obniża wydajność translacji CspA w warunkach szoku zimna, co może dowodzić, że UP stanowi swego rodzaju wzmacniacz translacji wspomnianych białek [47].

Lokalizacja elementów zaangażowanych w regulację biosyntezy białek szoku zimna została przedstawiona na Ryc. 3.

Należy podkreślić, że w odróżnieniu od Hsp, biosynteza Csp nie wymaga żadnych dodatkowych czynników transkrypcyjnych. Najprawdopodobniej proces ten podlega autoregulacji, zaobserwowano bowiem, że w nieobecności białka CspA tempo transkrypcji jego genu w fazie aklimatyzacji jest bardzo wysokie, po czym w miarę wzrostu jego stężenia — słabnie. Według jednej z hipotez, bezpośrednio po

obniżeniu temperatury, gdy rozpoczyna się w komórce gwałtowna indukcja biosyntezy CspA, polimeraza RNA potrafi w niewyjaśniony do tej pory sposób omijać zawierający sekwencję „cold-box” region w genie tego białka. Następnie, w miarę nagromadzania się CspA, białko to wiąże się z własnym mRNA destabilizując kompleks elongacyjny z polimerazą RNA, czego wynikiem jest attenuacja transkrypcji [27]. W attenuacji transkrypcji *cspA* biorą też udział białka CspC i E, które należą co prawda do

rodziny CspA, ale są syntetyzowane u *E. coli* nie tylko w odpowiedzi na szok zimna, ale także w 37°C [6]. Wiadomo ponadto, że ten szok nie ogranicza regulacyjnej roli bogatego w sekwencje AU regionu UP [47], a promotor genu CspA potrafi w niskich temperaturach zwiększać efektywność transkrypcji wielu innych białek, np. β -galaktozydazy [48]. Wg Brand i in. [49] jest też możliwe, że Csp jako chaperony o dużym powinowactwie (rzędu μ moli) do ssRNA/ DNA stabilizują tworzenie się otwartego kompleksu z polimerazą RNA, co znakomicie ułatwiałoby transkrypcję genów zarówno tych białek, jak i innych, syntetyzowanych w kolejnych, po fazie aklimatyzacji, etapach wzrostu *E. coli* w niskich temperaturach.

Bardzo interesujących wyników, potwierdzających ważną rolę białka CspA w regulacji ekspresji jego genu, dostarczyły badania mutantów *E. coli*. Mutanty te zawierały tak skrócony w regionie kodującym gen *cspA*, że chociaż mógł on ulegać w niskiej temperaturze wydajnej transkrypcji, a transkrypt mógł się wiązać z rybosomami (nie została wycięta z genu sekwencja DB), to jednak nie następowała synteza CspA [29]. W tych warunkach dochodziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek, co nazwano „niskotemperaturowym efektem antybiotycznym skróconego *cspA*” (ang. *low-temperature antibiotic effect of truncated cspA*, LACE). Prawdopodobnie podłożem LACE jest prawie całkowite zniesienie represji transkrypcji *cspA* oraz związanie większości rybosomów przez mRNA białka CspA, co uniemożliwia translację mRNA po-

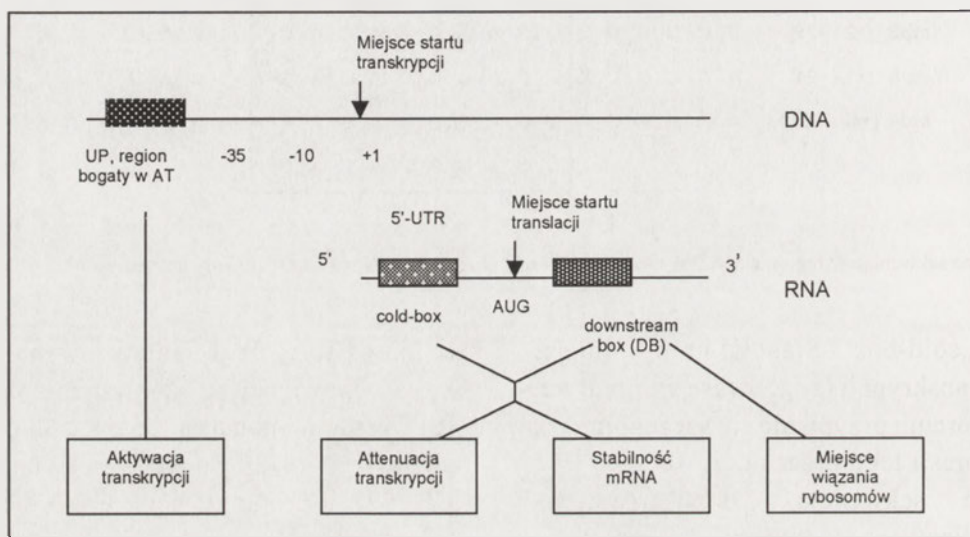
zostałych Csp klasy I i w efekcie (przy braku białek RbfA i CsdA) wszystkich innych białek, niezbędnych do przeżycia drobnoustroju w obniżonej temperaturze.

Po przeniesieniu mutantów *E. coli* z insercjami lub delecjami w obszarze 5'-UTR z 37 do 10°C obserwowano istotne zmiany w indukcji odpowiedzi na szok zimna względem szczepu dzikiego. I tak np. wprowadzenie do genu *cspA* dodatkowej sekwencji pierwszych 25 nukleotydów z odcinka 5'-UTR, w skład której wchodzi „cold-box”, powodowało prze-

cspA w 37°C, w wyniku czego biosynteza tego białka staje się konstytutywna [52].

mRNA CspA jest nie tylko bardziej stabilny w niskiej temperaturze, ale i bardziej efektywnie odczytywany przez rybosomy, które, jak wiadomo, chronią cząsteczki wszystkich mRNA przed degradacją, co może również wpływać na wzrost stabilności mRNA CspA w warunkach szoku zimna [5].

Kluczowym czynnikiem dla wzrostu stabilności mRNA CspA i innych białek szoku zimna jest jednak prawdopodobnie DEAD-box helikaza, będąca pro-



Ryc. 3. Elementy zaangażowane w regulację biosyntezy białka szoku zimna CspA *E. coli*. Biosynteza białek szoku zimna podlega wielopoziomowej regulacji: sekwencja DB pozwala na tworzenie kompleksu inicjacji translacji w niskiej temperaturze bez udziału czynników rybosomalnych, nieaktywnych w fazie aklimatyzacji. Długi nickodujący region 5'-UTR decyduje o stabilności mRNA *cspA*, ponadto zawiera unikatową sekwencję „cold-box”, charakterystyczną dla genów białek szoku zimna, biorącą udział w autoregulacji ekspresji biosyntezy CspA [6].

dłużoną syntezę nie tylko CspA, ale także CspB i G, a dodatkowo prowadziło do wydłużenia fazy aklimatyzacji. Wycięcie insercji niwelowało ten efekt. Fakty te potwierdzają, że zarówno CspA, jak i 5'-UTR mają istotny wpływ na regulację ekspresji genów białek szoku zimna w trakcie fazy aklimatyzacji [50, 51].

Doświadczenia z mutantami *E. coli* pozbawionymi fragmentu 5'-UTR w genie *cspA* wykazały, że ta sekwencja wywiera znaczący wpływ na wysoką stabilność własnego mRNA w niskich temperaturach (okres półtrwania mRNA CspA w 15°C dochodzi do 20 minut), a jednocześnie jest odpowiedzialna za zwiększenie jego labilności w 37°C (okres półtrwania — 12s). Pomimo zatem, że promotor *cspA* jest w 37°C aktywny, bardzo trudno go wykryć na poziomie transkrypcji [27, 31, 40, 47]; jest to możliwe tylko na początku eksponencjalnej fazy wzrostu (por. rozdział III-1). Wykazano ponadto, że substytucja trzech spośród 159 zasad w obszarze 5'-UTR prowadzi do ok. 150-krotnego wzrostu stabilności mRNA

duktem ekspresji wspomnianego już genu *cspA*, zaliczana do najważniejszych białek szoku zimna. Likwiduje ona wydłużone wtórne struktury typu „stem loop” powstające w 5'-UTR w niskich temperaturach, chroniąc tym samym cząsteczki mRNA przed atakiem RNA-zy III, rozszerzającej dsRNA.

Regulacja ekspresji białek szoku zimna na poziomie translacji odbywa się przede wszystkim z udziałem wspomnianej już sekwencji DB, leżącej w obszarze kodującym mRNA CspA i kilku innych Csp *E. coli*. Sekwencja ta jest wystarczająca — dzięki zdolności wiązania się z jedną z drugorzędowych struktur w 16S rRNA — do utworzenia kompleksu inicjacji translacji w nieobecności czynników RbfA, CsdA oraz IF2 [6, 53], co jest istotne zwłaszcza w fazie aklimatyzacji, w której są syntetyzowane wyłącznie Csp klasy pierwszej [31, 54]. Wszystkie pozostałe białka, konieczne do normalnego funkcjonowania komórki, których mRNA nie są wyposażone w DB, w tym także Csp klasy II, mogą być produkowane dopiero po zsyntetyzowaniu wymienionych

trzech białek — czynników inicjujących translację w warunkach szoku zimna.

W inicjacji translacji w warunkach szoku zimna kolejną trudność stanowi odszukanie przez kompleks preinicjacyjny sekwencji Shine-Dalgarno, występującej u *Prokaryota* powyżej kodonu inicjacji i uczestniczącej w wiązaniu małej podjednostki rybosomalnej, a następnie kodonu inicjacji AUG. Dla przezwyciężenia tej trudności zasadnicze znaczenie mają chaperonowe właściwości CspA i innych białek szoku zimna I klasy. Jak już wspomniano, pod wpływem szoku zimna w mRNA tworzą się struktury wtórne typu szpilki do włosów i „steam loop”, utrudniające, bądź wręcz uniemożliwiające odszukanie miejsca inicjacji oraz przesuwanie się białek o aktywności egzorybonukleaz. Zakłada się, że CspA zsyntetyzowane w fazie aklimatyzacji, a także nie-liczne cząsteczki tego białka funkcjonujące w *E. coli* już wcześniej, w warunkach normalnych, w 37°C, wiążą się z własnym i innymi świeżo powstałymi mRNA (pod tym względem nie są zbyt specyficzne, preferują jedynie odcinki bogate w pirymidyny), linearyzując ich cząsteczki, zwłaszcza w obszarze liderowej sekwencji 5'-UTR. Ta linearyzacja jest generalnie niezbędną dla translacji mRNA u *Prokaryota*. O tym, że białka szoku zimna są zaangażowane w inicjację translacji świadczy na przykład fakt, że *in vitro* CspA podwyższa efektywność translacji własnego mRNA [55].

CspA i inne białka szoku zimna przeciwdziałają także powstawaniu oddziaływań wodorowych w RNA, co zapobiega rozprzężeniu transkrypcji i translacji. Zatem synteza Csp stanowi w pewnym sensie kompensację wyższej stabilności II-rzędowych struktur RNA po szoku zimna. Białka te uznaje się nawet za translacyjne aktywatory genów w niskich temperaturach.

IV. Białka szoku zimna innych bakterii

Od czasu zidentyfikowania w 1987 roku pierwszego białka szoku zimna (CspA *E. coli*) i udowodnienia, że jest ono produktem genu, którego ekspresja jest stymulowana obniżeniem temperatury [4], obecność białek Csp stwierdzono u ponad pięćdziesięciu różnych gatunków Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii, włączając gatunki psychro-, mezo- i termofilne [8]. Należy nadmienić, że, jak dotąd, białka te znaleziono u wszystkich poddanych badaniom szczepów z wyjątkiem *Helicobacter pylori* i *Mycoplasma genitalium* [56], co oznacza, że istnieją szczepy nie produkujące Csp; jest to istotna

różnica w porównaniu z białkami szoku ciepła, występującymi u wszystkich mikroorganizmów [11].

IV-1. Csp bakterii mezofilnych

Poza *E. coli*, wnikliwym badaniom pod kątem odpowiedzi na stres zimna, poddano również bakterie *B. subtilis*, u których w wyniku obniżenia temperatury hodowli z 37°C do 15°C następuje indukcja biosyntezy 37 białek, pełniących rozmaite funkcje w różnych procesach fizjologicznych: w translacji — białka rybosomalne S6 i L7/L12, w fałdowaniu białek — izomeraza peptydyloprolilowa, w przyswajaniu cukrów — Hpr, w regulacji innych procesów metabolicznych — syntaza cysteiny, reduktioizomeraza ketokwasów, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego oraz izomeraza triozyfosforanowa [57].

Podobnie jak u *E. coli*, w komórkach *B. subtilis* stwierdzono występowanie białek podobnych do reprezentantów rodziny CspA. Spośród nich trzy homologiczne białka, CspB, C i D, mają istotny wpływ nie tylko na zdolność adaptacji tych bakterii do niskich temperatur, ale zapewniają też efektywny wzrost *B. subtilis* w temperaturze optymalnej oraz wysoką przeżywalność podczas fazy stacjonarnej. Potrójna delecja genów tych trzech białek jest letalna, a minimalna zawartość chociażby jednego z nich — niezbędna do wzrostu komórek *B. subtilis* [58].

Najważniejszym białkiem szoku zimna *B. subtilis* jest CspB. Białko to ulega słabej ekspresji w temperaturze optymalnej dla wzrostu, natomiast po zmianie temperatury z 37°C do 10°C następuje ok. 7-krotna indukcja transkrypcji jego genu. CspB jest kwaśnym białkiem składającym się z 67 aminokwasów, wykazującym 61% homologii z CspA *E. coli*. Podobnie sekwencja nukleotydów w genie *cspB* jest w 60% identyczna z *cspA E. coli*, co potwierdza wysoką konserwatywność białek szoku zimna na poziomie sekwencji DNA i aminokwasów [59, 60]. Badania struktury CspB *B. subtilis* wykazały, że białko to zbudowane jest z pięciu uformowanych w β -beczułkę fragmentów o konformacji przeciwrównoległej, z umieszczonymi na zewnątrz resztami aromatycznymi (por. Ryc. 1). Analogicznie do CspA *E. coli* sąsiadujące fragmenty β_2 i β_3 zawierają konserwatywne miejsca RNP1 i RNP2 wiążące ssRNA/DNA [61-63]. CspB *B. subtilis*, przeciwnie jednak niż jego odpowiednik z *E. coli* tworzy w roztworach wodnych w nieobecności jonów fosforanowych dimery.

Interesujące badania kinetyczno-termodynamiczne rozfałdowywania i fałdowania CspB przeprowa-

dzili S c h i n d l e r i in. [64]. Wykazali, że przejście między stanem rozfałdowanym i natywnym tego białka jest *in vitro* ekstremalnie szybkie i ok. 90% jego rozfałdowanych w 0,6M roztworze mocznika cząsteczek wraca do stanu natywnego już w czasie 1,5 ms. Autorzy Ci uważają, że jest to także możliwe *in vivo*, m. in. dlatego, że to małe białko, podobnie jak wszystkie homologiczne z CspA *E. coli* białka szoku zimna, nie zawiera mostków disiarczkowych, których tworzenie jest elementem ograniczającym szybkość fałdowania. Ponadto w CspB nie występują wiązania peptydowe *cis*-prolilowe, konieczność izomeryzacji których również w znacznym stopniu spowalnia proces jego fałdowania. Nawet w obszarze tranzycji, w którym zwijanie się wszystkich białek jest najwolniejsze, równowaga reakcji przejścia ze stanu natywnego do rozfałdowanego, NU (ang. *native — unfolded*) jest w przypadku CspB osiągnięta w ciągu zaledwie 100 ms (dla wielu białek jest liczona nawet w godzinach). S c h i n d l e r i in. [64] uważają, że proces zwijania się tego białka *in vivo* (podobnie jak to stwierdzono dla BPTI), nie obejmuje tworzenia się lokalnie zwiniętych intermedatów, powstających podczas fałdowania się większości białek, dlatego też może być ultraszybki. Ponadto, CspB tak jak inne białka CspA-podobne nie podlega potranslacyjnym modyfikacjom. A zatem, po wystąpieniu szoku zimna, bezzwłocznej i wzmożonej syntezy łańcuchów tych białek towarzyszy niezwykle szybki proces przyjmowania przez nie natywnej konformacji, co uruchamia całą kaskadę molekularnej adaptacji, warunkującej przeżycie i normalne funkcjonowanie komórki w niskiej temperaturze. Co prawda szybko zwijające się białka nie mają kinetycznej ochrony zapobiegającej rozfałdowywaniu się cząsteczek i np. CspB w nieobecności mocznika rozwija się w tempie 10 s^{-1} , jednakże może to być bardzo korzystne dla regulatorowej funkcji tego typu białek, bowiem umiarkowaną ich stabilność, w połączeniu ze zdolnością do szybkiego fałdowania, można rozpatrywać jako idealny mechanizm szybkiej i wydajnej kontroli efektywnego wewnątrzkomórkowego stężenia CspA-podobnych białek szoku zimna. Należy tu jednak wspomnieć, że *in vitro* stabilność Csp, np. odporność na proteolizę znacznie wzrasta po ich skompleksowaniu z kwasami nukleinowymi, można więc przypuszczać, że również *in vivo* tworzenie takich kompleksów istotnie przedłuża funkcjonowanie białek szoku zimna.

Podobnie jak w przypadku mRNA białek szoku zimna *E. coli*, również mRNA Csp *B. subtilis* zawierają region 5'-UTR, który prawdopodobnie bierze udział w autoregulacji transkrypcji tych białek. Csp

B. subtilis działają też najprawdopodobniej jako chaperony RNA/DNA i regulują nawzajem swoją biosyntezę. Istnieje ponadto hipoteza, że mogą funkcjonować jako krioprotektanty, ponieważ w znaczny sposób wpływają na tolerancję komórek tych bakterii na zimno (mutanty *B. subtilis* pozbawione *cspB*, po zamrożeniu w -80°C wykazują o wiele niższą przeżywalność niż komórki dzikich szczepów) [57, 58].

Białka szoku zimna innych taksonów mezofilnych są zbadane fragmentarycznie. U *Lactobacillus lactis* stwierdzono obecność trzech homologicznych z *cspA E. coli* genów, z których jeden, *cspB*, ulega znacznej indukcji przy obniżeniu temperatury z 30°C do 15°C . Produkt tego genu, białko CspB, jest zbudowane z 66 aminokwasów i wykazuje 60% identyczności z CspA *E. coli* [65]. Podobnie jak u *E. coli* i *B. subtilis*, szok zimna zwiększa znacznie odporność *L. lactis* na późniejsze zamrażanie, co w przypadku bakterii mlekowych ma szczególne znaczenie ze względów technologicznych (możliwość zamrażania jogurtów i innych mlecznych napojów fermentowanych) [66, 67].

U *Salmonella typhimurium* obniżenie temperatury powoduje inicjację biosyntezy białka szoku zimna CspB, homologicznego do CspA *E. coli*. Podobnie jak w przypadku *E. coli*, mRNA tego białka jest bardzo labilne w temperaturach bliskich optymalnej temperaturze wzrostu, natomiast jego stabilność znacznie wzrasta w 10°C , co może znaczyć, że regulacja ekspresji tego białka następuje na poziomie stabilności mRNA [68].

Haemophilus influenzae ma tylko jeden gen *cspD*, którego wzmożona ekspresja następuje w warunkach szoku zimna. Gen ten wykazuje wysoki stopień homologii z *cspA E. coli* [8].

IV-2. Csp bakterii zimnolubnych

Badania białek szoku zimna u bakterii psychrofilnych i psychrotrofowych są szczególnie interesujące. Porównanie ekspresji genów tych białek u organizmów mezo- i psychrofilnych nie tylko w warunkach szoku zimna i pod kątem adaptacji do niskich temperatur, ale także w normalnych warunkach wzrostu, powinno dostarczyć wielu informacji dotyczących ich funkcji. Jest oczywiste, że wyniki tych badań rozszerzą ogólną wiedzę o przystosowaniach organizmów zimnolubnych do życia w środowiskach o niskich temperaturach.

W białkach szoku zimna wykrytych u zimnolubnych bakterii wyróżnia się dwa główne rodzaje: typowe Csp, których wzmożona biosynteza następuje

natychmiast po obniżeniu temperatury i które są syntetyzowane krótkotrwale, oraz białka aklimatyzacji do zimna Cap, które wolniej ulegają indukcji, ale ich biosynteza zachodzi nadal nawet po kilku godzinach od momentu obniżenia temperatury [69, 70].

W wyniku zmiany temperatury wzrostu psychrotrofowego szczepu *Pseudomonas fragi* z 30 lub 20 na 5°C obserwowano indukcję biosyntezy, odpowiednio, 25 bądź 17 białek, które w toku badań kinetycznych zostały zakwalifikowane do dwóch wspomnianych już grup: Csp lub Cap [71]. Spośród nich cztery niewielkie białka — CapA i B oraz TapA i B (ang. *temperature adaptation proteins* — ich nadprodukcja następuje zarówno w wyniku szoku zimna, jak i szoku ciepła) — są homologiczne do CspA *E. coli* i najprawdopodobniej odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi i adaptacji *P. fragi* do zmian temperatury środowiska [72].

Indukowane obniżeniem temperatury białka psychrotrofowych bakterii *Arthrobacter globiformis* zostały sklasyfikowane w czterech różniących się fizjologicznie grupach. Do grupy I zaliczono typowe białka szoku zimna Csp, których nadprodukcję obserwuje się tylko wówczas, gdy szok powoduje dużą różnicę temperatur; grupa II obejmuje te białka szoku zimna, które wykazują najwyższą ekspresję po poddaniu komórek łagodnemu szokowi, natomiast grupa III — to białka syntetyzowane zawsze po obniżeniu temperatury, przy czym różnica temperatur nie ma tu znaczenia. Do tej ostatniej grupy należą np. białka obecne przy wzroście komórek w 4°C. Białka grupy III uważane są za tzw. wczesne białka aklimatyzacji do zimna (ang. *early cold acclimation proteins*). I wreszcie do grupy IV zaliczono białka, których wysokie stężenie obserwuje się w warunkach przedłużającego się szoku — nazywa się je późnymi Cap [73]. Badania odpowiedzi *A. globiformis* na szok zimna wykazały, że ten drobnoustrój produkuje homologiczne do CspA *E. coli* białko CapA. Gwałtowna indukcja jego biosyntezy zaczyna się natychmiast po nastąpieniu szoku zimna, natomiast w przeciwieństwie do CspA-podobnych odpowiedników pochodzących z mikroorganizmów mezofilnych, CapA jest syntetyzowane w sposób ciągły podczas dalszego wzrostu bakterii w warunkach obniżonej temperatury. Synteza tego białka jest regulowana na poziomie translacji, a wydajny wzrost bakterii w niskich temperaturach zawsze wymaga ekspresji *capA*. Białko to najprawdopodobniej odgrywa istotną rolę w procesie aklimatyzacji do niskich temperatur, co także jest związane z utrzymaniem aktywności maszynerii translacyjnej po nastąpieniu

szoku zimna, ale wg Berger i in. [74] może odbywać się w odmienny sposób niż u mezofili.

U psychrotrofowego szczepu bakterii *Bacillus cereus* stwierdzono obecność 6 małych białek, o masie ok. 7,5 kDa, homologicznych do CspA *E. coli*, przy czym biosynteza tylko jednego z nich (CspA) jest indukowana szokiem zimna, choć podobnie jak w przypadku innych mikroorganizmów zimnolubnych, niezmienną wysoką ekspresję genu *cspA* *B. cereus* obserwuje się również podczas długiego wzrostu komórek w niskich temperaturach [75].

W przypadku psychrofilnych bakterii *Shewanella violacea*, wyizolowanych z głębin morskich, zostały sklonowane i scharakteryzowane dwa geny kodujące białka indukowane szokiem zimna. Geny *cspA* i *G* kodują 70-aminokwasowe białka wykazujące, odpowiednio, 62 i 67% identyczności ze swoimi odpowiednikami CspA i CspG *E. coli*. W obrębie tych genów stwierdzono obecność bogatego w zasady AT regionu przed miejscem promotorowym i podobnie jak w innych genach *csp*, długiego niekodującego obszaru 5'-UTR. Najprawdopodobniej CspA i G działają jako chaperony RNA, a ich mRNA ulega głównie potranskrypcyjnej regulacji. Mogą one również regulować ekspresję innych genów indukowanych szokiem zimna, podobnie jak w przypadku *E. coli* [76].

Z przytoczonych w tym rozdziale danych widać, że badania Csp drobnoustrojów psychrofilnych i psychrotrofowych są nieliczne i słabo zaawansowane. Jeszcze mniej wiadomo o białkach szoku zimna drobnoustrojów polarnych, w tym antarktycznych. Organizmy te w sposób ciągły są poddawane presji wyjątkowo niskich temperatur (w morskich wodach antarktycznych waha się ona od -2,2 do +4°C i średnio wynosi -1°C, na lądzie może spadać nawet do -50°C). W piśmiennictwie spotyka się tylko wzmianki, że takie białka te drobnoustroje syntetyzują. Nasze wstępne eksperymenty dotyczące Csp drobnoustrojów antarktycznych, (Kaufman i Turkiewicz, wyniki nieopublikowane) wskazują na znaczne różnice w profilach białek syntetyzowanych w temperaturach optymalnych dla ich wzrostu i w znacznie od nich niższych temperaturach optymalnych dla biosyntezy niektórych enzymów.

IV-3. Csp bakterii termofilnych

Białka Csp bakterii termofilnych są znacznie słabiej poznane niż Csp mezofili. Obecność białek homologicznych do Csp *B. subtilis*, których biosynteza indukowana jest szokiem zimna, stwierdzono między innymi u termofilnych bakterii *B. caldolyti-*

cus, których optymalna temperatura wzrostu wynosi 72°C oraz u hipertermofilnego gatunku *Thermotoga maritima*, który rośnie w temperaturach wyższych niż 90°C [77-79].

V. Białka szoku zimna drobnoustrojów eukariotycznych

Prowadzono liczne badania nad odpowiedzią na stres zimna u eukariontów. Dotyczyły one głównie roślin i bezkręgowców, ale opisane zostały również geny indukowane obniżeniem temperatury u ssaków.

Warto wspomnieć, że np. eukariotyczne białka rozpoznające sekwencję ATTGG, określane terminem *Y-box*, do których należą m.in. ludzkie białko YB-1, zawierają w swych cząsteczkach domenę szoku zimna o strukturze $(\beta)_5$ -beczułki, o rozmiarze zbliżonym do CspA *E. coli* i ponad 40% identyczności z tym białkiem [80, 81]. Obecność silnie konserwatywnej domeny *Y-box* we wspomnianych białkach skutkuje najprawdopodobniej nie tylko ich podobną strukturą, ale i wspólnymi funkcjami, bowiem, mimo że nie są one indukowane szokiem zimna, działają zwykle jako czynniki transkrypcyjne i maskujące RNA, i ogólnie ujmując biorą udział w regulacji procesów wzrostowych [82]. Jak już wspomniano (por. rozdz. III-1 i III-2) białka CspA, B i G *E. coli* są także odpowiedzialne za procesy wzrostowe w warunkach obniżonej temperatury, natomiast inne białka rodziny CspA regulują te procesy w innych warunkach stresowych [83]. Domenę szoku zimna znaleziono też u białek nie należących do rodziny *Y-box*, np. w ludzkim białku wiążącym RNA, Unr, wymaganym dla tzw. IRES (ang. *internal ribosomal entry site*) — zależnej translacji [5].

Obecność kilku białek, których biosynteza indukowana jest szokiem zimna stwierdzono u *Saccharomyces cerevisiae*. Jedno z nich, białko NSR, jest zaangażowane w procesy biogenezy rybosomów zarówno w normalnych warunkach wzrostu, jak i w obniżonej temperaturze. Delecja genu *nsr1* powoduje upośledzenie procesu tworzenia funkcjonalnych rybosomów i dojrzewania rRNA, czego skutkiem jest ograniczenie wzrostu komórek nawet w 37°C, jeszcze bardziej widoczne w niskich temperaturach. Dodatkowo w komórkach drożdży *S. cerevisiae* zidentyfikowano obecność rodziny trzech indukowanych zmianą temperatury białek (ang. *temperature inducible protein*) Tip1, Tir1 i Tir2, których wzmożoną biosyntezę obserwuje się w wyniku tak szoku zimna, jak i szoku ciepła [84-87], jednakże ich funkcja nie została dotąd precyzyjnie zdefiniowana. Białka te wykazują wysoką homologię, zawierają obszary bogate

w serynę i prawdopodobnie są zlokalizowane w ścianie komórkowej *S. cerevisiae*, gdzie zakotwiczą się w glikozylfosfatydyloinozitolu [87].

Także u pleśni *Dictyostelium discoideum* stwierdzono, że pod wpływem szoku zimna następuje indukcja syntezy białek membranowych i ubikwityny [88, 89], która do tej pory była zaliczana do uniwersalnie występujących białek szoku ciepła.

Pierwsze małe białko drobnoustrojów eukariotycznych w pełni homologiczne do rodziny bakteryjnych CspA-podobnych białek szoku zimna wykryto niedawno (2002 r.) u pleśni *Cladosporium herbarum*; nadano mu akronim Cla h8 [7].

VI. Podsumowanie

Zmiany temperatury są najprawdopodobniej najpowszechniejszym stresem środowiskowym, doświadczanym przez wszystkie żywe ustroje, od bakterii do ssaków. Organizmy wykształciły różnorodne adaptacje, od behawioralnych, poprzez anatomiczno-fizjologiczne, aż do biochemicznych, pozwalające im przeżyć w istotnie zmienionej temperaturze. W ostatnich dziesięcioleciach szczególnie intensywnie badane są adaptacje biochemiczne, mające na celu podtrzymanie metabolicznych regulacji i homeostazy oraz ochronę struktury i funkcji komórek przed skutkami stresu temperaturowego. Stosunkowo dużo wiemy już o molekularnych skutkach szoku ciepła, które są uniwersalne i obejmują przede wszystkim syntezę dobrze zdefiniowanych białek opiekuńczych, Hsp, mających za zadanie przywrócić prawidłowego zwinięcia zdenaturowanym przez wysoką temperaturę białkom. W przypadku szoku zimna, którego molekularne skutki są znacznie słabiej poznane, rozfałdowywanie się białek nie ma tak istotnego znaczenia, natomiast najgroźniejszym efektem tego stresu jest utrata płynności błon biologicznych i blokada maszyny translacyjnej, wynikająca z niemożności tworzenia się funkcjonalnych rybosomów. O ile ten pierwszy skutek stosunkowo łatwo komórce przetrwać poprzez syntezę lipidów o zmienionym składzie, to przywrócenie sprawności rybosomom jest trudniejsze i bardziej molekularnie skomplikowane, zwłaszcza, że komórkom przychodzi działać w środowisku ubogim energetycznie, w którym wszelkie procesy chemiczne zostają z oczywistych względów spowolnione.

Obecnie przeważa pogląd [5], że bezpośrednim skutkiem szoku zimna jest gwałtowny wzrost poziomu błędnego dekodowania informacji genetycznej i że akumulacja błędów translacyjnych stanowi swego rodzaju języczek spustowy wyzwalający złożoną od-

powieź na ten stres, w której pierwszym zdarzeniem jest prawdopodobnie indukcja swoistych białek, Csp. Wiadomo wszakże, że podobną reakcję (biosyntezę Csp) wywołują też antybiotyki hamujące translację [90], rodzi się zatem pytanie, czy indukcja białek szoku zimna nie stanowi bardziej ogólnej odpowiedzi na spadek wierności translacji. Nie można też wykluczyć udziału w procesie hamowania translacji jakiegoś termowrażliwego (-ych) czynnika (-ów?) blokującego rybosomy. Na taką możliwość wskazuje dawno stwierdzony fakt, że rybosomy izolowane z komórek *E. coli*, inkubowanych w niskich temperaturach, również *in vitro*, w 0°C, znacznie wolniej syntetyzują łańcuchy polipeptydowe, jednakże ich prawidłową funkcję można łatwo przywrócić, inkubując je krótko w 37°C [1].

Wszystkie te hipotezy wymagają doświadczalnej, bardzo skrupulatnej weryfikacji. Obecnie wiemy jedynie, że szok zimna powoduje u większości taksonów *Prokaryota* syntezę Csp, z których bodaj najważniejsze dla przeżycia komórki są małe CspA-podobne, ok. 7,5 kDa białka, najprawdopodobniej podlegające ultraszybkiemu zwijaniu się, wykazujące wysokie powinowactwo do ssRNA/DNA, z którego to faktu wysuwa się wnioski o ich opiekuńczej funkcji. Wiemy coraz więcej o osobliwościach sekwencyjnych genów tych białek, mających istotne znaczenie dla regulacji ich biosyntezy i przewyciężenia blokady translacji. Ustalono strukturę przestrzenną kilku z tych białek, jednakże wciąż jeszcze molekularne mechanizmy odblokowania translacji w dużej części pozostają niewyjaśnione. Studiuje się je w wielu laboratoriach nie tylko ze względów poznawczych, ale i przewidywanej aplikacji białek szoku zimna w krioprotekcji, bo również taką ich funkcję stwierdzono *in vivo* u wielu organizmów prokariotycznych, a także u roślin. Biorąc pod uwagę przyrost liczby publikacji poświęconych badaniom molekularnych mechanizmów działania Csp, można się spodziewać, że w najbliższych latach wiele z tych mechanizmów zostanie wyjaśnionych, również w odniesieniu do funkcji, jaką wydają się te białka pełnić w warunkach bezstresowych.

Podziękowania

Przygotowanie artykułu zostało dofinansowane z grantu KBN 3 PO4B 026 22 oraz z grantu Rektora Politechniki Łódzkiej I29/374/03/BW.

Artykuł otrzymano 4 września 2003

Zaakceptowano do druku 4 marca 2003

Piśmiennictwo

1. Das HK, Goldstein A (1968) *J Mol Biol* 31:209-226
2. Friedman H, Lu P, Rich A (1969) *Nature* 233:909-913
3. Friedman H, Lu P, Rich A (1971) *J Mol Biol* 61:105-121
4. Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC (1987) *J Bacteriol* 169:2092-2095
5. Ermolenko DN, Makhatadze GI (2002) *CMLS* 59:1902-1913
6. Thieringer HA, Jones PG, Inouye M (1998) *Bioessays* 20:49-57
7. Falsone SF, Weichel M, Cramer R, Breitenbach M, Kungl AJ (2002) *J Biol Chem* 277:16512-16516
8. Grauman PL, Marahiel MA (1998) *Trends Biochem Sci* 23:286-290
9. Craig EA (1985) *CRC Crit Rev Biochem* 18:239-280
10. Lindquist S, Craig EA (1988) *Annu Rev Genet* 55:1151-1191
11. Skowyrza D, Żylicz M (1987) *Post Bioch* 33:259-276
12. Wojtkowiak D, Georgopoulos C, Żylicz M (1993) *J Biol Chem* 268:22600-22617
13. Liberek K (1995) *Post Bioch* 41:94-102
14. Laskowska E, Taylor A (1998) *Post Bioch* 44:334-344
15. Cavicchioli R, Thomas T, Curmi PMG (2000) *Extremophiles* 4:321-331
16. Turkiewicz M, Gromek E (2000) *Biotechnologia* 48:171-188
17. Sahamoto T, Murata N (2002) *Curr Microbiol* 5:206-210
18. Feller G, Gerday C (1997) *CMLS* 53:830-841
19. Turkiewicz M, Kur J, Białkowska A, Cieśliński H, Kalinowska H (2003) *Biomol Eng* 20:317-324
20. Pazgier M, Turkiewicz M, Kalinowska H, Bielecki S (2003) *J Mol Cat B: Enzymatic* 21:39-42
21. Turkiewicz M, Gromek E, Kalinowska H (1999) *J Biotechnol* 70:53-61
22. Denner E, Mark B, Busse HJ, Turkiewicz M, Lubitz W (2001) *Syst Appl Microbiol* 24:44-53
23. Turkiewicz M, Pazgier M, Kalinowska H, Bielecki S (2003) *Extremophiles* 7:435-442
24. Xu H, Griffith M, Patten CL, Glick BR (1988) *Can J Microbiol* 44:64-73
25. Turkiewicz M (1999) *Biotechnologia* 44:11-33
26. Olsen TM (1993) *Cryobiology* 30:322-328
27. Phadtare S, Alsina J, Inouye M (1999) *Curr Microbiol* 2:175-180
28. Yamanaka K, Fang L, Inouye M (1998) *Mol Microbiol* 27:247-255
29. Jiang W, Fang L, Inouye M (1997) *J Biol Chem* 272:196-202
30. Jones PG, Mitta M, Kim Y, Jiang W, Inouye M (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:76-80
31. Mitta M, Fang L, Inouye M (1997) *Mol Microbiol* 26:321-335
32. Jones PG, Inouye M (1996) *Mol Microbiol* 21:1207-1218
33. Friedman DI, Olson ER, Georgopoulos C, Tilly K, Herskowitz I, Banuett F (1984) *Microbiol Rev* 48:299-325
34. Donovan WP, Kusher SR (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:120-124
35. Walker GC (1984) *Microbiol Rev* 48:60-93
36. La Teana A, Brandi A, Falconi M, Spurio R, Pon CL, Gualerzi CO (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10907-10911
37. Sugino A, Peebles C, Kreuzer KN, Cozzarelli NR (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74:4767-4771
38. Kandror O, Goldberg AL (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4978-4981
39. Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:283-287
40. Bae W, Jones PG, Inouye M (1997) *J Bacteriol* 179:7081-7088
41. Schindelin H, Jiang W, Inouye M, Heinemann U (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5119-5123

42. Newkirk K, Feng W, Jiang W, Tejero R, Emerson SD, Inouye M, Montelione G (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:5114-5123
43. Jiang W, Hou Y, Inouye M (1997) *J Biol Chem* **272**:196-202
44. Lee SJ, Xie A, Jiang W, Etchegaray JP, Jones PG, Inouye M (1994) *Mol Microbiol* **11**:833-839
45. Nakashima K, Kanamaru K, Mizuno T, Horikoshi K (1996) *J Bacteriol* **178**:2994-2997
46. Brandi A, Spurio R, Galerzi CO, Pon CL (1999) *EMBO J* **18**:1653-1659
47. Yamanaka K, Mitta M, Inouye M (1999) *J Bacteriol* **181**:6284-6291
48. Vasina JA, Baneyx F (1996) *Appl Environ Microbiol* **62**:1444-1447
49. Brandi A, Pon CL, Gualerzi CO (1994) *Biochimie* **76**:1090-1098
50. Jiang W, Fang L, Inouye M (1996) *J Bacteriol* **178**:4919-4925
51. Fang L, Hou Y, Inouye M (1998) *J Bacteriol* **180**:90-95
52. Fang L, Jiang W, Bae W, Inouye M (1997) *Mol Microbiol* **23**:355-264
53. Sommerville J (1999) *Bioessays* **21**:319-325
54. Etchegaray J P, Jones PG, Inouye M (1999) *J Bacteriol* **181**:5852-5854
55. Brandi A, Pietroni P, Gualerzi CO, Pon CL (1996) *Mol Microbiol* **19**:231-240
56. Graumann P, Marahiel MA (1996) *Arch Microbiol* **166**:293-300
57. Graumann P, Schröder K, Schmid R, Marahiel MA (1996) *J Bacteriol* **178**:4611-4619
58. Graumann P, Wendrich TM, Weber MHW, Schröder K, Marahiel MA (1997) *Mol Microbiol* **25**:741-756
59. Willimsky G, Bang H, Fischer G, Marahiel MA (1992) *J Bacteriol* **174**:6326-6335
60. Schroder K, Zuber P, Willimsky G, Wagner B, Marahiel MA (1993) *Gene* **136**:277-280.
61. Schindelin H, Marahiel MA, Heinemann U (1993) *Nature* **364**:164-168
62. Schnuchel A, Wiltsccheck R, Czisch M, Herrler M, Willimsky G, Graumann P, Marahiel MA, Holak TA (1993) *Nature* **364**:169-171
63. Schindler T, Perl D, Grauman P, Sieber V, Marahiel MA, Schmid FX (1998) *Proteins* **30**:401-406
64. Schindler T, Herrler M, Marahiel MA, Schmid FX (1995) *Nature Structural Biol* **2**:663-673
65. Chartier MP, Schouler C, Lepeuple AS, Gripon JC, Chopin MC (1997) *J Bacteriol* **179**:5589-5593
66. Kim WS, Cum NW (1997) *Curr Microbiol* **35**:59-63
67. Kim BH, Bang Js, Lee, SY, Hong SK, Bang SH, Lee JS, Park VK (2001) *J Bacteriol* **183**:5580-5588
68. Craig JB, Boyle D, Francis KP, Gallagher MP (1998) *Microbiol* **144**:697-704
69. Whyte LG, Inniss WE (1992) *Can J Microbiol* **38**:1281-1285
70. Potier P, Drevet A, Gounot M, Hipkiss AR (1990) *J Gen Microbiol* **136**:283-291
71. Hebraud M, Dubois E, Potier P, Labadie J (1994) *J Bacteriol* **176**:4017-4024
72. Michel V, Lehoux J, Depret G, Anglade P, Labadie J, Hebraud M (1997) *J Bacteriol* **179**:7331-7342
73. Berger F, Morellet N, Menu F, Portier P (1996) *J Bacteriol* **178**:2999-3007
74. Berger F, Normand P, Portier P (1997) *J Bacteriol* **179**:5670-5676
75. Mayr B, Kaplan T, Lechnerand S, Scherer S (1996) *J Bacteriol* **178**:2916-2925
76. Fujii S, Nakasone K, Horikoshi K (1999) *FEMS* **178**:123-128
77. Perl D, Welker C, Schindler T, Schroder K, Marahiel MA, Jaenicke R, Schmid FX (1998) *Nat Struct Biol* **5**:229-235
78. Frankenberg N, Welker C, Jaenicke R (1999) *FEBS* **454**:299-302
79. Wassenberg D, Welker C, Jaenicke R (1999) *J Mol Biol* **289**:187-193
80. Wolffe AP (1994) *Bioessays* **16**:245-250
81. Wistow G (1990) *Nature* **344**:823-824
82. Ladomery M, Sommerville J (1995) *Bioessays* **17**:9-11
83. Bouvet P, Motsumoto K, Wolffe AP (1995) *J Biol Chem* **270**:28297-28303
84. Kondo K, Inouye M (1991) *J Biol Chem* **266**:17537-17544
85. Kondo K, Kowalski L, Inouye M (1992) *J Biol Chem* **267**:16259-16265
86. Kondo K, Inouye M (1992) *J Biol Chem* **267**:16252-16258
87. Kowalski LRZ, Kondo K, Inouye M (1995) *Mol Microbiol* **15**:341-353
88. Maniak M, Nellen W (1988) *Mol Cell Biol* **8**:153-159
89. Muller-Taubenberger A, Haggman J, Noegge A, Gerish G (1988) *J Cell Sci* **90**:51-58
90. VanBogelen RA, Neidhardt FC (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:49-57

Choroby mitochondrialne wywołane zaburzeniami w komunikacji między genomem jądrowym i organellarnym

Mitochondrial disorders caused by defects of intergenomic communication

ALICJA TRĘBIŃSKA¹, PAWEŁ GOLIK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Charakterystyka chorób związanych z zaburzeniami w komunikacji między genomami
 - II-1. Choroby związane z wielokrotnymi delecjami mtDNA
 - II-2. Choroby związane z wielokrotnymi delecjami i deplecją mtDNA
 - II-3. Choroby związane z deplecją mtDNA
- III. Mitochondrialny DNA
 - III-1. Substraty dla replikacji mtDNA
 - III-2. Replikacja mtDNA
- IV. Molekularne podstawy zaburzeń w komunikacji między genomami
 - IV-1. Zaburzenia syntezy i homeostazy puli nukleotydów
 - IV-1.1. Fosforylaza tymidyny — enzym cytoplazmatyczny
 - IV-1.2. Kinaza deoksyguanozyny — mitochondrialny enzym szlaku rezerwowego
 - IV-1.3. Mitochondrialna kinaza tymidyny — enzym szlaku rezerwowego
 - IV-2. Zaburzenia transportu nukleotydów do mitochondriów — translokator nukleotydów adeninowych 1
 - IV-3. Replikacja mtDNA i regulacja wewnątrzmitochondrialnej puli nukleotydów — Twinkle
 - IV-4. Zaburzenia w replikacji mtDNA — polimeraza γ
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ad — postać autosomalna dominująca; ANT — translokator nukleotydów adeninowych; ar — postać autosomalna recesywna; COX — oksydaza cytochromowa; dAdo — deoksyadenozyna; dCK — kinaza deoksycytydyny; dCyt — deoksycytydina; dGK — kinaza deoksyguanozyny; dGuo — deoksyguanozyna; dN — deoksyrybonukleozydy; dThd — deoksytymidyna; MNGIE — mitochondrialna nerwo-żołądkowo-jelitowa encefalomiopatia; mtDNA — mito-

Contents:

- I. Introduction
- II. Mitochondrial diseases caused by defects of intergenomic communication
 - II-1. Disorders with multiple mtDNA deletions
 - II-2. Disorders with multiple deletions and depletion of mtDNA
 - II-3. Disorders with mtDNA depletion
- III. Mitochondrial DNA
 - III-1. Substrates for mtDNA replication
 - III-2. mtDNA replication
- IV. Molecular basis of defects of intergenomic communication
 - IV-1. Altered synthesis and homeostasis of nucleotide pool
 - IV-1.1. Thymidine phosphorylase — a cytoplasmic enzyme
 - IV-1.2. Deoxyguanosine kinase — a mitochondrial salvage pathway enzyme
 - IV-1.3. Mitochondrial thymidine kinase — a salvage pathway enzyme
 - IV-2. Altered nucleotide transport into mitochondria — adenine nucleotide translocator 1
 - IV-3. Altered mtDNA replication and intramitochondrial nucleotide pool homeostasis — Twinkle
 - IV-4. Impaired mtDNA replication — polymerase γ
- V. Conclusion

chondrialny DNA; PEO — postępująca zewnętrzna oftalmoplegia; POLG — polimeraza γ ; PRPP — 5-fosforybozylo-1-pirofosforan; TK — kinaza tymidyny; TP — fosforylaza tymidyny; UP — fosforylaza urydyny

I. Wstęp

Po raz pierwszy informacje na temat udziału mitochondriów w patogenezie chorób człowieka uzyskano w 1988, kiedy to Holt i współpracownicy wykazali obecność rozległych delecji w mitochondrialnym DNA u pacjentów z miopatią mitochondrialną [1]. W tym samym roku grupa Wallace'a stwier-

¹Studentka, ²dr, Zakład Genetyki, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, pgoлик@poczta.ibb.waw.pl, alicja@poczta.ibb.waw.pl

dziła występowanie mutacji punktowych w genie kodującym czwartą podjednostkę kompleksu I (dehydrogenaza NADH) mitochondrialnego łańcucha oddechowego u rodziny z dziedziczną neuropatią nerwu wzrokowego (zespół Lebera) [2]. Od tego czasu w niewielkiej, kolistej cząsteczce (16 568 bp) mitochondrialnego DNA zidentyfikowano ponad 100 mutacji punktowych oraz wiele rearanżacji (delecje, duplikacje) związanych z szeregiem jednostek chorobowych [2]. Unikalną cechą chorób uwarunkowanych mutacjami w mitochondrialnym DNA jest to, że charakteryzują się one dziedziczeniem matczynym. Mitochondria pochodzące z plemnika są znakowane ubikwityną i w konsekwencji degradowane w proteasomach już w czasie pierwszych podziałów zygoty. Dlatego jedynie mtDNA obecny w komórce jajowej jest przekazywany potomstwu [3].

Mitochondrialny DNA koduje 13 białek wchodzących w skład czterech kompleksów łańcucha oddechowego: I — dehydrogenazy NADH, III — reduktazy cytochromowej, IV — oksydazy cytochromowej i V — syntazy ATP. W genomie organellarnym zapisana jest również informacja na temat wszystkich cząsteczek RNA niezbędnych do działania mitochondrialnego aparatu syntezy białek [4]. Mutacje w DNA mitochondrialnym mogą więc powodować bezpośrednio nieprawidłowości w budowie polipeptydów lub też zaburzać syntezę białek wewnątrz mitochondriów, jeśli dotyczą genów tRNA i rRNA [2]. W obu przypadkach upośledzona zostaje podstawowa funkcja organelli, jaką jest fosforylacja oksydacyjna i synteza ATP. Ponieważ ATP jest uniwersalnym nośnikiem energii w organizmie człowieka, uszkodzenia łańcucha oddechowego potencjalnie mogą zaburzać funkcjonowanie wszystkich tkanek w organizmie. Jednak na ogół najbardziej dotknięte są narządy charakteryzujące się wysokim poziomem metabolizmu tlenowego: układ nerwowy, mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, nerki, wątroba [5].

Mutacje w organellarnym DNA nie wyczerpują molekularnych źródeł patogenezy chorób mitochondrialnych. Mitochondria to struktury semiautonomiczne. Oznacza to, że informacje zakodowane w mitochondrialnym DNA nie wystarczają do biogenezy i prawidłowego funkcjonowania tych organelli. Dopiero współpraca między dwoma genomami: jądrowym i mitochondrialnym pozwala na niezakłócone działanie mitochondriów. Szacuje się, że w genomie jądrowym znajduje się ponad tysiąc genów kodujących białka strukturalne i funkcjonalne mitochondriów [6]. Uszkodzenia tych genów są kolejnym, obok pierwotnych defektów mitochondrialnego DNA, czynnikiem patogenezy chorób mito-

chondrialnych. Schorzenia związane z mutacjami genów jądrowych charakteryzują się klasycznym mendlowskim typem dziedziczenia. Dotychczas uzyskane na poziomie molekularnym informacje pozwalają podzielić dziedziczone mendlowsko choroby mitochondrialne na cztery grupy. Pierwsza z nich obejmuje defekty kodowanych jądrowo białek będących strukturalnymi komponentami łańcucha oddechowego. Dwie kolejne są związane z mutacjami w genach czynników zaangażowanych w prawidłowe składanie kompleksów łańcucha transportu elektronów i w proces biogenezy mitochondriów. Czwarta grupa zawiera schorzenia spowodowane przez zaburzenia stabilności mitochondrialnego DNA [7].

Ten ostatni typ jest określanym mianem zaburzeń w komunikacji między genomami. Wszystkie czynniki niezbędne do replikacji i regulacji liczby kopii ludzkiego mitochondrialnego DNA są kodowane jądrowo. Dlatego mutacje w genach jądrowych mogą powodować powstawanie wtórnych, somatycznych nieprawidłowości w genomie organellarnym. Są to zaburzenia o charakterze jakościowym — wielokrotne delecje (ang. *multiple deletions*) powodujące utratę fragmentów mtDNA o różnej długości. Obserwowane są również nieprawidłowości o charakterze ilościowym charakteryzujące się spadkiem liczby kopii mtDNA (ang. *mtDNA depletion*) [8]. Dotychczas stwierdzono, że zaburzenia w komunikacji między genomami są związane z mutacjami w genach białek bezpośrednio zaangażowanych w replikację mtDNA, jak również takich, które warunkują odpowiednie stężenie deoksyrybonukleotydów — substratów do budowy DNA — w mitochondriach. Do pierwszej grupy należy jedyna DNA-zależna mitochondrialna polimeraza DNA, czyli polimeraza γ (POLG) i przypuszczalnie Twinkle — prawdopodobna helikaza mitochondrialna. Grupa druga obejmuje fosforylazę tymidyny (TP) — białko cytoplazmatyczne, izoformę I translokatora nukleotydów adeninowych (ANT1) — białko znajdujące się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz zlokalizowane w macierzy mitochondrialnej kinazę deoksyguanozyny (dGK) i kinazę tymidyny (TK2) [9].

II. Charakterystyka chorób związanych z zaburzeniami w komunikacji między genomami

Choroby mitochondrialne związane z zaburzeniami w komunikacji między genomami charakteryzują się klasycznym dziedziczeniem mendlowskim ze względu na to, że pierwotne uszkodzenia występują

w genach jądrowych. Natomiast obraz kliniczny przypomina schorzenia powodowane przez mutacje w mtDNA, gdyż objawy chorobowe są wynikiem pojawiania się w rozwoju osobniczym wtórnych, somatycznych nieprawidłowości mtDNA [10].

II-1. Choroby związane z wielokrotnymi delecjami mtDNA

Najczęściej opisywaną jednostką chorobową związaną z wielokrotnymi delecjami mtDNA jest postępująca zewnętrzna oftalmoplegia (ang. *progressive external ophthalmoplegia*, PEO). Może ona występować w formie dominującej (adPEO) lub recesywnej (arPEO).

Charakterystycznymi objawami adPEO z wielokrotnymi delecjami mtDNA jest porażenie mięśni zewnętrznych gałki ocznej (oftalmoplegia), opadanie powiek oraz ogólne osłabienie mięśni i brak tolerancji na wysiłek fizyczny. Podstawowe objawy dotyczą mięśni poprzecznie prążkowanych. Obraz kliniczny choroby może być jednak bardzo zróżnicowany. Dodatkowe objawy, które można zaobserwować u poszczególnych pacjentów, to ciężka depresja, neuropatia obwodowa, drgawki, ataksja, katarakta, kardiomiopatia, rozpad mięśni prążkowanych (rabdomioliza), niedoczynność gonad, a także utrudnione połykanie, zaburzenia mowy i słuchu [8, 10, 12]. Mięśnie szkieletowe pacjentów wykazują obecność powiększonych, nadmiernie proliferujących mitochondriów oraz czerwonych poszarpanych włókien (ang. *red ragged fibers*) charakterystycznych dla stanu dysfunkcji mitochondrialnej [13]. Obserwuje się także zredukowanie aktywności enzymów łańcucha oddechowego [12]. Wielokrotne delecje mtDNA występują w komórkach mięśni szkieletowych, w mięśniu sercowym i w mózgu. Natomiast nie stwierdza się ich w komórkach aktywnych mitotycznie, między innymi w leukocytach, co uniemożliwia diagnozowanie na podstawie analizy DNA z tych komórek [10].

W arPEO fenotyp jest jeszcze bardziej zróżnicowany, a przebieg choroby może być cięższy. Obserwuje się zaburzenia ogólnoustrojowe, jednak objawy dotyczą głównie mięśni szkieletowych, a zwłaszcza mięśni poruszających gałkę oczną (podobnie jak w przypadku adPEO) [8].

II-2. Choroby związane z wielokrotnymi delecjami i deplecją mtDNA

Mitochondrialna nerwowo-żołądkowo-jelitowa encefalomiopatia (ang. *mitochondrial neurogastro-*

intestinal encephalomyopathy, MNGIE) jest recesywną chorobą związaną zarówno z deplecją, czyli spadkiem liczby kopii, jak i z wielokrotnymi delecjami mtDNA. Objawy MNGIE mogą pojawić się w różnym wieku: od 5 miesiąca do 43 roku życia [10]. Charakterystyczne dla obrazu klinicznego MNGIE są: postępująca zewnętrzna oftalmoplegia, zaburzenia pracy żołądka i jelit przejawiające się biegunką lub pseudoobstrukcją, neuropatia obwodowa, leukoencefalopatia i ogólne wyniszczenie organizmu. W niektórych przypadkach typowe dla MNGIE objawy ze strony przewodu pokarmowego mogą nie występować [14]. Biopsje z mięśni szkieletowych pacjentów ujawniają obecność czerwonych poszarpanych włókien i nieprawidłowych strukturalnie mitochondriów. Badania biochemiczne wykazują niedobory aktywności białek łańcucha oddechowego, zwłaszcza oksydazy cytochromowej we włóknach mięśniowych (ang. *COX deficient fibers*). W układzie pokarmowym obserwowane są zarówno patologiczne zmiany w mięśniach gładkich budujących ściany jelit, jak i w unerwieniu [8, 10, 15]. Wielokrotne delecje i/lub deplecja mtDNA występują w komórkach mięśni szkieletowych [16].

II-3. Choroby związane z deplecją mtDNA

Delecje mtDNA występują w zróżnicowanych fenotypowo schorzeniach o charakterze recesywnym. Są to na ogół bardzo ciężkie choroby. Często kończą się śmiercią już w pierwszym roku życia [17]. Rodzaj objawów zależy od tkanki, w obrębie której dochodzi do deplecji mtDNA. Dotknięte chorobą tkanki wykazują utratę mtDNA nawet do 2% przeciętnej wartości, podczas gdy w pozostałych komórkach organizmu poziom mtDNA nie ulega zmianie [18].

Postać wątrobowo-mózgowa zespołu deplecyjnego charakteryzuje się bardzo wczesnym wystąpieniem niewydolności wątroby, zaburzeniami neurologicznymi, a także hipoglikemią i kwasicą mleczanową. Tkanki i narządy dotknięte chorobą wykazują obniżoną aktywność kodowanych mitochondrialnie kompleksów łańcucha oddechowego [17].

Odmianą formą zespołu deplecyjnego jest postać mięśniowa tego zaburzenia. Objawia się ona ciężką, wyniszczającą miopatią rozwijającą się najczęściej między 6 a 36 miesiącem życia i powodującą w konsekwencji utratę zdolności ruchu. U pojedynczych pacjentów zaobserwowano też nieprawidłowości ze strony układu nerwowego. Dotknięte chorobą tkanki wykazują spadek aktywności enzymatycznej kompleksu I, III, IV i V łańcucha oddechowego [18, 19].

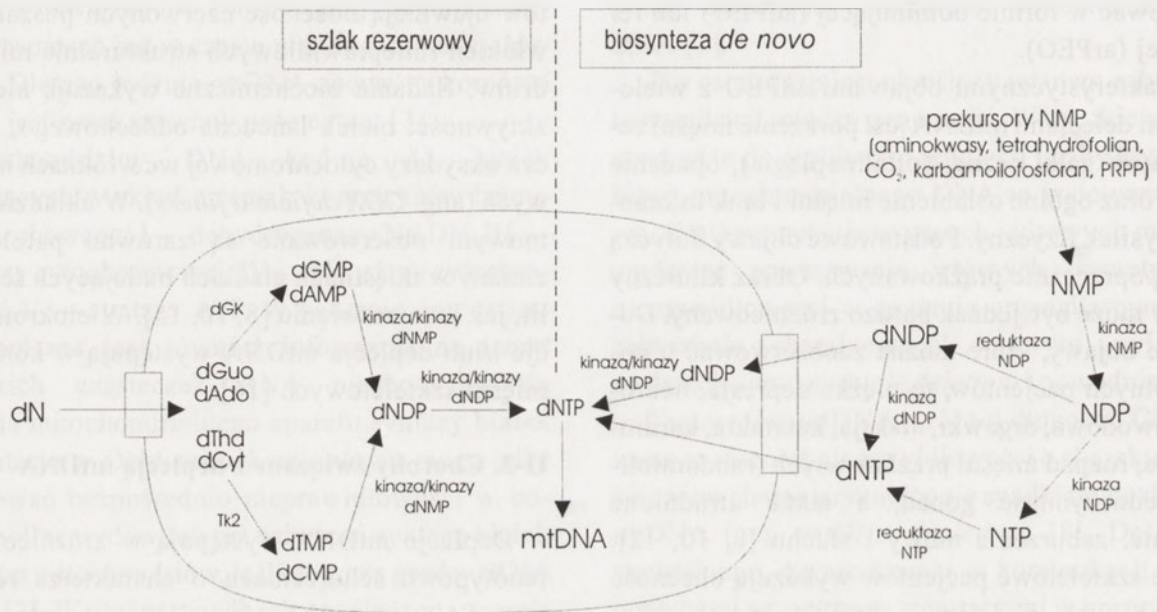
III. Mitochondrialny DNA

III-1. Substraty dla replikacji mtDNA

Mitochondrialna pula deoksyrybonukleotydów (dNTP) jest odseparowana od puli cytoplazmatycznej, ponieważ wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla związków naładowanych. Poziom nukleotydów jest utrzymywany dzięki importowi dNTP z cytozolu przez specyficzne transportery oraz dzięki obecności szlaku rezerwowego (ang. *salvage pathway*) syntezy nukleotydów w mitochondriach [9]. W mitochondriach nie zaobserwowano

na nukleotydy pod warunkiem, że w cytoplazmie odbywa się synteza dNTP na wystarczającym poziomie. Jednak w komórkach nie dzielących się synteza ta jest ograniczona, podczas gdy mtDNA ciągle podlega replikacji. Dlatego potrzebne jest inne źródło substratów do jego budowy [9].

Podstawowy udział w tworzeniu mitochondrialnej puli nukleotydów ma szlak rezerwowy. Wymaga on obecności w mitochondriach zbalansowanego poziomu czterech deoksyrybonukleozydów (dN) importowanych do organelli z cytozolu. dN mogą być następnie aktywowane przez mitochondrialne kinazy trzech typów fosforylujące kolejno dN do dNMP,



Rys. 1. Główne etapy biosyntezy deoksyrybonukleotydów będących substratami dla replikacji mtDNA: mitochondrialny szlak rezerwowy i biosynteza *de novo* zachodząca w cytoplazmie.

enzymów odpowiadających za syntezę nukleotydów *de novo*. Jedynym wyjątkiem są dane o biochemicznej aktywności reduktazy rybonukleotydów w tych organellach [20].

Rybonukleotydy są wytwarzane w cytoplazmie w drodze syntezy *de novo* z prostych substratów, takich jak aminokwasy, tetrahydrofolian, CO₂, karbamoilofosforan i aktywowany donor jednostek rybozy, 5-fosforybozylo-1-pirofosforan (PRPP). Prekursory DNA — deoksyrybonukleotydy powstają poprzez redukcję rybonukleotydów [21]. Deoksyrybonukleotydy mogą być następnie przenoszone do mitochondriów dzięki obecności odpowiednich transporterów. Dotychczas poznano tylko dwa białka o takiej aktywności. Jedno z nich to nośnik deoksyrybonukleotydów (ang. *deoxynucleotide carrier*, DNC), transportujący głównie dNDP i mniej wydajnie dNTP. Drugie to transporter dCTP, który ma bardzo niskie powinowactwo do innych dNTP. Transportery mogą pokrywać mitochondrialne zapotrzebowanie

dNMP do dNDP i w końcu dNDP do dNTP. Dotychczas sklonowano i scharakteryzowano dwie z ludzkich kinaz nukleozydów, kinazę deoksyguanozyny (dGK) i mitochondrialną kinazę tymidyny (TK2) [9]. Prócz enzymów szlaku anabolicznego nukleotydów, kinaz, w mitochondriach stwierdzono także obecność enzymu katabolizmu deoksyrybonukleotydów. Jest nim 5'-nukleotydaza (dNT2) katalizująca defosforylację dTMP i dUMP. Ma ona przypuszczalnie udział w regulacji stężenia dNTP w mitochondriach [22, 23].

III-2. Replikacja mtDNA

Podstawowy model powielania ludzkiego mtDNA to replikacja asynchroniczna, czyli jednokierunkowa osobna replikacja każdej z dwóch nici. Jednak ostatnio przeprowadzone badania sugerują, że u ssaków może także występować replikacja synchroniczna obu nici z nicią wiodącą i opóźnioną [24].

Replikacja asynchroniczna charakteryzuje się występowaniem dwóch miejsc inicjacji replikacji odrębnych dla każdej nici (O_H i O_L). Początkowo replikowana jest tylko nić H. Replikacja nici L rozpoczyna się w momencie, gdy zostanie ukończona synteza około dwóch trzecich potomnej nici H i przebiega w przeciwnym kierunku [3]. Replikacja jest przeprowadzana przez jedyną mitochondrialną polimerazę DNA, polimerazę γ (POLG). W replikację mtDNA zaangażowane są również dodatkowe, kodowane jądrowo białka, takie jak polimeraza RNA, mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (mtTFA), mitochondrialna endonukleaza RNA i inne. Część czynników jest poznana i opisana dla mitochondriów człowieka, jednak część wymaga jeszcze scharakteryzowania [9].

IV. Molekularne podstawy zaburzeń w komunikacji między genomami

IV-1. Zaburzenia syntezy i homeostazy puli nukleotydów

IV-1.1. Fosforylaza tymidyny — enzym cytoplazmatyczny

Fosforylaza tymidyny (TP, EC 2.4.2.4) jest cytoplazmatycznym enzymem przeprowadzającym odwracalną reakcję fosforolizy tymidyny do tyminy i 2-deoksyrybozo-1-fosforanu. Reakcja ta ma znaczenie w katabolizmie nukleozydów, podczas gdy reakcja odwrotna jest ważna dla działania szlaku rezerwowego [15]. TP odgrywa więc dużą rolę w regulacji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego poziomu tymidyny oraz dostępności tego nukleozydu dla szlaków biosyntezy DNA. TP katalizuje również fosforolizę deoksyurydyny. Istnieje co prawda ludzki enzym fosforylaza urydyny (UP, EC 2.4.2.3), jednak nie wykazuje on zdolności rozszczepiania ani deoksyurydyny, ani tymidyny [25, 26].

Mutacje w genie fosforylasy tymidyny powiązane z MNGIE na podstawie mapowania genetycznego w rodzinach obciążonych tą chorobą. Sekwencjonowanie genu *TP* u pacjentów z objawami MNGIE pozwoliło na stwierdzenie występowania mutacji homozygotycznych lub złożonych mutacji heterozygotycznych nieobecnych w zdrowej grupie kontrolnej. Mutacje związane z chorobą są zróżnicowane i obejmują mutacje typu missens, delecje, insercje pojedynczych nukleotydów oraz mutacje zaburzające proces składania mRNA (ang. *splicing*). Dane biochemiczne wskazują, że są to mutacje typu utraty funkcji [16, 27].

Biochemicznym skutkiem mutacji w genie fosforylasy tymidyny jest zaburzony metabolizm tymidyny, a także nieprawidłowy katabolizm innego nukleozydu — deoksyurydyny. U pacjentów z MNGIE obserwuje się około 70-krotny wzrost poziomu tymidyny i ponad 100-krotny wzrost stężenia deoksyurydyny w osoczu w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej [15, 20].

Prawdopodobną przyczyną powstawania nieprawidłowości w mtDNA jest drastyczne podwyższenie poziomu tymidyny u osób z homozygotycznymi lub złożonymi heterozygotycznymi mutacjami *TP*. Nadmiar tymidyny zaburza replikację organellarnego DNA w dużo większym stopniu niż DNA jądrowego. Uważa się, że jest to związane z odseparowaniem mitochondrialnej puli nukleotydów i zależnością mitochondriów od szlaku rezerwowego tymidyny. Tymidyna jest w mitochondriach fosforylowana do dTMP przez kinazę tymidyny 2, której gen ulega konstyttywnej ekspresji także w nie dzielących się komórkach. Stała aktywność TK2 pozwala nadmiarowi tymidyny wchodzić na drogę przemian biochemicznych prowadzących do dTTP, a podwyższony poziom dTTP zaburza równowagę mitochondrialnej puli nukleotydów i co za tym idzie — replikację mtDNA [15]. Skutkiem tego może być występowanie wielokrotnych delecji oraz deplecja organellarnego DNA, a także powstawanie mutacji punktowych na skutek zaburzenia aktywności 3'-egzonukleolitycznej polimerazy γ przez nadmiar dTTP. Specyficzne somatyczne mutacje punktowe są obserwowane w mtDNA pacjentów z MNGIE. Również podwyższony poziom deoksyurydyny fosforylowanej w mitochondriach do dUTP może sprzyjać tworzeniu się mutacji punktowych na skutek nieuprawnionego wbudowywania dUTP do mtDNA [20].

Wzór ekspresji genu *TP* koreluje z miejscami występowania głównych objawów MNGIE (tkanki przewodu pokarmowego, mózg, nerwy obwodowe). Wyjątkiem są jednak komórki mięśni szkieletowych. Obserwuje się w nich zaburzenia struktury i liczby kopii mtDNA oraz nieprawidłowości biochemiczne związane z mitochondrialnym łańcuchem oddechowym mimo, że w komórkach tych stwierdzono bardzo niski poziom ekspresji genu *TP*. Przypuszcza się jednak, że nawet niski poziom enzymu może być niezbędny dla utrzymania odpowiedniego poziomu dTTP w mitochondriach lub też zewnątrzkomórkowe wysokie stężenie tymidyny może pośrednio wpływać na integralność i liczbę kopii mtDNA w tkankach, w których ekspresja genu fosforylasy tymidyny jest bardzo niska [16].

Badania nad udziałem mutacji genu *TP* w powstawaniu objawów MNGIE obejmują tworzenie mysich modeli tej choroby. U myszy za katabolizm tymidyny we wszystkich tkankach prócz wątroby odpowiada nie tylko *TP*, ale również fosforylaza urydyny. Dlatego tylko myszy z podwójną mutacją typu *knock-out* genów *Tp* i *UP* wykazywały całkowitą utratę aktywności fosforylasy tymidyny. Poziom ty-

obecnością dwóch mutacji heterozygotycznych. Połączony efekt tych mutacji powoduje, że spada aktywność enzymatyczna *dGK* [18].

Ekspresja *dGK* jest w przybliżeniu podobna we wszystkich tkankach, nie jest więc jasny powód specyficzności tkankowej zespołu deplecyjnego związanego z mutacjami tego genu. Cytoplazmatyczny enzym *dCK* (kinaza deoksycytydyny) szlaku

Tabela 1

Choroby związane z zaburzeniami w komunikacji między genomami [wg 9 i 11]

Nieprawidłowe białko (gen)	Fenotyp	Nieprawidłowości mtDNA
Mitochondrialna polimeraza DNA (<i>POLG</i>)	1. adPEO, arPEO 2. męska bezpłodność	1. wielokrotne delecje 2. czasami obserwowane uszkodzenia mtDNA
Twinkle (<i>C10 ORF2</i>)	adPEO	wielokrotne delecje
Izoforna I translokatora nukleotydów adeninowych (<i>ANT1</i>)	adPEO	wielokrotne delecje
Fosforylaza tymidyny (<i>TP</i>)	MNGIE	wielokrotne delecje i deplecja
Kinaza deoksyguanozyny (<i>dGK</i>)	uszkodzenia wątroby i encefalopatia	deplecja
Mitochondrialna kinaza tymidyny (<i>TK2</i>)	miopatia	deplecja

midyny w osoczu myszy *TP^{-/-}UP^{-/-}* był 13 razy wyższy niż w grupie zwierząt kontrolnych, w mysich mózгах zaobserwowano również zmiany odpowiadające encefalopatii występującej u pacjentów z MNGIE. Jednak w mięśniach szkieletowych nie zanotowano ani nieprawidłowości mtDNA, ani histopatologicznych zmian charakterystycznych dla tej choroby [28].

IV-1.2. Kinaza deoksyguanozyny — mitochondrialny enzym szlaku rezerwowego

Kinaza deoksyguanozyny (*dGK*, EC 2.7.1.113) jest mitochondrialnym enzymem katalizującym reakcję przeniesienia reszty fosforanowej z ATP na deoksyguanozynę, deoksyadenozynę oraz deoksyinozynę z wytworzeniem monofosforanów tych nukleozydów [29].

Mutacje w genie kinazy deoksyguanozyny powiązane z postacią wątrobowo-mózgową zespołu deplecyjnego na podstawie mapowania genetycznego u pacjentów wykazujących objawy tej choroby. Sekwencjonowanie *dGK* u tych pacjentów pozwoliło na identyfikację homozygotycznych mutacji (delecji, duplikacji i mutacji nonsens) nie występujących w grupie kontrolnej. Ich skutkiem jest przedwczesna terminacja translacji i utrata funkcji białka [17]. U jednego z pacjentów powiązane występowanie postaci wątrobowo-mózgowej zespołu deplecyjnego z

rezerwowego nukleotydów purynowych wykazuje podobną do *dGK* specyficzność substratową (fosforylacja *dGuo* i *dAdo*). Ponieważ poziom ekspresji *dCK* w wątrobie i w mózgu jest niski, uważa się, że replikacja mtDNA w tych organach zależy przede wszystkim od szlaku rezerwowego zachodzącego w mitochondriach i od *dGK* dostarczającego prekursorów do syntezy. Dlatego pierwsze objawy mutacji w genie kinazy deoksyguanozyny dotyczą właśnie wątroby i układu nerwowego [9].

IV-1.3. Mitochondrialna kinaza tymidyny — enzym szlaku rezerwowego

Kinaza tymidyny 2 (*TK2*, EC 2.7.1.21) to mitochondrialny enzym zdolny do przeprowadzania fosforylacji deoksytymidyny, deoksyurydyny i deoksytydyny do monofosforanów tych nukleozydów. Podobnie jak *dGK* enzym ten odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu równowagi w mitochondrialnej puli substratów do syntezy mtDNA [30].

Mutacje w genie *TK2* zostały powiązane z niektórymi przypadkami mięśniowej postaci zespołu deplecyjnego. U pacjentów wykazujących objawy miopatii i deplecję mtDNA w komórkach mięśni szkieletowych wykryto dotychczas cztery różne mutacje powodujące substytucje aminokwasów w powstającym białku. Mutacje te występują na ogół w formie homo-

zygotycznej, u części pacjentów wykazano natomiast obecność dwóch złożonych mutacji heterozygotycznych w genie *TK2* [18, 19].

Wpływ mutacji na aktywność enzymatyczną mitochondrialnej kinazy tymidyny zbadano dokładnie w przypadku dwóch substytucji, H121N oraz I212N (mutacje te są także opisywane jako H90N i I181N, przy czym numeracja ta bazuje na sekwencji dojrzałego białka bez lidera). Porównywano aktywność enzymatyczną zrekombinowanych białek zawierających odpowiednie mutacje z właściwościami prawidłowej formy kinazy tymidyny 2. Stwierdzono, że enzym I212N wykazuje znaczny spadek aktywności w stosunku do dzikiej formy *TK2* (mniej niż 1% normalnej aktywności), a mutacja jednakowo zaburza zdolność do fosforylacji dThd i dCyt. Natomiast enzym H121N wykazuje normalną aktywność w procesie fosforylacji dThd, ale obniżoną zdolność do wykorzystywania dCyt jako substratu (szczególnie w przypadku ograniczonej dostępności drugiego substratu — ATP). Taka charakterystyka enzymów jest spójna z obrazem klinicznym zespołu deplecyjnego: pacjenci, u których stwierdzono obecność mutacji I212N mają objawy cięższe niż ci, u których występuje mutacja H121N [30].

Gen *TK2* ulega ekspresji w wielu tkankach, ale wyjaśnienie specyficzności tkankowej objawów w sytuacji niedoboru *TK2* jest bardziej skomplikowane niż w przypadku *dGK*. Gen cytoplazmatycznej kinazy tymidyny (*TK1*) ulega ekspresji wyłącznie w komórkach dzielących się, dlatego wszystkie tkanki postmitotyczne są całkowicie zależne od *TK2*. Ograniczenie objawów do mięśni szkieletowych w przypadku mutacji genu *TK2* może zależeć od dodatkowych czynników, np. naturalnie niższego poziomu aktywności *TK2* w tej tkance, podwyższonego poziomu syntezy mtDNA, czy wysokiej ekspresji genu mitochondrialnej 5'-nukleotyduazy (dNTP2), która defosforyluje głównie dTMP [9].

Zarówno mutacje w genie *TK2*, jak i *dGK* powodują zachwianie proporcji między poszczególnymi nukleotydami. Z tego względu przypuszczano, że wierność replikacji przy niedoborze tych enzymów może być niska. Jednak dotychczas nie zaobserwowano ani delecji, ani mutacji punktowych w mtDNA pacjentów mających mutacje w genach kinaz. Wsnuto więc wniosek, że mitochondrialny DNA obecny w zmienionych chorobowo tkankach został zsyntetyzowany przed rozwojem niedoboru dNTP [9], natomiast faktycznym efektem zaburzeń w organelarnej puli nukleotydów jest deplecja mtDNA. Sugeruje się bowiem, że jednym z czynników regulujących liczbę kopii mtDNA jest wewnątrzmito-

chondrialne stężenie substratów do jego budowy, a dokładniej stosunek masy genomu mitochondrialnego do wielkości puli nukleotydów. Dlatego niedobór jednego lub kilku nukleotydów może być przyczyną niskiej liczby kopii mtDNA w tkankach dotkniętych objawami zespołu deplecyjnego [31].

IV-2. Zaburzenia transportu nukleotydów do mitochondriów — translokator nukleotydów adeninowych 1

Translokator nukleotydów adeninowych (ANT) jest białkiem wbudowanym w wewnętrzną błonę mitochondrialną. Nukleotydy adeninowe są przemieszczane przez ANT dzięki obecności gradientu potencjału elektrochemicznego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. ANT działa jako antyporter. Transport ADP do wnętrza mitochondriów jest sprzężony z transportem ATP z macierzy mitochondrialnej do cytoplazmy. W ten sposób ANT reguluje stężenie nukleotydów adeninowych w cytoplazmie i w mitochondriach oraz pośredniczy w przekazywaniu informacji o jądrowym i cytoplazmatycznym zużyciu ATP do mitochondriów. [21]. Białko ANT stanowi również centralną część megakanalu, struktury odgrywającej kluczową rolę w indukowanym mitochondrialnie procesie apoptozy [12].

Istnieją trzy izoformy ludzkich translokatorów nukleotydów adeninowych wykazujące tkankową specyficzność ekspresji. Główna forma translokatora występująca w komórkach mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego i w mózgu to białko ANT1. Gen *ANT2* wykazuje ekspresję głównie w tkankach proliferujących. Natomiast *ANT3* ulega ekspresji w różnych rodzajach tkanek, jednak w żadnej z nich nie jest to forma dominująca [32, 33].

Gen *ANT1* znajduje się w *locus* 4q35, w obrębie regionu sprzężonego z występowaniem adPEO [13]. Sekwencjonowanie genu *ANT1* u pacjentów z objawami adPEO pozwoliło dotychczas na identyfikację czterech heterozygotycznych mutacji typu missens nie występujących w grupie kontrolnej. Mutacje powodują substytucje aminokwasów w powstającym białku. Uważa się, że wszystkie wykryte dotychczas mutacje mogą zaburzać strukturę ANT1 [12, 34, 35]. Ponieważ translokator nukleotydów adeninowych 1 jest dimerem, to nawet heterozygotyczna mutacja powoduje, że średnio trzy na cztery powstające dimery są nieprawidłowe. Łącznie z bardzo istotną funkcją ANT1 fakt ten może tłumaczyć dominujący charakter PEO związanej z mutacjami w genie tego białka [12].

Hodowle komórek ludzkich nie są dobrym modelem do badania konsekwencji mutacji w genie translokazy, gdyż *ANTI* nie ulega w nich ekspresji. Dlatego badanie prowadzi się na mysich modelach. Mysie modele, nokauty *ANTI*^{-/-}, wykazują fenotyp podobny do obserwowanego u pacjentów z adPEO. Zaobserwowano również obecność wielokrotnych delecji mtDNA w komórkach mięśni szkieletowych i w sercu myszy *ANTI*^{-/-}. Wielokrotne delecje mtDNA u pacjentów z adPEO i u myszy pozbawionych genu translokazy występują w tych tkankach, w których izoforma ANT1 jest głównym przenośnikiem nukleotydów adeninowych [12, 36, 37].

Mechanizm powstawania somatycznych mutacji mtDNA w adPEO powodowanym przez mutacje genu *ANTI* nie został dotychczas poznany. Istnieje hipoteza zakładająca, że uszkodzenie białka ANT1 może zaburzać równowagę w mitochondrialnej puli dATP i co za tym idzie — niekorzystnie wpływać na replikację mtDNA. Nie stwierdzono, że dATP i dADP są transportowane przez ANT1, jednak obecny w mitochondriach enzym, reduktaza rybonukleotydów, może katalizować redukcję ADP do dADP [12]. Alternatywne wyjaśnienie mówi, że mutacje mtDNA nie są wynikiem zaburzeń w mitochondrialnej puli nukleotydów, lecz wynikają z ogólnej dysfunkcji tych organelli spowodowanej zaburzeniami w funkcjonowaniu ANT1 [38].

IV-3. Replikacja mtDNA i regulacja wewnątrzmitochondrialnej puli nukleotydów — Twinkle

W przeciwieństwie do pozostałych opisywanych białek związanych z zaburzeniami w komunikacji między genomami, funkcja białka o nazwie Twinkle nie jest dokładnie poznana. Wiadomo, że jest to białko o lokalizacji mitochondrialnej, które wykazuje podobieństwo sekwencyjne do primazy/helikazy faga T7 (produktu genu 4 — gp4). Dotyczy to głównie regionu, który w białku fagowym odpowiada za aktywność helikazy. Podobnie jak primaza/helikaza faga T7 i inne pierścieniowe helikazy białko Twinkle *in vitro* spontanicznie tworzy multimery, w tym heksamery. Zaobserwowano, że nadekspresja genu kodującego Twinkle w liniach komórkowych powoduje umiarkowany wzrost aktywności helikazowej stymulowanej ATP/dATP oraz zależnej od obecności Mg²⁺ w ekstrakcie mitochondrialnym. Jednak oczyszczone białko Twinkle (z C-końcowym histag) nie wykazywało wykrywalnej aktywności helikazy DNA [39, 40].

Ludzki gen *C10orf2* kodujący Twinkle zidentyfikowano na drodze poszukiwania otwartych ramek

odczytu w jednym z regionów sprzężonych z występowaniem adPEO (10q24). Najwyższy poziom ekspresji genu kodującego Twinkle zaobserwowano w komórkach mięśni szkieletowych i trzustki, niższy w komórkach mięśnia sercowego, natomiast w pozostałych tkankach ilość transkryptu jest niewielka [39].

Poszukiwanie mutacji w genie kodującym Twinkle u rodzin z adPEO pozwoliło dotychczas na identyfikację 12 różnych nieprawidłowości, których występowania nie stwierdzono w zdrowej grupie kontrolnej. Jedną z mutacji to duplikacja 39 par zasad, pozostałe to mutacje punktowe typu missens. Objawy adPEO obserwowano u pacjentów z mutacjami heterozygotycznymi. Wynika to z faktu, że przypuszczalna aktywna forma Twinkle jest heksamerem. Stwierdzono także przypadki homozygotyczności pod względem mutacji A359T. Przebieg choroby u takich pacjentów jest cięższy niż u ich heterozygotycznych pod względem tej mutacji krewnych [39, 41].

Wszystkie wykryte mutacje występują w regionach filogenetycznie konserwowanych, także w porównaniu do primazy/helikazy faga T7. Jednak żadna z mutacji nie dotyczy aminokwasów, których odpowiedniki w gp4 są zaangażowane w aktywność helikazową. Stwierdzono również, że obecność mutacji nie powoduje zaburzenia multimeryzacji lub transportu Twinkle do mitochondriów [39].

Rola Twinkle w powstawaniu wielokrotnych delecji mtDNA nie została dotychczas poznana. Ponieważ zmutowane białko gp4 faga T7 wykazuje podwyższoną aktywność dNTPazy, stwierdzono, że mutacje w genie Twinkle mogą powodować zmianę funkcji białka. Podwyższona aktywność hydrolityczna prowadziłyby do zaburzeń równowagi w wewnątrzmitochondrialnej puli nukleotydów, co z kolei może powodować powstawanie wielokrotnych delecji [39].

Alternatywne wyjaśnienie bierze pod uwagę fakt, że delecje mtDNA są obserwowane na bardzo niskim poziomie u niektórych zdrowych ludzi. Akumulacja nieprawidłowych cząsteczek u pacjentów z adPEO może wynikać z przyspieszonego tempa ich powstawania, obniżonej zdolności naprawy i przewagi replikacyjnej mniejszych cząsteczek mtDNA z delecjami. Zdolność do naprawiania uszkodzeń mtDNA jest ograniczona w porównaniu z DNA jądrowym. W mitochondriach stwierdzono obecność systemu usuwającego nieprawidłowe zasady, np. uracyl (ang. *base excision repair*, BER) oraz błędnie sparowane w czasie replikacji nukleotydy (ang. *mismatch repair*, MMR). Nie stwierdzono natomiast aktywności

enzymów zaangażowanych w niespecyficzny system usuwania nieprawidłowych nukleotydów (ang. *nucleotide excision repair*, NER) pozwalający na usuwanie większych błędów z mtDNA [42, 43]. Jeśli Twinkle pełni funkcje mitochondrialnej helikazy, heksamery zawierające nieprawidłowe podjednostki mogą wykazywać się obniżoną procesywnością w przypadku napotkania uszkodzeń DNA. Powodowałyby to zatrzymanie replikacji i podwyższony poziom rekombinacji, co z kolei mogłoby zwiększyć ilość nieprawidłowości w mtDNA [39, 40].

IV-4. Zaburzenia w replikacji mtDNA — polimeraza γ

Polimeraza γ (POLG, EC 2.7.7.7) jest jedyną mitochondrialną polimerazą DNA. Funkcjonuje ona jako heterotrimer składający się z jednej podjednostki katalitycznej (p140) oraz homodimeru podjednostek pomocniczych (p55) [32]. Podjednostka katalityczna wykazuje podobieństwo do rodziny polimeraz typu A. Zawiera ona domenę o aktywności polimerazy zbudowaną z trzech motywów pol (A, B i C) oraz domenę egzonukleazową 3'→5' (odpowiedzialną za sprawdzanie poprawności replikacji), na którą składają się trzy motywy *exo* (I, II, III) [44]. Obie domeny są niezbędne do prawidłowej replikacji mtDNA. Polimeraza cechuje się dość wysoką wiernością replikacji, rzadko pojawiają się błędy typu pojedynczych insercji i delecji. Natomiast wierność zachowania ramki odczytu jest niska w przypadku replikacji sekwencji zawierających więcej niż cztery takie same nukleotydy. Podjednostki pomocnicze podwyższają powinowactwo POLG do mtDNA poprzez wiązanie się do dwuniciowego DNA. Powoduje to zwiększenie procesywności polimerazy, ale także obniżenie wierności replikacji [45].

Gen kodujący podjednostkę katalityczną polimerazy znajduje się w regionie sprzężonym z adPEO i arPEO (*locus* 15q25). Sekwencjonowanie genu *POLG* u pacjentów z dominującą lub recesywną formą PEO pozwoliło na identyfikację czterech mutacji typu missens. Jedna z heterozygotycznych mutacji, substytucja Y955C lokująca się w motywie pol B, występowała wyłącznie u pacjentów z adPEO. U osób z recesywną formą oftalmoplegii stwierdzono obecność złożonych mutacji heterozygotycznych nie dotyczących żadnego z motywów pol lub *exo* [44].

Porównanie sekwencji białkowych polimeraz typu A pozwoliło stwierdzić, że Y955 odpowiada tyrozynie 530 w polimerazie faga T7. W białku fagowym ta reszta aminokwasowa bierze udział w tworzeniu miejsca wiązania dNTP i nie pozwala na wej-

cie rybonukleotydów w reakcję syntezy DNA. Z kolei w polimerazie I bakterii *Escherichia coli* odpowiednikiem Y955 jest tyrozyna 766, której substytucja powoduje podwyższony poziom mutacji punktowych, a także delecji fragmentów DNA znajdujących się między zgodnymi sekwencjami powtórzonymi [46].

Otrzymana w wyniku mutagenazy *in vitro* katalityczna podjednostka polimerazy niosąca mutację Y955C wykazywała czterokrotny spadek aktywności polimerazowej w porównaniu do prawidłowego białka. Było to spowodowane 45-krotnym wzrostem K_m dla nukleotydów. Oszacowanie stężenia dNTP w macierzy mitochondrialnej pozwala jednak sądzić, że jest ono wystarczająco wysokie, aby zapewnić polimerazie z mutacją Y955C aktywność zbliżoną do normy. Stwierdzono jednak, że mutacja zaburza wierność replikacji. Najczęściej występujące *in vitro* mutacje to substytucje pojedynczych nukleotydów, głównie tranzycje A→G. Odpowiada to mutacjom mtDNA obserwowanym u pacjentów z PEO. Polimeraza Y955C ma także podwyższoną skłonność do błędów polegających na zmianie ramki odczytu [46].

Główną nieprawidłowością obserwowaną w mitochondrialnym DNA pacjentów z objawami PEO są delecje oraz wielokrotne delecje różnej długości flankowane przez sekwencje prostych powtórzeń [22]. Mechanizm tworzenia delecji w mtDNA nie jest do końca jasny. Jednak obecność prostych powtórzeń otaczających obszary delecji sugeruje, że najbardziej prawdopodobny jest mechanizm rekombinacji wewnątrzcząsteczkowej. W czasie niesynchronicznej replikacji mtDNA powolna synteza pojedynczej nici, która może migrować i przyłączać się na nowo, sprzyja zajściu takiej rekombinacji. Na tej podstawie zaproponowano dwa modele powstawania delecji: model poślizgu replikacji (ang. *slip-replication*) oraz nieuprawnionej elongacji (ang. *illegitimate elongation*) [8].

W modelu poślizgu replikacji pojedyncza rodzicielska nić H łączy się nieprawidłowo z komplementarną nicią L na skutek błędnego parowania prostych sekwencji powtórzonych. Fragment rodzicielskiej nici H znajdujący się między powtórzeniami jest wycinany, a powstałe fragmenty ligowane. W ten sposób tworzy się zawierająca delecję matryca dla syntezy potomnej nici L [8].

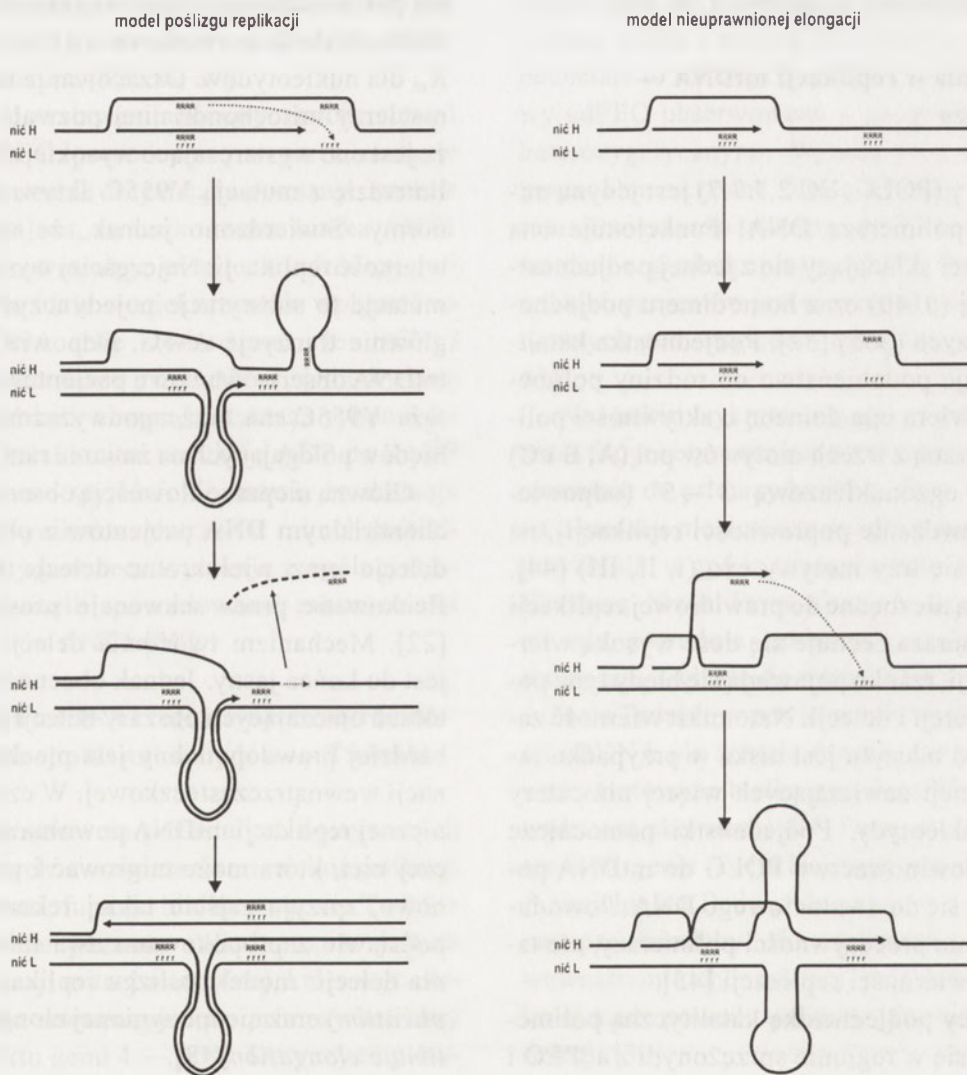
W modelu nieuprawnionej elongacji wydłużana nić potomna jest wypierana z pętli D przez migrującą rodzicielską nić H, która łączy się komplementarnie z nicią L w obrębie prostego powtórzenia. Powoduje to nieprawidłowe parowanie uwolnionej nici potomnej z sekwencją powtórzoną znajdującą się na nici L

poniżej pierwszego prostego powtórzenia. Błędne sparowanie dwóch sekwencji powtórzonych jest ułatwiane przez stabilną strukturę drugorzędową, która zbliża powstającą nić H do rejonu nici L poniżej prawidłowego miejsca parowania. Elongacja potomnej, skróconej nici H, a następnie tworzenie na jej matrycy nici L powoduje powstawanie cząsteczek mtDNA z delecjami [8].

Migracja nici DNA zachodzi łatwiej, gdy replikacja mtDNA zostaje zwolniona lub wstrzymana. Duża

kwencjami powtórzonymi. Nieprawidłowe wstawienie nukleotydu w pozycję poprzedzaną przez sekwencję prostego powtórzenia może ułatwiać poślizg replikacji, błędne parowanie nici i delecję fragmentu nici rodzicielskiej [46].

Krótsza cząsteczka mtDNA ma przypuszczalnie przewagę replikacyjną nad cząsteczką o normalnej długości. Dlatego nawet pojedyncze wydarzenie generujące mtDNA z delecją prowadzi po pewnym czasie do stanu, w którym duża część cząsteczek mito-



Rys. 2. Proponowane modele powstawania delecji między prostymi powtórzeniami w mtDNA: model poślizgu replikacji i model nieuprawnionej elongacji. Sekwencje prostych powtórzeń występujących w rejonie pętli D oznaczono R (nić H) i r (nić L). Opis powstawania delecji znajduje się w tekście (wg [8]).

część wielokrotnych delecji w mtDNA, które mają swój początek w rejonie pętli D, może być związana właśnie z zatrzymaniem syntezy DNA na wczesnym stadium replikacji. Blokowanie replikacji może być wynikiem zaburzenia funkcji polimerazy γ na skutek mutacji lub pochodną braku równowagi w mitochondrialnej puli nukleotydów wywołanego mutacjami w genie fosforylasy tyminy, ANT1 lub Twinkle [8]. Generacja mutacji punktowych może dodatkowo promować tworzenie delecji między prostymi se-

chondrialnego DNA jest nieprawidłowa. Reszta cząsteczek mtDNA jest prawidłowa — ten stan nazywamy heteroplazmą [8].

Objawy kliniczne PEO występują dopiero po nagromadzeniu się nieprawidłowych cząsteczek mtDNA w ilościach powyżej poziomu krytycznego. Wartość krytyczna zależy od rodzaju tkanki i jest najniższa dla tkanek zależnych przede wszystkim od metabolizmu tlenowego [2]. Jest to dodatkowy czynnik specyficzności tkankowej PEO. Postępujące ob-

jawy choroby i pogorszenie obserwowane z wiekiem są skutkiem dalszego gromadzenia się w tkankach cząsteczek mtDNA z delecjami.

V. Podsumowanie

Brak wiarygodnych danych epidemiologicznych powoduje, że ciężko jest ocenić częstość występowania chorób mitochondrialnych związanych z zaburzeniami w komunikacji między genomami. Jednak badania ostatnich lat pokazują, że są one częstsze niż początkowo sądzono. Tym większe ma znaczenie poznawanie molekularnych mechanizmów odpowiadających za powstawanie tych schorzeń. Dotychczas zidentyfikowane geny, których mutacje powiązano z takimi chorobami jak adPEO, arPEO, MNGIE czy zespoły deplecyjne, na pewno nie są jedynymi odpowiedzialnymi za powstawanie zaburzeń w komunikacji między genomami. Znane są rodziny, w których występują objawy adPEO, jednak nie udało się tej choroby powiązać z żadnym z opisywanych dotychczas *loci*. Dalsze badania są potrzebne, aby zidentyfikować ewentualne inne czynniki powodujące rozwój chorób tego typu. Niezbędne są także informacje na temat występowania dodatkowych mutacji w opisywanych genach; na temat biochemicznych, histologicznych, czy metabolicznych skutków obecności określonych mutacji oraz mechanizmów powstawania wielokrotnych delecji i deplecji mtDNA. Wiedza taka może pomóc w opracowaniu szybkich i niezawyżnych metod diagnostycznych, a także skutecznych sposobów leczenia chorób mitochondrialnych związanych z zaburzeniami w komunikacji między genomami.

Artykuł otrzymano 25 sierpnia 2003

Zaakceptowano do druku 18 lutego 2003

Piśmiennictwo

- Holt IJ, Harding AE, Morgan—Hughes JA (1988) *Nature* **331**: 717-719
- DiMauro S, Schon EA (2001) *Am J Med Genet* **106**: 18-26
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominiko T, Simerly C, Schatten G (1999) *Nature* **402**: 371-372
- Taanman JW (1999) *Biochim Biophys Acta* **1410**: 103-123
- Goździcka—Józefiak A, Bobowicz MA, Kędzia H (2001) *Genetyka molekularna i biochemia wybranych chorób u ludzi*. Wyd. Naukowe UAM, Poznań, str. 133-136
- Scharfe C, Zaccaria P, Hoertnagel K, Jaksch M, Klopstock T, Dembowski M, Lill R, Prokisch H, Gerbitz KD, Neupert W, Mewes HW, Meitinger T (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 155-158
- Zeviani M (2001) *Seminars in Cell and Developmental Biology* **12**: 407-416
- Hirano M, Marti R, Ferreira—Barros C, Vila MR, Tadesse S, Nishigaki Y, Nishino I, Vu TH (2001) *Seminars in Cell and Developmental Biology* **12**: 417-427
- Elpeleg O, Mandel H, Saada A (2002) *J Mol Med* **80**: 389-396
- Suomalainen A, Kaukonen J (2001) *Am J Med Gen* **106**: 53-61
- Rovio AT, Marchington DR, Donat S, Schuppe HC, Abel J, Fritsche E, Elliott DJ, Laippala P, Ahola AL, McNay D, Harrison RF, Hughes B, Barrett T, Bailey DM, Mehmet D, Jequier AM, Hargreave TB, Kao SH, Cummins JM, Barton DE, Cooke HJ, Wei YH, Wichmann L, Poulton J, Jacobs HT (2001) *Nat Genet* **29**: 261-262.
- Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kytälä A, Zeviani M, Comi GP, Keranen S, Peltonen L, Suomalainen A (2000) *Science* **289**: 782-785
- Kaukonen J, Comi GP, Piscaglia MG, Peltonen L, Suomalainen A (1999) *Am J Hum Genet* **65**: 256-261
- Gamez J, Ferreira C, Accarino ML, Guarner L, Tadesse S, Marti RA, Andreu AL, Ragner N, Cervera C, Hirano M (2002) *Neurology* **59**: 455-457
- Spinazzola A, Marti R, Nishino I, Andreu AL, Naini A, Tadesse S, Pela I, Zammarchi E, Donati MA, Oliver JA, Hirano M (2002) *J Biol Chem* **277**: 4128-4133
- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M (1999) *Science* **283**: 689-692
- Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, Anbinder Y, Berkowitz D, Hartman C, Barak M, Eriksson S, Cohen N (2001) *Nat Genet* **29**: 337-341
- Online Mendelian Inheritance in Man* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, 2003
- Saada A, Haag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O (2001) *Nat Genet* **29**: 342-344
- Marti R, Nishigaki Y, Hirano M (2003) *BBRC* **303**: 14-18
- Stryer L (2000) *Biochemia*. PWN, Warszawa, str. 789-812
- Rampazzo Ch, Gallinaro L, Milanese E, Frigimelica E, Reichard P, Bianchi V (2000) *PNAS* **97**: 8239-8244
- Gallinaro L, Crovatto K, Rampazzo Ch, Pontarin G, Ferrero P, Milanese E, Reichard P, Bianchi V (2002) *J Biol Chem* **277**: 35080-35087
- Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT (2000) *Cell* **100**: 515-524
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, Bioinformatics Center Institute for Chemical Research, Kyoto University, <http://www.genome.ad.jp/kegg/>, 2003
- ElKouni MH, elKouni MM, Naguib FN (1993) *Cancer Res* **53**: 3687-3693
- Hirano M, Garcia-de-Yebenes J, Jones AC, Nishino I, DiMauro S, Carlo J R, Bender AN, Hahn AF, Salberg LM, Weeks DE, Nygaard TG (1998) *Am J Hum Genet* **63**: 526-533
- Haraguchi M, Tsujimoto H, Fukushima M, Higuchi I, Kuribayashi H, Utsumi H, Nakayama A, Hashizume Y, Hirato J, Yoshida H, Hara H, Hamano S, Kawaguchi H, Furukawa T, Miyazono K, Ishikawa F, Toyoshima H, Kaname T, Komatsu M, Chen ZS, Gotanda T, Tachiwada T, Sumizawa T, Miyadera K, Osame M, Yoshida H, Noda T, Yamada Y, Akiyama S (2002) *Mol Cell Biol* **22**: 5212-5221
- Jullig M, Eriksson S (2000) *Eur J Biochem* **267**: 5466-5472
- Wang L, Saada A, Eriksson S (2002) *J Biol Chem* **278**: 6963-6968
- Moraes CT (2001) *Trends Genet* **17**: 199-205
- Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**: 258-260
- Doerner A, Pauschinger M, Badorf A, Noutsias M, Giessen S, Schulze K, Bilger J, Rauch U, Schultheiss H-P (1997) *FEBS Lett* **414**: 258-262
- Napoli L, Bordoni A, Zeviani M, Hadjigeorgiou GM, Sciacco M, Tiranti V, Terentiou A, Moggio M, Papadimitriou A, Scarlato G, Comi GP (2001) *Neurology* **57**: 2295-2298
- Komaki H, Fukuzawa T, Houzen H, Yoshida K, Nonaka I, Goto Y (2002) *Ann Neurol* **51**: 645-648

36. Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC (1997) *Nat Genet* **16**: 226-234
37. Wallace DC (2001) *Am J Med Gen* **106**: 71-93
38. Chen X J (2002) *Hum Mol Genet* **11**: 1835-1843
39. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C (2001) *Nat Genet* **28**: 223-231
40. Moraes C T (2001) *Nat Genet* **28**: 200-201
41. Lewis S, Hutchison W, Thyagarajan D, Dahl HH (2002) *J Neuro Sci* **201**: 39-44
42. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B (2002) *Mutat Res* **509**: 127-151
43. Mason PA, Matheson EC, Hall AG, Lightowers RN (2003) *Nucleic Acids Res* **31**: 1052-1058
44. Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C (2001) *Nat Genet* **28**: 211-212
45. Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA, Copeland WC (2001) *J Biol Chem* **276**: 38555-38562
46. Ponamarev MV, Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA, Copeland WC (2002) *J Biol Chem* **277**: 15225-15228

Molekularny mechanizm działania hormonów tarczycy

Molecular mechanism of thyroid hormone action

LIDIA ZABROCKA¹, JERZY KLIMEK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mechanizm działania hormonów tarczycy
 - II-1. Budowa receptora hormonów tarczycy
 - II-1.1. Domena A/B
 - II-1.2. Domena wiążąca DNA
 - II-1.3. Region łączący
 - II-1.4. Domena wiążąca ligand
 - II-2. Izofornie receptorów hormonów tarczycy
 - II-3. Elementy odpowiedzi na hormony tarczycy
 - II-4. Kompleksy receptorów hormonów tarczycy
 - II-5. Molekularne podstawy działania hormonów tarczycy
 - II-5.1. Korepresory i podstawowa represja
 - II-5.2. Koaktywatory i aktywacja transkrypcji
- III. Perspektywy

Contents:

- I. Introduction
- II. Mechanism of thyroid hormone action
 - II-1. Thyroid hormone receptor structure
 - II-1.1. A/B Domain
 - II-1.2. DNA binding domain
 - II-1.3. Hinge region
 - II-1.4. Ligand binding domain
 - II-2. Thyroid hormone receptor isoforms
 - II-3. Thyroid hormone response elements
 - II-4. Thyroid hormone receptor complexes
 - II-5. Molecular basis of thyroid hormone action
 - II-5.1. Corepressors and basal repression
 - II-5.2. Coactivators and activation of transcription
- III. Future directions

Wykaz stosowanych skrótów: AP-1 — czynnik transkrypcyjny; cAMP- cykliczny AMP; CBP (ang. *CREB binding protein*) — koaktywator transkrypcji wiążący CREB; CREB — czynnik transkrypcyjny; c-Ski — składnik kompleksu deacetylazy histonowej; DBD (ang. *DNA binding domain*) — domena wiążąca DNA; DRIP (ang. *vitamin D receptor interacting proteins*) — białka oddziałujące z receptorami witaminy D; GR — receptor glukokortykoidów; HAT (ang. *histone acetylase*) — acetylaza histonowa; HDAC (ang. *histone deacetylase*) — deacetylaza histonowa 1; LBD (ang. *ligand binding domain*) — domena TR wiążąca ligand; NCoR (ang. *nuclear receptor co-repressor*) — korepresor transkrypcji; NFκB — czynnik transkrypcyjny; oś HPT- oś podwzgórze-przysadka-gruczoł tarczycy; p/CAF (ang. *p300/CBP-associated factor*) — białko koaktywatorowe; pol RNA II — polimeraza RNA II [EC 2.7.7.6]; p300 — białko koaktywatorowe; RAC3/ACTR/pCIP/AIB-1/SRC3 — koaktywator receptorów steroidowych; RAR — receptor kwasu retinowego; RXR — receptor kwasu 9-*cis*-retinowego; sekwencja TATA (ang. *TATA box*) — sekwencja promotora genów, miejsce wiązania maszynierii transkrypcyjnej; sin3 — białko korepresorowe; SRC (ang. *steroid receptor coactivator*) — koaktywatory receptorów steroidowych; SMRT (ang. *silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*) — wygaszający mediator dla recepto-

rów kwasu retinowego i hormonów tarczycy, białko korepresorowe wiążące receptory jądrowe i regulujące represję transkrypcji i strukturę chromatyny; SUN-CoR (ang. *small ubiquitous nuclear corepressor*) — mały wszechobecny korepresor jądrowy; TAFII32, TAFII70 — czynniki transkrypcyjne; TBG (ang. *thyroxine binding globulin*) — globulina wiążąca tyroksynę; TBP (ang. *TATA box-binding protein*) — białko wiążące się do sekwencji *TATA box*; TFIIB — czynnik transkrypcyjny; TH (ang. *thyroid hormone*) — hormony tarczycy; TIF1/GRIP1/SRC2 — koaktywator receptorów steroidowych; TR — receptor hormonów tarczycy; TRAP (ang. *TR-associated proteins*) — białka koaktywatorowe wiążące się z receptorami tarczycy; TRAP 220, TRAP 100 — podjednostki białka TRAP; TRBP/ASC-2/RAP250 (ang. *TR-binding protein*) — białko wiążące się do receptorów tarczycy; TRE (ang. *thyroid hormone response elements*) — element odpowiedzi na hormony tarczycy; TRIP (ang. *TR-interacting proteins*) — białka koaktywatorowe oddziałujące z receptorami tarczycy; TRUP 1 (ang. *thyroid hormone receptor uncoupling protein 1*) — białko oddziałujące z domeną wiążącą DNA receptora hormonów tarczycy; VDR — receptor witaminy D

I. Wstęp

Tarczyca jest gruczołem dokrewnym wytwarzającym dwa drobnocząsteczkowe hormony (TH): 3,5,3',5'-tetra-jodotyroninę (T4), znaną jako tyroksyna, i 3,5,3'-trijodotyroninę (T3) [1]. Synteza i wydzielanie hormonów tarczycy są precyzyjnie regulowane przez oś podwzgórze-przysadka-gruczoł tar-

¹Mgr, ²prof. dr hab. n. farm., Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, e-mail: lidzab@wp.pl; e-mail: klimekj@amg.gda.pl

czyzy (oś HPT) [2]. Hormon uwalniający tyreotropinę — tyreoliberyna (TRH) — syntetyzowany przez jądro przykomorowe podwzgórza jest transportowany aksonami do przedniego płata przysadki mózgowej poprzez splot naczyniówkowy, gdzie wiąże się z receptorami w subpopulacji komórek wydzielających glikoproteinowy hormon — tyreotropinę (TSH) [2]. Tyreotropina wiąże się z receptorami TSH w tarczycy i stymuluje ekspresję kilku genów, m.in. symportera Na^+/I^- , peroksydazy tarczycowej oraz tyreoglobuliny. Aktywacja genu tyreoglobuliny w komórkach pęcherzykowych nabłonka tarczycy jest pierwszym etapem syntezy hormonów tarczycy. Produkt genu tyreoglobuliny ulega wielu modyfikacjom potranslacyjnym, m.in. jodowaniu i łączeniu tyrozyn, prowadząc do syntezy T3 i T4. Tyreoglobulina, zmagazynowana w świetle pęcherzyków, przemieszcza się na drodze endocytozy do komórek pęcherzyków tarczycowych, gdzie pod wpływem enzymów lizosomalnych ulega proteolizie do aktywnych hormonów tarczycy. Głównym uwalnianym do krwi hormonem tarczycy jest T4, przekształcana następnie w tkankach poszczególnych organów w trijodotyroninę. T3 i T4, łącząc się z białkiem wiążącym osocza (TBG) [3-6], docierają do narządów, gdzie wiążąc się ze specyficznymi receptorami, wywołują efekty biologiczne. Podwyższenie stężenia T3 hamuje zwrotnie produkcję i uwalnianie zarówno TRH jak i TSH.

II. Mechanizm działania hormonów tarczycy

Głównym miejscem oddziaływania hormonów tarczycy w komórce jest jądro komórkowe, gdzie TH regulują ekspresję określonych genów poprzez jądrowe receptory hormonów tarczycy (TR).

Jądrowe receptory hormonów tarczycy mają zdolność wiązania TH z dużym powinowactwem i specyficznością [7-12]. Kompleksy TR:TH łączą się następnie z elementem odpowiedzi na hormony tarczycy, tzw. sekwencją TRE (ang. *thyroid hormone response elements*), zlokalizowaną w pobliżu promotora docelowego genu. Tworzenie kompleksów ligand-receptor(TR)-DNA(TRE) jest pierwszym etapem w pozytywnej lub negatywnej regulacji ekspresji genów.

Interesujące, że ekspresja stosunkowo dużej grupy genów jest regulowana w określonej tkance przez hormony tarczycy zarówno pozytywnie jak i negatywnie, w tym samym czasie. Jak wykazała analiza [z wykorzystaniem techniki mikromacierzy DNA (ang. *DNA microarray*)] ekspresji genów regulowa-

nych przez T3 w wątrobie myszy, większość genów podlega regulacji negatywnej (41 genów w stosunku do 14 regulowanych pozytywnie) [13]. Wśród genów, których ekspresja jest stymulowana przez trijodotyroninę znajdują się geny zaangażowane w procesy: glukoneogenezy, glikogenolizy, lipogenezy, proliferacji komórek i apoptozy [13]. Natomiast ekspresja genów ścieżki sygnałowej insuliny, odporności komórkowej, struktur macierzy zewnątrzkomórkowej, szkieletu komórkowego, glikozylacji białek oraz fosforylacji oksydacyjnej jest regulowana przez T3 negatywnie [13].

II-1. Budowa receptorów hormonów tarczycy

Receptory hormonów tarczycy, z wyodrębnionymi dwiema podrodzinami ($\text{TR}\alpha$ i $\text{TR}\beta$), należą do dużej nadrodziny receptorów jądrowych, do której należą również: receptory hormonów steroidowych, witaminy D (VDR), kwasu retinowego (RAR) oraz tzw. receptory sieroce, dla których nie znaleziono ligandów ani funkcji [14]. Wszystkie te białka wykazują podobną organizację domen [15].

Receptory hormonów tarczycy są zbudowane z pięciu domen: A/B (N-końcowej), C (centralnej domeny wiążącej się z DNA, zawierającej dwie struktury palca cynkowego — tzw. domena DBD (ang. *DNA binding domain*)), D (regionu łączącego, zawierającego sygnał lokalizacji jądrowej), E (C-końcowej domeny wiążącej ligand — tzw. domeny LBD (ang. *ligand binding domain*)) i F (domeny wiążącej ligand odpowiedzialnej również za aktywację transkrypcji) [16-18] (Ryc. 1).

II-1.1. Domena A/B

Region N-końcowy ma zmienną długość w różnych izoformach receptorów hormonów tarczycy [19]. Rola tej domeny nie jest wyjaśniona. Badania różnych izoform TR u ludzi i myszy wykazały, że w regionie tym znajduje się główna domena aktywująca transkrypcję [20-22]. Z kolei inne prace opisują, że usunięcie tego regionu w jednej z izoform receptorów hormonów tarczycy ($\text{TR}\beta$) nie wpływa na zależną od T3 aktywację transkrypcji [23]. Uważa się, że region N-końcowy receptora hormonów tarczycy może odpowiadać za funkcję represyjną receptora, wchodząc w interakcje z domeną wyciszającą korepresora (SMRT) i następnie uniemożliwiając wiązanie innych składników kompleksu korepresora [24]. Domena A/B może także wpływać na konformację sąsiadującej z nią domeny wiążącej DNA oraz modulować jej powinowactwo do innych receptorów

jądrowych, co odgrywa rolę w procesie dimeryzacji [25].

II-1.2. Domena wiążąca DNA

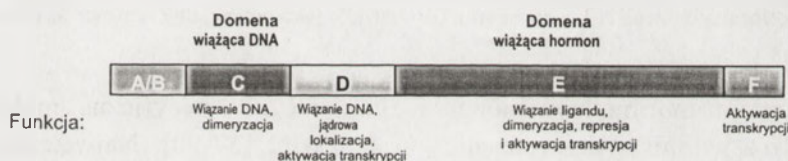
Domena wiążąca DNA (DBD) jest umiejscowiona w centralnej części receptora i zawiera dwa palce cynkowe. Doświadczenia na mutantach pozbawionych jednego z palców cynkowych, jak również zamiana reszt cysteinowych na inne (np. na histydyne) hamuje wiązanie DNA oraz aktywność transkrypcyjną tych receptorów [26, 27]. W obrębie pierwszego palca cynkowego znajduje się tzw. „kaseta P” (charakterystyczna również dla innych receptorów jądrowych), zawierająca specyficzną sekwencję aminokwasową umiejscowioną w okolicy trzeciej i czwartej cysteiny palca cynkowego [28].

Domena DB głównie decyduje o rozpoznawaniu elementów odpowiedzi na hormony tarczycy (TRE), o wiązaniu się z DNA w obrębie bruzdy większej TRE i w małym stopniu w obrębie bruzdy mniejszej TRE [29].

sową odpowiedzialną za lokalizację jądrową [18, 39]. W obrębie regionu łączącego mogą przyłączać się białka korepresorowe, które wchodząc w interakcje z wolnym receptorem hormonów blokują transkrypcję [40].

II-1.4. Domena wiążąca ligand

Domena LB odpowiada za wiązanie ligandu oraz odgrywa ważną rolę w dimeryzacji, transaktywacji i podstawowej represji przez wolny receptor [16, 30]. Sekwencje aminokwasowe LBD różnych receptorów hormonów tarczycy różnią się, lecz domena ta zachowuje podobieństwo w strukturze przestrzennej [41]. Na całej długości sekwencji LBD rozproszone są siedmioaminokwasowe powtórzenia, które tworzą powierzchnie hydrofobowe niezbędne dla homo- i heterodimeryzacji [30]. Drugo- i trzeciorzędowa struktura tej domeny wykazuje istnienie dwunastu struktur α -heliks tworzących hydrofobową kieszeń [42]. Heliks dwunasty, leżący najbliżej C-końca LBD, zawiera domenę transaktywacyjną (tzw. dome-



Ryc. 1. Domeny strukturalne receptora hormonów tarczycy i ich funkcje.

Receptory hormonów tarczycy mogą wiązać się z DNA jako monomery, homodimery oraz heterodimery utworzone z białkami należącymi do tej samej nadrodziny receptorów [16, 17, 30]. Kompleksy monomerów TR z DNA są mniej stabilne niż kompleksy dimerów. Dimery o największym powinowactwie do TRE składają się z receptorów hormonów tarczycy i receptorów kwasu 9-cis-retinowego (tzw. RXR). Takie heterodimery TR/RXR są głównymi pośrednikami w biologicznych efektach hormonów tarczycy [32, 33]. Utworzenie heterodimeru TR/RXR jest korzystne ze względu na najlepsze dopasowanie do miejsc połowkowych w TRE [34].

Strukturę kompleksów DNA-domena DB poznało dla receptora glukokortykoidów [35], receptora estrogenów [36], rev-Erb [37] oraz heterodimeru TR/RXR [38].

II-1.3. Region łączący

Region łączący znajdujący się pomiędzy DBD a LBD zawiera bogatą w lizyny sekwencję aminokwa-

nę AF-2). Ligand zakotwiczony jest głęboko w hydrofobowej kieszeni LBD. Szczególną rolę w tym procesie odgrywa heliks dwunasty, który zmienia swoją konformację w czasie przyłączania ligandu. W nieobecności ligandu heliks ten jest oddalony od reszty białka, a po jego związaniu owija się ściśle wokół domeny LB [42].

II-2. Izoforny receptorów hormonów tarczycy

W 1986 roku Venstroom [43] i Evans [44] niezależnie od siebie wyizolowali z bibliotek cDNA embrionu kury i łożyska ludzkiego i sklonowali cDNA kodujące dwa różne receptory TH. Dziś wiadomo, że istnieje wiele izoform receptorów hormonów tarczycy, wśród których wyróżniamy dwie główne izoformy kodowane przez dwa różne geny znajdujące się na różnych chromosomach (Tab. 1) [16, 45-49].

Wśród wymienionych w tabeli 1 izoform TR funkcjonalnymi są: TR α 1, TR β 1, TR β 2 i TR β 3.

Wszystkie one wiążą T3 i pośredniczą w regulacji ekspresji genów regulowanych przez hormony tarczycy [13, 50, 51]. Zarówno geny TR α 1 jak i TR β 1 wykazują silną ekspresję w większości tkanek szczura [52]. TR α 1 wykazuje wysoki poziom ekspresji w mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych i brunatnej tkance tłuszczowej, a TR β 1 w wątrobie, mó-

Ostatnie badania sugerują ich udział w rozwoju jelit [47].

Wiele najnowszych informacji dotyczących roli oraz funkcjonowania poszczególnych izoform receptora hormonów tarczycy uzyskano na podstawie doświadczeń z użyciem myszy, którym usunięto (ang. *knock-out*) lub wprowadzono gen określonej izoformy

Tabela 1

Różnorodność izoform receptorów hormonów tarczycy. +/- wiązanie/niewiązanie T3; +/-x receptor funkcjonalny/receptor niefunkcjonalny

TYP IZOFORMY	GEN KODUJĄCY IZOFORMĘ	LOCUS GENU NA LUDZKIM CHROMOSOMIE	PRODUKTY TRANSKRYPCJI GENU (po alternatywnym splicingu)	WIĄZANIE T3	WIĄZANIE DNA	FUNKCJONALNOŚĆ RECEPTORA
TR α	THRA (NRI1)	CHROMOSOM 17 (17q11.2)	mRNA TR α 1	+	+	+
			mRNA TR α 2	-	+	X
			mRNA $\Delta\alpha$ 1 *	-	-	X
			mRNA $\Delta\alpha$ 2 *	-	-	X
TR β	THRB (NRI2)	CHROMOSOM 3 (3p24.3)	mRNA TR β 1	+	+	+
			mRNA TR β 2	+	+	+
			mRNA TR β 3**	+	+	+
			mRNA $\Delta\beta$ 3***	+	-	X

*Powstają w wyniku transkrypcji z innego promotora w intronie 7. Są to krótkie warianty izoform TR α ; nie posiadają domeny wiążącej DNA i są dominująco-negatywnymi antagonistami w stosunku do innych form receptorów [47]. **Powstaje u szczura w wyniku transkrypcji z trzeciego promotora genu TR β [48]. Posiada dwa nowe 5' eksony wycinane i dołączane do 1 eksonu występującego w mRNA TR β 1 i TR β 2. W wyniku translacji tego produktu powstaje receptor zawierający unikalny 23-aminokwasowy region proksymalny do domen LBD i DBD [48]. ***W mRNA $\Delta\beta$ 3 pominięty jest ekson zawierający kodon startowy TR β 3 i w wyniku rozpoczęcia translacji z następnego kodonu ATG powstaje jako skrócone białko z utraconą domeną N-końcową oraz DBD; działa jako potencjalny represor *in vitro* [48].

zgu i nerkach [53]. W rozwoju embrionalnym mózgu główną izoformą jest TR α 1, natomiast po urodzeniu zauważa się znaczący wzrost ekspresji izoformy TR β 1. Izoforma TR β 2 charakteryzuje się tkankowo-specyficzną ekspresją w przednim płacie przysadki mózgowej i w podwzgórzu, jak również wykazuje ekspresję na wysokim poziomie w rozwijającym się mózgu i uchu wewnętrznym [52, 54-56]. Niefunkcjonalny wariant TR2 wykazuje najsilniejszą ekspresję w porównaniu z innymi izoformami receptora hormonów tarczycy i funkcjonalne znaczenie tego zjawiska nie jest znane [48]. Izoformy TR β 3 oraz $\Delta\beta$ 3 wykazują ekspresję na podobnym, wysokim poziomie, ale wykazują jednocześnie różnice w lokalizacji tkankowej: TR β 3 występuje głównie w wątrobie i nerkach, natomiast $\Delta\beta$ 3 głównie w śledzionie; wspólnie występują w płucach [48]. Różny stosunek ekspresji genów kodujących obydwie te izoformy TR w tkankach szczurów eutyroidowych i z hipertyreozą sugeruje, że alternatywny *splicing* pierwotnego transkryptu TR jest regulowany przypuszczalnie przez T3 i zależy od rodzaju tkanki [48]. Stosunek TR β 3 do $\Delta\beta$ 3 może więc wpływać na odpowiedź poszczególnych tkanek na T3 [48]. Receptory $\Delta\alpha$ 1 i $\Delta\alpha$ 2 występują głównie w jelitach i płucach i uważane były do tej pory za niefunkcjonalne [47].

my TR ze specyficzną mutacją punktową (ang. *knock-in*) [57-90]. Najważniejsze wyniki tych doświadczeń przedstawia Tabela 2.

II-3. Elementy odpowiedzi na hormony tarczycy

W genach regulowanych przez hormony tarczycy zlokalizowane są elementy odpowiedzi na hormony tarczycy [91]. Większość TRE leży w kierunku 5' od sekwencji minimalnego promotora, choć w pewnych przypadkach mogą one być zlokalizowane w sekwencjach flankujących w kierunku 3' od regionu kodującego [92]. Stwierdzono również, że mogą występować różnice w sekwencjach nukleotydowych TRE, jak również w ilości oraz długości przerw i orientacji ich miejsc połówkowych [93].

Miejsca połówkowe to dwa sześci nukleotydowe powtórzenia (heksamery) z sekwencją zgodności G/AGGTC/GA [93-95]. Ich funkcją jest tworzenie charakterystycznych konfiguracji: sekwencji palindromowych (P), odwrotnie palindromowych (IP) i bezpośrednich powtórzeń (DR4) (Ryc. 2) [93-95]. Prawie wszystkie regulowane przez hormony tarczycy geny docelowe zawierają dwa lub więcej miejsc połówkowych [95].

Optymalna odległość między miejscami połówkowymi w bezpośrednich powtórzeniach, odwrotnych sekwencjach palindromowych i sekwencjach

szczególnej polarności tego typu sekwencji i odległości pomiędzy miejscami połówkowymi, ale również specyficznie oddziałujące ze sobą nawza-

Tabela 2

Fenotypy myszy z usuniętymi lub zmodyfikowanymi genami poszczególnych receptorów tarczycy

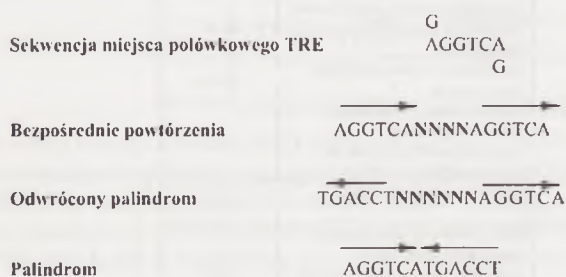
Knockout/ knock-in TR	Genotyp myszy	Poziom hormonów tarczycy	Fenotyp myszy	Písmien- nictwo
$\alpha^{-/-}$	delecja $\alpha 1$ i $\alpha 2$ obecność $\Delta\alpha 1$ i $\Delta\alpha 2$	znacznie obniżony poziom T3 i T4	opóźniony wzrost, śmierć po odstawieniu od myszy karniowych, wady rozwojowe jelit, utrata komórek B	57
$\alpha 1^{-/-}$	delecja $\alpha 1$ i $\Delta\alpha 1$ obecność $\alpha 2$ i $\Delta\alpha 2$	niższy poziom T4 (samec), T3 bez zmian	prawidłowy wzrost, obniżenie temperatury ciała, bradykardia	58
$\alpha^{0/0}$	delecja wszystkich izoform α	niższy poziom T4 (samec), T3 bez zmian	opóźniony wzrost, opóźnione dojrzewanie kości, brak błon śluzowych jelit, nadwrażliwość słuchowa na tony wysokiej częstotliwości	59
$\beta 2^{-/-}$	delecja $\beta 2$, obecność $\beta 1$, $\beta 3$, $\Delta\beta 3$	podwyższony poziom T3 i T4	prawidłowy wzrost, nieobecność receptorów m-stożkowych, słuch prawidłowy	60, 61
$\beta^{-/-}$	delecja wszystkich izoform β	podwyższony poziom T3 i T4	prawidłowy wzrost, całkowita utrata słuchu	62-64
$\alpha 2^{-/-}$	delecja $\alpha 2$ i $\Delta\alpha 2$, nadekspresja $\alpha 1$, obecność $\Delta\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\Delta\beta 3$	niski poziom T3 i T4	otyłość, zmiany w kościach, spowolniony wzrost (prawdopodobnie częściowo efekt nadekspresji $\alpha 1$)	65
$\alpha^{7/7}$	delecja $\Delta\alpha 1$ i $\Delta\alpha 2$, obecność wszystkich izoform β , $\alpha 1$ i $\alpha 2$	prawidłowy poziom T3	zmiany w nabłonku jelita	66
$\alpha^{P17/PV}$	delecja $\alpha 2$ i $\Delta\alpha 2$, obecność $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\Delta\beta 3$, nadekspresja $\alpha 1$ z mutacją PV (mutacją punktową w egzonie 9 zmieniającą ramkę odczytu)	podwyższony poziom T3 (u heterozygot)	mutacja letalna, gdyż hamuje aktywację transkrypcji i wiązanie ligandu, u heterozygot — duża śmiertelność, powolny rozwój	67
$\alpha^{R348C/R348C}$	delecja $\alpha 2$ i $\Delta\alpha 2$, obecność $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\Delta\beta 3$, nadekspresja $\alpha 1$ i $\Delta\alpha 1$ z mutacją punktową R348C	osobniki młode ze zmniejszonym poziomem T3	mutacja letalna (tak jak w przypadku PV), u heterozygot poważnie spowolniony rozwój po urodzeniu	68
$\beta^{Tm1/Tm1}$	delecja wszystkich izoform β , obecność wszystkich izoform α	podwyższony poziom T3	wole	69
$\beta^{Tm2/Tm2}$	delecja $\beta 2$, obecność wszystkich izoform α , $\beta 1$, $\beta 3$, $\Delta\beta 3$	podwyższony poziom T3	brak receptorów m-stożkowych	70
$\beta^{PV/PV}$	wszystkie izoformy β z mutacją punktową PV, obecność wszystkich izoform α	znacznie podwyższony poziom T3 i T4	zaburzenia osi HPT, zaburzenia rozwoju kości, niska waga ciała, hyperplazja i rozrost tarczycy	71
$\beta^{1337T/1337T}$	wszystkie izoformy β z mutacją nonsensowną w kodonie 337, obecność wszystkich izoform α	znacznie podwyższony poziom T3 i T4, oporność na te hormony	wady rozwojowe i funkcji mózgu, zaburzenia czynności uczenia się, zaburzona ekspresja genów w hipokampie	72
$\alpha 1^{-/-}\beta^{Tm1/Tm1}$	delecja izoform $\alpha 1$, $\Delta\alpha 1$ i wszystkich izoform β , obecność $\alpha 2$ i $\Delta\alpha 2$	znaczny wzrost T3 i T4	zaburzenia płodności, funkcji osi HPT, wzrostu, zmniejszona waga kości	73
$\alpha 2^{-tm2/tm2}\beta^{Tm1/Tm1}$	delecja izoform $\alpha 2$, $\Delta\alpha 2$ i wszystkich izoform β , nadekspresja $\alpha 1$, obecność $\Delta\alpha 1$	nieznacznie obniżony poziom T3 i T4	nieznacznie zmniejszona waga, brak zaburzeń osi HPT i słuchu	74
$\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$	delecja $\alpha 1$, $\alpha 2$ i wszystkich izoform β , obecność $\Delta\alpha 1$ i $\Delta\alpha 2$	bardzo wysoki poziom T3 i T4	śmierć 5 tygodni po urodzeniu, spowolniony rozwój kości i jelit	64
$\alpha^{0/0}\beta^{-/-}$	delecja wszystkich izoform TR	bardzo wysoki poziom T3 i T4	zaburzenia osi HP, słaby wzrost i spowolnione dojrzewanie kości, hypotermia, utrata słuchu	59

palindromowych wynosi odpowiednio 4, 6 i 0 nukleotydów (Ryc. 2). W przypadku innych kombinacji odległości pomiędzy miejscami połówkowymi (np. 1, 2, 3 lub 5 nukleotydów) receptory hormonów tarczycy wiążą się z TRE z dużo mniejszym powinowactwem [93-95]. Jak wynika z danych doświadczalnych, bezpośrednie powtórzenia zawierające 4 lub 5 nukleotydów pomiędzy miejscami połówkowymi są specyficznie rozpoznawane tylko przez niektóre receptory jądrowe, potrafiące dostosować się do

jem [96]. Na przykład w przypadku heterodimeru TR/RXR, miejsce połówkowe przy końcu 5' DR4 (4 nukleotydy rozdzielające) jest rozpoznawane przez RXR, a przy końcu 3' przez TR tego heterodimeru [38]. Utworzona w ten sposób orientacja heterodimeru może być istotna dla oddziaływań białko-białko z koaktywatorami i korepresorami i w konsekwencji wpływa na łączenie związanego z ligandem heterodimeru TR/RXR z kompleksem transkrypcyjnym.

II-4. Kompleksy receptorów hormonów tarczycy

Receptory hormonów tarczycy mogą wiązać się z TRE jako monomery, homodimery oraz heterodimery, w przeciwieństwie do receptorów hormonów steroidowych, które wiążą się tylko jako homodimery do palindromowych elementów odpowiedzi hormonalnej [97]. Głównym białkiem dimeryzującym z receptorami hormonów tarczycy jest receptor kwasu 9-*cis*-retinowego. Oddziaływanie z receptorem kwasu 9-*cis*-retinowego wzmacnia wiązanie się TR z TRE [98] oraz odgrywa decydującą rolę w transkrypcji zależnej od T3. Tworzenie heterodimerów TR/RXR zwiększa ilość docelowych genów, ponieważ heterodimery mogą wiązać się z TRE o różnych sekwencjach i różnym położeniu miejsca połówkowego [97]. Ponadto w rodzinie RXR występują trzy



Ryc. 2. Orientacja miejsca połówkowego i optymalne odległości pomiędzy połówkami. N — dowolny nukleotyd; strzałka wskazuje orientację w miejscu połówkowym na nici kodującej.

różne izoformy receptorów, więc możliwe jest, że te trzy różne białka mogą dodatkowo zwiększać różnorodność heterodimerów TR/RXR, które wiążą się z TRE z odmienną specyficznością i w inny sposób aktywują transkrypcję docelowych genów [98]. Zasadniczą korzyścią wpływającą z tworzenia różnych heterodimerów może być zwiększenie różnorodności kompleksów z udziałem receptorów hormonów tarczycy, a tym samym zwiększenie możliwości współdziałania sygnałów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych na jeden gen poprzez poszczególne formy dimerów [97, 98].

II-5. Molekularne podstawy działania hormonów tarczycy

Receptory hormonów tarczycy wiążą się z TRE w genach zależnych od TH w obecności [33, 99] i nieobecności [32, 33, 100] ligandu (hormonu tarczycy). Wolne receptory hamują podstawową transkrypcję (Ryc. 3A) [101]. Związanie ligandu powoduje derepresję oraz wzmocnienie aktywacji transkrypcji

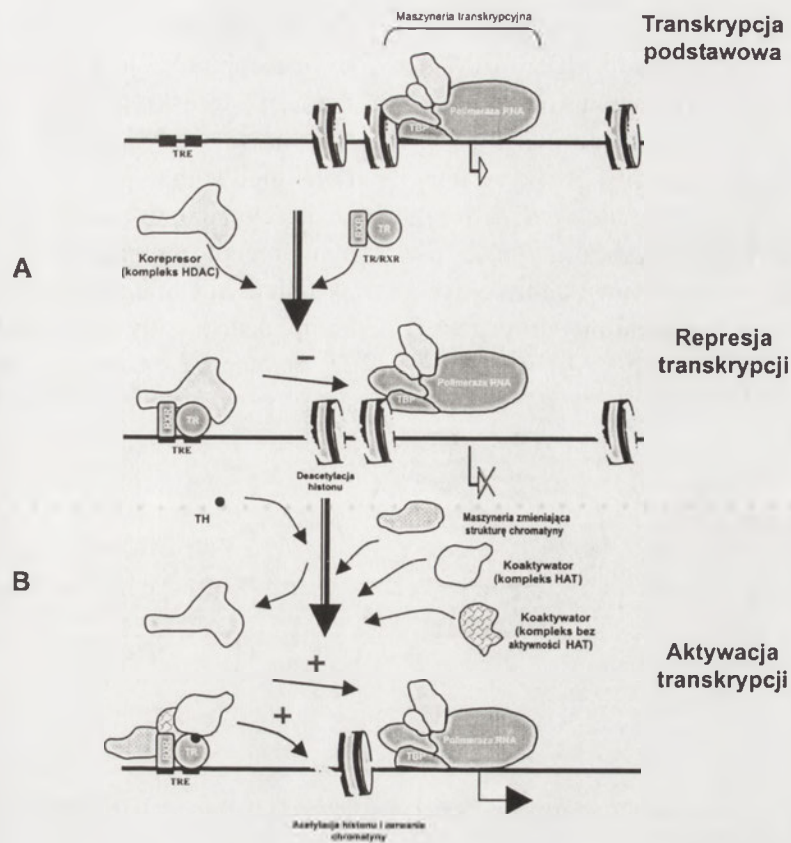
(Ryc. 3B) [102-104]. W regulacji transkrypcji pośredniczą korepresory i koaktywatory (Ryc. 3A, B) [1, 15, 101-104]. Korepresory wiążą się specyficznie z wolnymi receptorami, natomiast koaktywatory zawsze wymagają obecności hormonów tarczycy do związania się z receptorem.

II-5.1. Korepresory i represja podstawowa

Receptory hormonów tarczycy mogą wiązać się z elementami odpowiedzi na hormony także niezależnie od ligandu (Ryc. 3). To wiązanie hamuje lub wyłącza transkrypcję podstawową regulowanych genów [23, 105]. Wolne receptory hormonów tarczycy mogą reagować również ze specyficznymi białkami — korepresorami, wzmacniającymi represję transkrypcji (Ryc. 3A). W doświadczeniach z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybridowego odkryto dwa białka oddziałujące z receptorami hormonów tarczycy: 270-kDa białko NCoR1 (ang. *nuclear receptor co-repressor-1*) oraz białko SMRT (ang. *silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*) [40, 101, 103, 106-109]. SMRT jest białkiem homologicznym do NCoR1 [40, 108, 109], gdyż obydwa mają podobną budowę domen wchodzących w interakcje z TR i RAR, jak również podobny jest sposób represji transkrypcji poprzez te receptory. Wewnątrz domeny oddziałującej z TR znajduje się ściśle zachowany motyw aminokwasowy LXXLL. Poprzez ten motyw NCoR1 i SMRT oddziałują z heliksami 3, 5 i 6 receptorów hormonów tarczycy, tworzącymi część kieszeni wiążącej ligand w C-końcowych domenach receptora [110, 111].

NCoR1 i SMRT mogą tworzyć kompleksy z innymi korepresorami: białkiem sin3 [112-116], deacetylazą histonową 1 (HDAC1) (ang. *histone deacetylase 1*) [112-115, 117] i deacetylazą histonową 3 (HDAC3) (ang. *histone deacetylase 3*) [107, 118, 119] (Ryc. 4). Dwa ostatnie białka powodują deacetylację histonów na reszcie lizyny w N-końcowej jego części, co z kolei doprowadza do zmniejszenia powinowactwa histonu do DNA, rozwinięcia pozytywnych superskrętów DNA, przekształcenia konformacji nukleosomów i struktury chromatyny (Ryc. 3A) [120]. To zmniejszenie powinowactwa histonu do DNA pomaga w przekształceniu lokalnej struktury chromatyny do stanu, w którym zmiana ulega podstawowa transkrypcja [120] (Ryc. 3A).

Stosunkowo niedawno odkryto: białko korepresorowe SUN-CoR (ang. *small ubiquitous nuclear corepressor*) (mały 16-kDa jądrowy korepresor, który wchodzi w interakcję z NCoR1) [119], protoonkogen c-Ski (składnik kompleksu deacetylazy histono-



Ryc. 3. Mechanizm regulacji transkrypcji poprzez receptory hormonów tarczycy w nieobecności (A) oraz obecności (B) hormonów tarczycy. Opis skrótów w tekście.

wej) [122], białko Alien, oddziałujące z TR poprzez sin3 [123] oraz TRUP 1 (ang. *thyroid hormone receptor uncoupling protein 1*), oddziałujące tylko z domeną wiążącą DNA receptora hormonów tarczycy (Ryc. 4) [124]. Precyzyjna lokalizacja tkankowa tych korepresorów nie jest dokładnie znana. Interesujące jest również, że białko Alien wchodzi w interakcje z receptorami hormonów tarczycy, a nie oddziałuje z RAR, RXR i GR i dodatkowo łączy się wyłącznie z korepresorem sin3, a nie z NCoR lub SMRT [123].

Wykazano również, iż niezwiązany z ligandem TR może wchodzić w interakcje bezpośrednio z czynnikiem transkrypcyjnym TFIIB (kluczowy składnik kompleksu transkrypcyjnego) [20, 125, 126] (Ryc. 4). Podobnie represory NCoR i SMRT mogą także oddziaływać z czynnikami transkrypcyjnymi: TFIIB, TAFII32 oraz TAFII70 [45].

Ostatnie badania z wykorzystaniem mysich mutantów genu TR β sugerują istnienie innego mechanizmu, poprzez który receptor hormonów tarczycy bierze udział w negatywnej lub pozytywnej regulacji ekspresji genów, niezależnie od wiązania się receptora z DNA [127]. W jednym z modeli negatywnej regulacji transkrypcji receptor hormonu tarczycy nie musi wiązać się bezpośrednio z DNA w miejscu

TRE, ale może wiązać się z dimerem AP-1 związanym z DNA i w ten sposób hamować transkrypcję genu [128-130].

II-5.2. Koaktywatory i aktywacja transkrypcji

Wiązanie się T3 i T4 z receptorem hormonów tarczycy zmienia jego konformację, w wyniku czego kompleks korepresora ulega dysocjacji i przyłączany jest kompleks koaktywatora (Ryc. 3B). Udowodniono, że związane z ligandem receptory hormonów tarczycy mogą oddziaływać z wieloma białkami jądrowymi — koaktywatorami, które tworzą kompleks aktywny transkrypcyjnie [131].

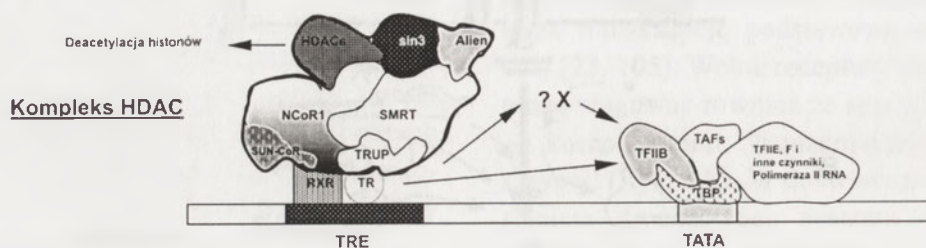
Do koaktywatorów zalicza się głównie białka rodziny SRC/p160 (ang. *steroid receptor coactivator*) [132]: SRC1 [133-135], TIF1/GRIP1/SRC2 [136], RAC3/ACTR/pCIP/AIB-1/SRC3 [137, 138]. Wszystkie białka wymienione powyżej zawierają charakterystyczny motyw LXXLL występujący także w korepresorach. Motyw ten stanowi prawdopodobne miejsce interakcji z TR [139]. W regionie N-końcowym zawierają także motyw heliks-pętla-heliks, co sugeruje, że mogą również wiązać się z DNA [139, 140].

W interakcje z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi oraz kofaktorami (m.in. z białkiem SRC) wchodzi również białka koaktywatorowe takie jak:

CBP (ang. *CREB binding protein*; specyficzny koaktywator transkrypcji stymulowanej przez cAMP) oraz p300 (oddziałujące z wirusowym koaktywatorem E1A) [141-144]. Z kolei z białkami CBP/p300 może współdziałać kolejny koaktywator, białko p/CAF (ang. *p300/CBP-associated factor*), ssaczy homolog drożdżowego aktywatora transkrypcji, który raczej moduluje, a nie aktywuje funkcje receptora [145]. Wszystkie wymienione dotychczas koaktywatory (SRC, CBP/p300, p/CAF) wykazują

oba te koaktywatory mogą służyć jako białka adaptacyjne receptorów jądrowych dla podstawowej „maszyny” transkrypcyjnej, a dodatkowo wykazują aktywność enzymatyczną acetylasy histonowej. Owa podwójna rola białek prawdopodobnie w znaczącym stopniu wpływa na aktywność transkrypcyjną receptorów jądrowych.

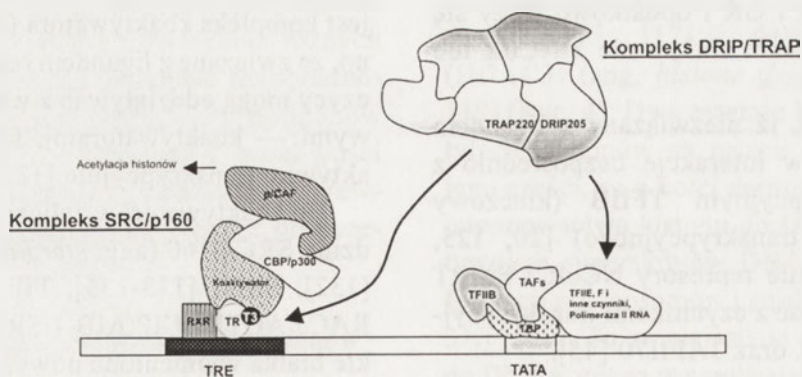
Kolejnymi białkami oddziałującymi w ogólnym kompleksie koaktywatora są tzw. białka TRAP (ang. *TR-associated proteins*), które wcześniej tworzą



Ryc. 4. Teoretyczny molekularny model represji transkrypcji w obecności ligandu (T3). X oznacza potencjalne niezidentyfikowane dotychczas koaktywatory. Opis skrótów w tekście.

aktywność acetylasy histonowej (HAT) (ang. *histone acetylase*). Mogą więc poprzez acetylację modyfikować histony wokół TRE, powodując otwarcie struktury chromatyny, ułatwiające dostęp do DNA dla podstawowego kompleksu transkrypcyjnego (Ryc. 3B). Interesujące, że różne jest powinowactwo tych białek do substratów histonowych [138, 146-148].

kompleks z białkami DRIP (ang. *vitamin D receptor interacting proteins*) [102, 151, 152]. Białka DRIP oddziałują również z innymi receptorami jądrowymi, m.in. receptorami witaminy D [153]. Kompleks TRAP wchodzi w interakcje z domeną wiążącą ligand TR wykorzystując motyw LXXLL zlokalizowany w 220-kD podjednostce TRAP 220. Interesujące jest, że myszy, u których tylko jeden gen ko-



Ryc. 5. Teoretyczny molekularny model aktywacji transkrypcyjnej w obecności ligandu (T3). Opis skrótów w tekście.

Białko p/CAF jest również częścią kompleksu transkrypcyjnego zawierającego czynniki związane tylko z TBP (ang. *TATA box-binding protein*) [138, 149], natomiast białko CBP może wchodzić w skład stabilnego kompleksu z pol RNA II [150]. Tak więc

dujący białko TRAP 220 jest funkcjonalny, charakteryzują się opóźnionym wzrostem po urodzeniu oraz niedoczynnością tarczycy pochodzenia przysadkowego, co sugeruje specyficzną rolę tego białka w działaniu tarczycy [154]. Inny koaktywator z tej

rodziny — TRAP 100 zawiera aż siedem motywów LXXLL. TRAP 100 przypuszczalnie nie oddziałuje bezpośrednio z TR lub innymi receptorami jądrowymi, ale może wiązać się poprzez białko TRAP 220. Przypuszcza się również, że kompleks DRIP/TRAP mógłby stabilizować lub wiązać się z holoenzymem Pol II RNA [155].

Wszystkie podane powyżej informacje pozwalają zaproponować mechanizm aktywacji transkrypcji, w którym mogą istnieć przynajmniej dwa różne kompleksy koaktywatora (Ryc. 5). Kompleks SRC/p160 oddziałuje z kofaktorami z aktywnością HAT: CBP/p300 i p/CAF, i przyłącza je do związanego z ligandem jądrowego receptora hormonów tarczycy, zachodzi acetylacja histonów i rozluźnianie struktury chromatyny. Następnie drugi kompleks koaktywatora DRIP/TRAP wiąże się z receptorem jądrowym, a to z kolei umożliwia przyłączanie kompleksu Pol II RNA i rozpoczęcie transkrypcji regulowanego genu [1].

Ostatnio zidentyfikowano szereg jądrowych białek koaktywatorowych oddziałujących zarówno z kompleksem SRC, jak i z kompleksem TRAP, ale ich budowa, funkcjonowanie oraz powinowactwo pozostają niewyjaśnione. Należą do nich białka TRIP (ang. *TR-interacting proteins*), oddziałujące z domeną LBD TRβ1 [108, 156] oraz białko TRBP (ang. *TR-binding protein*), znane również jako ASC-2 lub RAP 250, oddziałujące z TR poprzez motyw LXXLL (stymuluje transkrypcję kilkunastu czynników transkrypcyjnych, m.in.: AP-1, CREB i NFκB) [157-160]. Zarówno kompleks białek SRC, jak i TRAP, mogą współdziałać z innymi receptorami jądrowymi, co sugeruje niespecyficzność oddziaływania koaktywatorów z TR.

Zaskakujące jest, że związane z ligandem TR mogą również wchodzić w interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi bezpośrednio, bez współdziałania koaktywatorów [125, 126]. Takie oddziaływania mogą być równie ważne przy aktywacji, jak i przy derepresji transkrypcji [161, 162]

III. Perspektywy

Hormony tarczycy regulują wiele procesów biologicznych: od rozwoju embrionalnego aż po prawidłowe funkcjonowanie organów u osobników dojrzałych. Pełnią tę funkcję poprzez złożone ścieżki sygnalizacyjne, a ta złożoność mogłaby być wykorzystana w przyszłości do farmakologicznych interwencji w działanie TH na różnych poziomach, bowiem schorzenia związane z nieprawidłowym funk-

cjonowaniem hormonów tarczycy są obecnie istotnym problemem medycznym i społecznym.

Dokładne scharakteryzowanie struktury i funkcji receptorów hormonów tarczycy oraz ligandów specyficznych dla odpowiednich izoform TR wydaje się być niezbędne do dalszego poznania roli hormonów tarczycy w rozwoju embrionalnym, powstawaniu układu kostnego, narządu słuchu, w różnicowaniu się tkanki tłuszczowej i metabolizmie kwasów tłuszczowych. Poszerzyłoby to wiedzę nie tylko z zakresu podstawowych nauk medycznych (przede wszystkim endokrynologii), ale również nauk klinicznych.

Podziękowania

Autorzy dziękują Panu Prof. Julianowi Świerczyńskiemu za cenne merytoryczne wskazówki w trakcie redagowania pracy. Autorka szczególnie serdecznie podziękowania składa dr Piotrowi Zabrockiemu za wszelkie uwagi dotyczące niniejszego manuskryptu. Praca powstała w ramach działalności statutowej (St-40) Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej AMG oraz w ramach projektu własnego (W-62).

Artykuł otrzymano 19 stycznia 2004

Zaakceptowano do druku 15 marca 2004

Piśmiennictwo

1. Yen PM (2001) *Physiological Reviews* **81**: 1097-1142
2. Shupnik MA, Ridgway EC, Chin WW (1989) *Endocr Rev* **10**: 459-475
3. Bartalena L, Robbins J (1993) *Clin Lab Med* **13**: 583-98
4. Bartalena L (1990) *Endocr Rev* **11**: 47-64
5. Yamauchi K, Kasahara T, Hayashi H, Hotiuchi R (1993) *Endocrinology* **132**: 2254-2261
6. Benvenga S, Robbins J (1993) *Trends Endocrinol Metab* **4**: 194-198
7. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NC, Freaque HC (1987) *Endocr Rev* **8**: 288-308
8. Ribeiro RCJ, Cavalieri RR, Lomri N, Rahmaoui CM, Baxter JD, Scharschmidt BF (1996) *J Biol Chem* **271**: 17147-17151
9. Blondeau JP, Osty J, Francon J (1988) *J Biol Chem* **263**: 2685-2692
10. Shi Y-B, Liang VC-T, Parkison C, Cheng S-Y (1994) *FEBS Lett* **355**: 61-64
11. Davis PJ, Davis FB (1996) *Thyroid* **6**: 497-504
12. Samuels HH, Forman BM, Horowitz ZD, Ye S (1988) *J Clin Invest* **81**: 957-967
13. Feng X, Jiang Y, Meltzer P, Yen PM (2000) *Mol Endocrinol* **14**: 947-955
14. Lazar MA (1999) *J Invest Med* **47**: 364-368
15. Zhang J, Lazar MA (2000) *Annu Rev Physiol* **62**: 439-466
16. Lazar MA (1993) *Endocr Rev* **14**: 384-399
17. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) *Cell* **83**: 835-839
18. Evans RM (1988) *Science* **240**: 889-895

19. Koenig RJ, Warne RL, Brent GA, Harney JW, Larsen PR, Moore DD (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5031-5035
20. Tomura H, Lazar J, Phyllaier M, Nikodem VM (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5600-5604
21. Sjoberg M, Vennstrom B (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 4718-4726
22. Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW (1989) *Science* **244**: 76-79
23. Yen PM, Wilcox EC, Hayashi Y, Refetoff S, Chin WW (1995) *Endocrinology* **136**: 2845-2851
24. Yang Z, Hong SH, Privalsky ML (1999) *J Biol Chem* **274**: 37131-37138
25. Hadzic E, Habeos I, Raaka BM, Samuels HH (1998) *J Biol Chem* **273**: 10270-10278
26. Green S, Kumar V, Theulaz I, Wahli W, Chambon P (1988) *EMBO J* **7**: 3037-3044
27. Severne Y, Wieland S, Schaffner W, Rusconi S (1988) *EMBO J* **7**: 2503-2508
28. Danielson M, Hinck L, Ringold G (1989) *Cell* **57**: 1131-1138
29. Nelson CC, Hendy SC, Romaniuk PJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 16988-16994
30. Forman BM, Samuels HH (1990) *Mol Endocrinol* **4**: 1293-1301
31. Wu Y, Koenig RJ (2000) *Trends Endocrinol Metab* **11**: 207-211
32. Sachs LM, Shi Y-B (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13138-13143
33. Wong J, Shi Y-B (1995) *J Biol Chem* **270**: 18479-18483
34. Umesono K, Evans RM (1989) *Cell* **57**: 1139-1146
35. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB (1991) *Nature* **352**: 497-505
36. Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D (1993) *Cell* **75**: 567-578
37. Zhao Q, Khorasanizadeh S, Miyoshi Y, Lazar MA, Rastinejad F (1998) *Mol Cell* **1**: 849-861
38. Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB (1995) *Nature* **375**: 203-211
39. Zhu XG, Nanover JA, Hager GL, Cheng SY (1998) *J Biol Chem* **273**: 27058-27063
40. Chen JD, Evans RM (1995) *Nature* **377**: 454-457
41. Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5998-6003
42. Wagner RL, Apriletti JW., McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ (1995) *Nature* **378**: 690-697
43. Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdail J, Leutz A, Beug H, Vennstrom B (1986) *Nature* **324**: 635-640
44. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM (1986) *Nature* **324**: 641-646
45. Harvey CB, Williams GR (2002) *Thyroid* **12**: 441-446
46. Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J (1997) *Mol Endocrinol* **11**: 1278-1290
47. Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 4761-4772
48. Williams GR (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 8329-8342
49. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V (2000) *Trends Genet.* **17**: 554-556
50. Forman BM, Yang CR, Stanley F, Casanova J (1988) *Mol Endocrinol* **2**: 902-911
51. Schueler PA, Schwartz HL, Strait KA, Mariash CN, Oppenheimer JH (1990) *Mol Endocrinol* **4**: 227-234
52. Hodin RA, Lazar MA, Chin WW (1990) *J Clin Invest* **85**: 101-105
53. Zandieh Doulabi B, Platvoetter Schiphorst M, van Beeren HC, Labruyere WT, Lamers WH, Fliers E, Bakker O, Wiersinga WM (2002) *Endocrinology* **143**: 979-984
54. Bradley DJ, Towle HC, Young WS (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 439-443
55. Cook CB, Kakucska I, Lechan RM, Koenig RJ (1992) *Endocrinology* **130**: 1077-1079
56. Yen PM, Sunday ME, Darling DS, Chin WW (1992) *Endocrinology* **130**: 1539-1546
57. Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedinger M, Malaval L, Rousset B, Samarut J (1997) *EMBO J* **16**: 4412-4420
58. Wikstrom L, Johansson C, Salto C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, Forrest D, Thoren P, Vennstrom B (1998) *EMBO J* **17**: 455-451
59. Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willot JF, Sundin V, Roux JP, Malaval L, Hara M, Samarut J, Chassande O (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 4748-4756
60. Abel ED, Boers ME, Pazos-Moura C, Moura E, Kaulbach H, Zakaria M, Lowell B, Radovick S, Liberman MC, Wondisford F (1999) *J Clin Invest* **104**: 291-300
61. Ng L, Hurley JB, Dierks B, Srinivas M, Salto C, Vennstrom B, Reh TA, Forrest D (2001) *Nat Genet* **27**: 94-98
62. Forrest D, Erway LC, Ng L, Altschuler R, Curran T (1996) *Nat Genet* **13**: 354-357
63. Weiss RE, Refetoff S (2000) *Rev Endocr Metab Disord* **1**: 97-108
64. Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J (1999) *EMBO J* **18**: 623-631
65. Salto C, Kindblom JM, Johansson C, Wang Z, Gullberg H, Nordstrom K, Mansen A, Ohlsson C, Thoren P, Forrest D, Vennstrom B (2001) *Mol Endocrinol* **15**: 2115-2128
66. Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 4761-4772
67. Kaneshige M, Suzuki H, Kaneshige K, Cheng J, Wimbrow H, Barlow C, Willingham MC, Cheng S (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 15095-15100
68. Tinnikov A, Nordstrom K, Thoren P, Kindblom JM, Malin S, Rozell B, Adams M, Rajanayagam O, Pettersson S, Ohlsson C, Chatterjee K, Vennstrom B (2002) *EMBO J* **21**: 5079-87
69. Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM, Curran T (1996) *EMBO J* **15**: 3006-3015
70. Ng L, Hurley JB, Dierks B, Srinivas M, Salto C, Vennstrom B, Reh TA, Forrest D (2001) *Nat Genet* **27**: 94-98
71. Kaneshige M, Kaneshige K, Zhu X, Dacc A, Garrett L, Carter TA, Kazlauskaitė R, Pankratz DG, Wynshaw-Boris A, Refetoff S, Weintraub B, Willingham MC, Barlow C, Cheng S (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13209-13214
72. Hashimoto K, Curty FH, Borges PP, Lee CE, Abel ED, Elmquist JK, Cohen RN, Wondisford FE (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3998-4003
73. Gothe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennstrom B, Forrest D (1999) *Genes Dev* **13**: 1329-1341
74. Ng L, Rusch A, Amma LL, Nordstrom K, Erway LC, Vennstrom B, Forrest D (2001) *Hum Mol Genet* **10**: 2701-2708
75. Flamant F, Samarut J (2003) *Trends Endocrinol Metab* **14**: 85-90
76. Itoh Y, Esaki T, Kaneshige M, Suzuki H, Cook M, Sokoloff L, Cheng SY, Nunez J (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9913-9918

77. Forrest D, Reh TA, Rusch A (2002) *Curr Opin Neurobiol* **12**: 49-56
78. Forrest D, Vennstrom B (2000) *Thyroid* **10**: 41-52
79. Brent GA (2000) *Rev Endocr Metab Disord* **1**: 27-33
80. Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennstrom B, Bernal J (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3985-3989
81. Zhang XY, Kaneshige M, Kamiya Y, Kaneshige K, McPhie P, Cheng SY (2002) *Mol Endocrinol* **16**: 2077-2092
82. Baas D, Legrand C, Samarut J, Flamant F (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2907-2911
83. Arpin C, Pihlgren M, Fraichard A, Aubert D, Samarut J, Chassande O, Marvel J (2000) *J Immunol* **164**: 152-160
84. Gloss B, Trost S, Bluhm W, Swanson E, Clark R, Winkfein R, Janzen K, Giles W, Chassande O, Samarut J, Dillmann W (2001) *Endocrinology* **142**: 544-550
85. Gullberg H, Rudling M, Salto C, Forrest D, Angelin B, Vennstrom B (2002) *Mol Endocrinol* **16**: 1767-1777
86. Flamant F, Poguet AL, Plateroti M, Chassande O, Gauthier K, Streichenberger N, Mansouri A, Samarut J (2002) *Mol Endocrinol* **16**: 24-32
87. Potter GB, Beaudoin GM 3rd, DeRenzo CL, Zarrach JM, Chen SH, Thompson CC (2001) *Genes Dev* **15**: 2687-2701
88. Weiss RE, Chassande O, Koo EK, Macchia PE, Cua K, Samarut J, Refetoff S, Refetoff S (2002) *J Endocrinol* **172**: 177-185
89. Weiss RE, Gehin M, Xu J, Sadow PM, O'Malley BW, Chambon P, Refetoff S (2002) *Endocrinology* **143**: 1554-1557
90. Liu YY, Tachiki KH, Brent GA (2002) *Endocrinology* **143**: 2664-2672
91. Yen PM, Chin WW (1994) *Trends Endocrinol Metab* **5**: 65-72
92. Bigler J, Eisenman RN (1995) *EMBO J* **14**: 5710-5723
93. Naar AM, Boutin JM, Lipkin SM, Yu VC, Holloway JM, Glass CK, Rosenfeld MG (1991) *Cell* **65**: 1267-1279
94. Ranjan M, Wong J, Shi YB (1994) *J Biol Chem* **269**: 24699-24705
95. Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM (1991) *Cell* **65**: 1255-1266
96. Perlmann T, Rangarajan PN, Umesono K, Evans RM (1993) *Genes Dev* **7**: 1411-1422
97. Glass CK (1994) *Endocr Rev* **15**: 391-407
98. Burnside J, Darling DS, Chin WW (1990) *J Biol Chem* **265**: 2500-2504
99. Wolffe AP (1997) *Cell Res* **7**: 127-142
100. Perlman AJ, Stanley F, Samuels HH (1982) *J Biol Chem* **257**: 930-938
101. Burke LJ, Banihmad A (2000) *FASEB J* **14**: 1876-1888
102. Ito M, Roeder RG (2001) *Trends Endocrinol Metab* **12**: 127-134
103. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999) *Endocr Rev* **20**: 231-344
104. Rachez C, Freedman LP (2000) *Gene* **246**: 9-21
105. Banihmad A, Kohne AC, Renkawitz R (1992) *EMBO J* **11**: 1015-1023
106. Hu X, Lazar MA (2000) *Trends Endocrinol Metab* **11**: 6-10
107. Urnov FD, Yee J, Sachs L, Collingwood TN, Bauer A, Beug H, Shi YB, Wolffe AP (2000) *EMBO J* **19**: 4074-4090
108. Lee JW, Choi HS, Gyuris J, Brent R, Moore DD (1995) *Mol Endocrinol* **9**: 243-254
109. Sande S, Privalsky ML (1996) *Mol Endocrinol* **10**: 813-825
110. Hu X, Lazar MA (1999) *Nature* **402**: 93-96
111. Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Goch JT, Krishna V, Chatterjee K, Evans RM, Schwabe JW (1999) *Genes Dev* **13**: 3209-3216
112. Heinzl T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR, Seto E, Eisenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1997) *Nature* **387**: 43-48
113. Nagy L, Kao H-Y, Charkravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM (1997) *Cell* **89**: 373-380
114. Alland L, Muhle R, Hou H J, Potes J, Chin L, Schreiber-Augus N, DePinho RA (1997) *Nature* **387**: 49-55
115. Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN (1997) *Cell* **89**: 349-356
116. Nawaz Z, Banihmad C, Burris TP, Stillman DJ, O'Malley BW, Tsai MJ (1994) *Mol Gen Genet* **245**: 724-733
117. Jones PL, Sachs LM, Rouse N, Wade PA, Shi YB (2001) *J Biol Chem* **276**: 8807-8811
118. Guenther MG, Lane WS, Fischle W, Verdin E, Lazar MA, Shiekhattar R (2000) *Genes Dev* **14**: 1048-1057
119. Li J, Wang J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, Wong J (2000) *EMBO J* **19**: 4342-4350
120. Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM (1993) *J Biol Chem* **268**: 305-314
121. Zamir I, Dawson J, Lavinsky RM, Glass CK, Rosenfeld MG, Lazar MA (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14400-14405
122. Nomura T, Khan MM, Kaul S.C., Dong HD, Wadhara R, Colmenares C, Kohno I, Ishii S (1999) *Genes Dev* **13**: 412-423
123. Dressel U, Thormeyer D, Altincicek B, Paululat A, Eggert M, Schneider S, Tenbaum SP, Renkawitz R, Banihmad A (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 3383-3394
124. Burris TP, Nawaz Z, Tsai MJ, O'Malley BW (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9525-9529
125. Banihmad A, Ha I, Tsai MJ, Tsai SY, O'Malley BW (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8832-8836
126. Hadzic E, Desai-Yajnik V, Helmer E, Guo S, Wu S, Koudinova N, Casanova J, Raake BM, Samuels HH (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 4507-4517
127. Shibusawa N, Hashimoto K, Nikrodhanond AA, Liberman MC, Applebury ML, Liao XH, Robbins JT, Refetoff S, Cohen RN, Wondisford FE (2003) *J Clin Invest* **112**: 588-597
128. Lazar M (2003) *J Clin Invest* **112**: 497-499
129. Pfahl M (1993) *Endocrine Reviews* **14**: 651-658
130. Rogatsky I, Zarembler KA, Yamamoto KR (2001) *EMBO J* **20**: 6071-6083
131. Fondel JD, Ge J, Roeder RG (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8329-8333
132. Leo C, Chen JD (2000) *Gene* **245**: 1-11
133. Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1999) *Cell* **97**: 17-27
134. Weiss RE, Xu J, Ning G, Pohlenez J, O'Malley BW, Refetoff S (1999) *EMBO J* **18**: 1900-1904
135. Xu J, Qiu Y, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1998) *Science* **279**: 1922-1925
136. Hong H, Kohli K, Garabedian MJ, Stallcup MR (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 2735-2744
137. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS (1997) *Science* **277**: 965-968
138. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM (1997) *Cell* **90**: 569-580

139. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997) *Nature* **387**: 733-736
140. Sadow PM, Chassande O, Gauthier K, Samaryt J, Xu J, O'Malley BW, Weiss Re (2003) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: 36-46
141. Goodman RH, Smolik S (2000) *Genes Dev* **14**: 1553-1577
142. Li J, O'Malley BW, Wong J (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 2031-2042
143. Yao P, Ku G, Zhou N, Scully R, Livingston DM (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10626-10631
144. Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon HJ, Montminy M, Evans RM (1996) *Nature* **383**: 99-102
145. Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, Evans RM, Nakatani Y, Ozato K (1998) *Genes Dev* **12**: 1638-1651
146. Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG (1998) *Science* **279**: 703-707
147. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) *Cell* **87**: 953-959
148. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1997) *Nature* **389**: 194-198
149. Ogryzko VV, Koatni T, Zhang X, Schlitz RL, Howard T, Yang XJ, Howard BH, Qin J, Nakatani Y (1998) *Cell* **94**: 35-44
150. Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Lee CG, Hurwitz J, Parvin JD, Montminy M (1997) *Cell* **90**: 1107-1112
151. Ito M, Yuan CX, Malik S, Gu W, Fondell JD, Ymamura S, Fu Z-Y, Zhang X, Qin J, Roeder RG (1999) *Mol Cell* **3**: 361-370
152. Rachez C, Gamble M, Chang CP, Atkons GB, Lazar MA, Freedman LP (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 2718-2726
153. Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Naar AM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP (1999) *Nature* **398**: 824-828
154. Ito M, Yuan CX, Okano HJ, Darnell RB, Roeder RG (2000) *Mol Cell* **5**: 683-693
155. Zhang J, Fondell JD (1999) *Mol Endocrinol* **13**: 1130-1140
156. Lee LR, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD (1995) *Nature* **374**: 91-94
157. Chang KH, Chen Y, Chen TT, Chou WH, Chen PL, Ma YY, Yang-Feng TL, Leng X, Tsai MJ, O'Malley BW, Lee WH (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9040-9045
158. Caira F, Antonson P, Pelto-Huikko M, Treuter E, Gustafsson JA (2000) *J Biol Chem* **275**: 5308-5317
159. Ko L, Cardona GR, Chin WW (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6212-6217
160. Lee SK, Anzick SL, Choi JE, Bubendorf L, Guan XY, Jung YK, Kallioniemi OP, Kononen J, Trent JM, Azorsa D, Jhun BH, Cheong JH, Lee YC, Meltzer PS, Lee JW (1999) *J Biol Chem* **274**: 34283-34293
161. Baniahmad A, Leng X, Burris TP, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 76-86
162. Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davidson I, Chambon P, Tota L (1994) *Cell* **79**: 107-1

O inteinach: ich budowie, ewolucji i zastosowaniach

About inteins: their structure, evolution and applications

MARTA SAWCZAK¹, ZOFIA SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Nazewnictwo
 - II-1. Zasady nazewnictwa intein
 - I -2. Zasady nazewnictwa endonukleaz zasiedlających
 - I -3. Reguła numerowania reszt aminokwasowych w inteinie
- III. Występowanie intein
 - III-1. Organizmy, w których występują inteiny
 - III -2. Białka zawierające inteiny
- IV. Zróżnicowanie intein
 - IV-1. Długość intein
 - IV-2. Rodzaje intein
- V. Struktura i ewolucja domeny splicingowej
- VI. Motywy zachowawcze
- VII. Mechanizm splicingu białek
 - VII-1. Przebieg reakcji splicingu drogą klasyczną
 - VII-2. Alternatywna droga splicingu białek
- VIII. Strategie przetrwania intein
 - VIII-1. Rola i wertykalny transfer intein
 - VIII-2. Zasiedlanie
 - VIII-3. Horyzontalny transfer intein
- IX. Rodzina domen Hint
 - IX-1. Białka Hedgehog
 - IX-2. Domeny BIL
- X. Zastosowanie intein
 - X-1. Oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa za pośrednictwem intein
 - X-2. Ligacje białek za pośrednictwem intein (IPL)
 - X-3. Metody ligacji wykorzystujące podzielone inteiny
 - X-4. Badanie oddziaływań białko-białko
 - X-5. Układ do indukowanej ekspresji genów
 - X-6. Nowe typy leków inaktywujące inteiny
- XI. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Nomenclature
 - II-1. Convention for naming inteins
 - II-2. Convention for naming homing endonucleases
 - II-3. Nomenclature of amino acids residues positions
- III. Distribution of inteins
 - III-1. Organisms, which contain inteins
 - III-2. Proteins, which contain inteins
- IV. Diversity of inteins
 - IV -1. Intein length
 - IV -2. Intein types
- V. Structure and evolution of splicing domain
- VI. Conserved motifs
- VII. Mechanism of protein splicing
 - VII-1. Standard protein splicing pathway
 - VII-2. Alternative protein splicing pathway
- VIII. Maintenance strategy of inteins
 - VIII-1. Function and vertical transfer of inteins
 - VIII-2. Homing
 - VIII-3. Horizontal transfer of inteins
- IX. Hint domain family
 - IX-1. Hedgehog proteins
 - IX-2. BIL domains
- X. Applications of inteins
 - X-1. Intein-mediated protein purification
 - X-2. Intein-mediated protein ligation (IPL)
 - X-3. Ligation methods based on split inteins
 - X-4. System for detection of protein-protein interactions
 - X-5. System for gene expression induction
 - X-6. Inteins as targets for new types of drugs
- XI. Concluding remarks

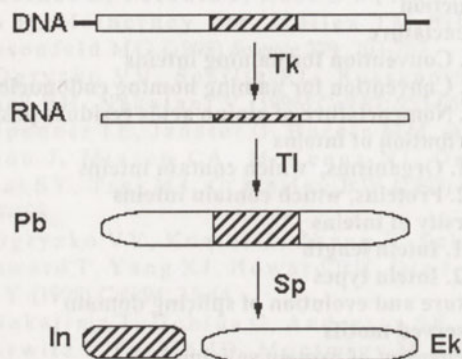
Wykaz używanych skrótów: aa — aminokwas, BIL — bakteryjne domeny podobne do intein (ang. *bacterial intein-like domains*), DNA — kwas deoksyrybonukleinowy, DRR — region rozpoznający DNA (ang. *DNA Recognition Region*), GFP — białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*), IPL — ligacje białek za pośrednictwem intein (ang. *Intein-mediated protein ligation*), RNA — kwas rybonukleinowy, SRR — region rozpoznający sterole (ang. *Sterole Recognition Region*)

¹Lic. studentka IV roku biotechnologii, ²prof. dr hab.; Zakład Ekspresji Genów UAM w Poznaniu, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań; msawczak@op.pl; zofszwey@main.amu.edu.pl

I. Wprowadzenie

Inteiny to występujące wewnątrz białka segmenty, które w potranslacyjnym procesie zwanym splicingiem¹ białek, autokatalitycznie wycinają się z prekursora białkowego. Oskrzydlające inteinę sekwencje białkowe (eksteiny) zostają przy tym połączone wiązaniem peptydowym (Ryc. 1). Powstające w ten sposób białko nie wykazuje więc zmian w sekwencji, strukturze czy aktywności w stosunku do takich samych białek pierwotnie nie zawierających intein [1]. Jako datę odkrycia intein podaje się rok 1990, kiedy to dwa zespoły badawcze, niezależnie od siebie, doniosły o istnieniu białek ule-

gających splicingowi. Co ciekawe, w obu przypadkach opisano obecnie najlepiej poznaną inteinę — *Sce* VMA1, występującą w podjednostce wakuolarniej H⁺ATP-azy u *Saccharomyces cerevisiae* [2, 3]. Nazwa „inteina” została utworzona ze słów „wewnętrzna (ang. *IN*ternal) proTEINA”, a oskrzydlające inteinę sekwencje aminokwasowe nazwano „zewnątrznymi (ang. *EX*ternal) proTEINAMI” czyli „eksteinami”. Eksteiny połączone z N- lub C-końcem inteiny to odpowiednio: N- i C-eksteiny, a powstające bezpośrednio po translacji białko nazywane jest prekursorem białkowym [1, 4].



Ryc. 1. Schemat splicing białek. Tk — transkrypcja, Tl — translacja, Sp — splicing białek, Pb — prekursor białkowy, In — inteina, Ek — połączone eksteiny

II. Nazewnictwo

II-1. Zasady nazewnictwa intein

Pierwszą część nazwy inteiny tworzy trzyliterowy skrót nazwy gatunkowej organizmu gospodarza, drugą częścią jest skrócona nazwa genu, w którym inteina została znaleziona. Jeżeli w danym genie występuje więcej niż jedna inteina, to dodatkowo dodaje się im numery licząc od N-końca eksteiny, lub też w zależności od kolejności odkrywania [1]. Dla przykładu, *Tfu* Pol-2 oznacza drugą inteinę z polimerazy DNA *Thermococcus fumicolans* [5].

II-2. Zasady nazewnictwa endonukleaz zasiedlających (ang. *homing endonuclease*)

Wiele intein zawiera domenę endonukleazową i w związku z tym otrzymało również nazwę wynikającą

z nazewnictwa endonukleaz zasiedlających [4, 6]. Endonukleazy zasiedlające występują także w intronach (mają wtedy przedrostek I) oraz w otwartych ramkach odczytu (ich nazwa zaczyna się wtedy od litery F). Dla odróżnienia od nich inteiny–endonukleazy otrzymały przedrostek PI, po którym następuje trzyliterowy skrót nazwy gatunkowej i rzymska liczba określająca kolejność odkrywania intein w danym organizmie [6]. Wspomniana już inteina z *Saccharomyces cerevisiae* nosi nazwę PI *Sce* I [5].

II-3. Reguła numerowania reszt aminokwasowych w inteinie

Reszty aminokwasowe w inteinie numerowane są kolejno, począwszy od końca aminowego do końca karboksylowego inteiny. Ostatnia reszta aminokwasowa eksteiny przylegająca do N-końca inteiny oznaczana jest jako -1, a dalsze odpowiednio -2, -3... Pierwsza reszta aminokwasowa C-eksteiny występuje w pozycji +1 [7].

III. Występowanie intein

III-1. Organizmy, w których występują inteiny

Internetowa baza danych o inteinach — INBase (<http://www.neb.com/neb/inteins.html>) dostarcza informacji o wszystkich opisanych do tej pory inteinach. Ponad 160 znanych intein znaleziono w 38 różnych typach białek, przy czym wykazano, że niektóre białka zawierają po kilka intein [5]. Geny intein zintegrowane w tym samym miejscu w ortologicznych genach (czyli genach homologicznych występujących w różnych gatunkach, których produkty pełnią identyczną lub podobną funkcję) nazywane są allelami (a kodowane przez nie inteiny allelicznymi) [8]. Inteiny występują u różnorodnych eubakterii, archebakterii oraz nielicznych eukariontów (u 15 gatunków jednokomórkowych grzybów i w plastydach trzech gatunków glonów). Zidentyfikowano je również w białkach trzech bakteriofagów i jednego wirusa eukariotycznego (Tab.1). Nie odnaleziono jednak genów intein w żadnym z zsekwencjonowanych genomów jądrowych wielokomórkowych organizmów, a splicing inteiny z owadziego wirusa *Chilo iride-*

¹Słowo to jest oryginalnie pochodzenia holenderskiego i związane jest z pewnego rodzaju węzłem żeglarskim. Zaplatanie i rozplatanie tego węzła przypomina splicing intronów (i intein). Ani polskie słowo „składanie”, ani „wycinanie” nie odzwierciedlają w pełni tego procesu, dlatego wzorem wydania polskiego podręcznika „Biochemia” L. Stryera (PWN, 2003) w artykule tym stosować będziemy termin „splicing”.

scent stanowi jedyny przypadek splicingu białek naturalnie przebiegającego w cytoplazmie wielokomórkowców [9, 10]. Rozpowszechnienie i różnorodność intein w komórkach różnorodnych eukariontów są ograniczone zarówno pod względem liczby jak i gatunków gospodarzy. Odmienną sytuację obserwuje się u *Prokaryota*, przy czym to archebakterie wydają się szczególnie „bogate” w inteiny [5]. Widoczne staje się to zwłaszcza wtedy, gdy porówna się genomy w pełni zsekwencjonowane (Tab. 1) [5, 11]. W

Tabela 1

Liczba intein w poszczególnych jednostkach taksonomicznych (j.t.). Do *Eukaryota* i *Eubacteria* wliczono inteiny występujące w genomach wirusów infekujących organizmy z tych grup. ¹Pierwsza liczba mówi o liczbie gatunków, liczba w nawiasie uwzględnia także podział na szczepy, ² liczba genomów zsekwencjonowanych i zawierających inteiny w stosunku do liczby wszystkich w pełni zsekwencjonowanych genomów w danej jednostce taksonomicznej.

Nazwa j.t.	l. alleli	l. intein	l. gatunków ¹	l. g. zsekw. ²
<i>Eukaryota</i>	5	20	19 (20)	1/10 (10%)
<i>Eubacteria</i>	15	59	34 (40)	11/127 (9%)
<i>Archaeobacteria</i>	34	84	17 (18)	9/16 (56%)
Ogółem	51	163	70 (78)	21/153 (14%)

genomach kilku organizmów gatunków *Archaeobacteria* znaleziono po kilkanaście (najwięcej 19) genów intein, podczas gdy u eubakterii maksymalna ich liczba wynosi 4 [5].

III.2 Białka zawierające inteiny

Białka, w których występują inteiny, pełnią różnorodne funkcje. Są to na przykład: enzymy podstawowego metabolizmu, proteazy, H⁺ATP-azy, reduktazy rybonukleotydowe, polimerazy DNA i RNA, topoizomery, czynniki replikacyjne i inne [9]. Zdecydowana większość tych białek związanych jest jednak z metabolizmem kwasów nukleinowych [12]. Teoria tłumacząca tę tendencję opiera się na specyfice procesu zasiedlania (ang. *homing*) oraz transferu horyzontalnego i omówiona zostanie w części poświęconej tym zjawiskom. Wspólną cechą wszystkich białek, w jakich występują inteiny jest to, że są to białka kluczowe dla przeżycia i rozmnażania organizmu gospodarza [13]. Podobnie nieprzypadkowe są miejsca integracji intein. W białkach najczęściej zajmują one rejony zachowawcze, takie jak miejsca aktywne enzymów, czy miejsca wiązania ligandów [14]. Cechy te zapewniają skuteczność transferu wertykalnego, o którym także mowa będzie w dalszej części artykułu. Niealleliczne miejsca integracji nie wykazują cech wspólnych poza resztami cysteiny, seryny lub treoniny w pozycji +1 C-eksteiny [13].

IV. Zróźnicowanie intein

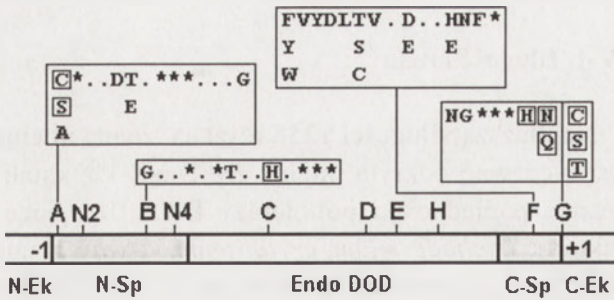
IV-1. Długość intein

Najdłuższą, długości 1258 reszt aa, znaną inteiną jest niedawno odkryta inteina *Tre DnaE-1* z katalitycznej podjednostki polimerazy DNA III cyjanobakterii *Trichodesmium erythraeum*. Zawiera ona nietypowe, nieobecne w innych inteinach, 17-krotnie tandemowo powtórzone 57-aa sekwencje (ich rola

nie została jeszcze określona, ale sugeruje się, że mogą one regulować syntezę *DnaE in vivo*) [15]. Długość pozostałych intein waha się pomiędzy 134 i 608 resztami aminokwasowymi, przy czym typowo mają one długość 400-500 aa [5].

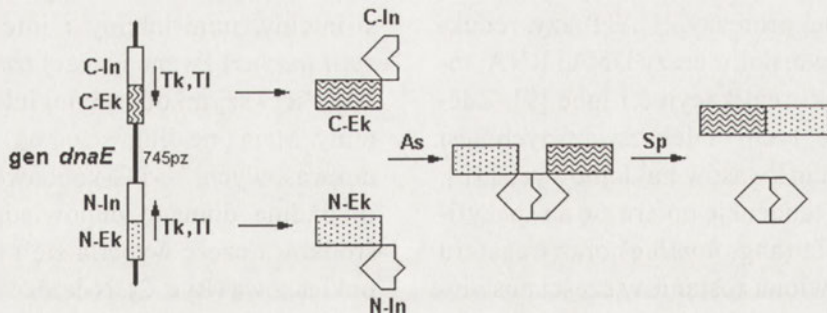
IV-2. Rodzaje intein

Wśród intein można wyróżnić trzy grupy: maxi-inteiny, mini-inteiny i inteiny podzielone (ang. *split inteins*) zwane inaczej *trans*-splicingowymi [7, 13]. Pierwszymi odkrytymi inteinami były maxi-inteiny. Mają one długość od ok. 300 do 600 reszt aminokwasowych. N- i C-końcowe fragmenty tych intein budują domenę odpowiedzialną za splicing, a środkowa część wypętla się i tworzy domenę endonukleazową (Ryc. 2). N-końcowa część domeny splicingowej ma długość ok. 100 reszt aminokwasowych, a C-końcowa część jest krótsza i składa się z mniej niż 50 reszt aa [5]. Z wyjątkiem kilku maxi-intein o domenach endonukleazowych typu HNH (nazwa pochodzi od występujących w ich sekwencji zgodnej dwóch par His okalających Asn), wszystkie pozostałe maxi-inteiny zawierają tzw. DOD-endonukleazy (zwane też LAGLIDADG od kolejnych reszt aminokwasowych w sekwencji zgodnej złożonego z 12 (gr. *dodeka*) reszt motywu zachowawczego). Domenę tę można usunąć (na poziomie genowym) bez umniejszania zdolności inteiny do splicingu. W taki właśnie sposób stworzono



Ryc. 2. Budowa prekursora białkowego, zawierającego maxi-inteinę o domenie endonukleazowej typu DOD, z zaznaczonymi miejscami występowania motywów zachowawczych (A, N2, B, N4, C, D, E, H, F, G) i sekwencjami zgodnymi najważniejszych z nich (użyto standardowych oznaczeń reszt aminokwasowych, . — dowolna reszta aa, * — reszta hydrofobowa, kluczowe dla przebiegu reakcji splicingu reszty aa objęto ramką). N-ek i C-ek - N- i C-eksteiny, N-Sp i C-Sp — odpowiednio N- i C-końcowa część domeny splicingowej, Endo DOD — domena endonukleazowa

pierwszą mini-inteinę [18], a wkrótce po tym odkryto jedną z naturalnie występujących mini-intein [19]. Mini-inteiny mają długość od 130 do 200 reszt aminokwasowych. N- i C-końcowe fragmenty tych intein łączy różnej długości łącznik [5]. Po jego usunięciu okazało się, że powstałe przez to dwie oddzielne części asocjują razem i nadal zdolne są do przeprowadzenia reakcji splicingu [20]. Niektóre z uzyskanych w ten sposób sztucznie podzielonych intein, muszą zostać poddane denaturacji, a następnie rena-



Ryc. 3. Schemat *trans*-splicingu naturalnie występującej inteiny *Ssp DnaE*. Tk — transkrypcja, Tl — translacja, N-In i C-In — C- i N-końcowe części inteiny, N-ek i C-ek — C- i N-eksteiny, As — asocjacja obu części inteiny, Sp — splicing białek

turacji dla odzyskania pełnej aktywności [21]. Nie lada sensacją było odkrycie naturalnie występującej podzielonej inteiny *Ssp DnaE* z *Synechocystis* sp. szczep PCC 6803. W komórkach tego szczepu dwie części genu podjednostki α polimerazy DNA III oddzielone są liczącym 745 par zasad odcinkiem i zorientowane na nici w przeciwnych kierunkach. Jeden fragment powstającego białka połączony jest z C-końcową częścią inteiny, a drugi z N-końcową. Asocjacja obu części inteiny i następujący po niej *trans*-

splicing odtwarza w pełni funkcjonalną polimerazę (Ryc. 3) [22].

V. Budowa i ewolucja domeny splicingowej

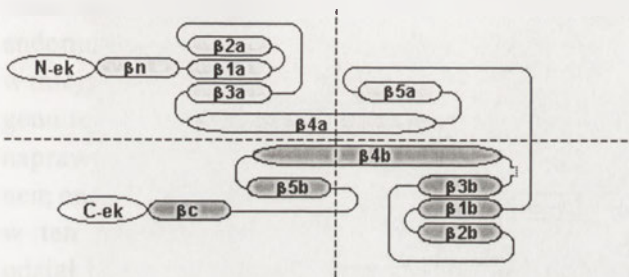
Większość intein składa się z dwóch domen ulegających zwinięciu całkowicie niezależnie od siebie [5]. Domena endonukleazowa nie uczestniczy w procesie splicingu [18]. Najprawdopodobniej została nabyta w trakcie ewolucji w późniejszym okresie (wskazuje na to fakt rozpowszechnienia endonukleaz zasiedlających w przyrodzie [6]) i to niejednokrotnie (czego dowodem jest choćby występowanie wśród intein dwóch typów endonukleaz zasiedlających [16]) [12]. Mini-inteiny składają się wyłącznie z domeny splicingowej (ale uważa się, że nie reprezentują one pierwotnego typu intein, lecz raczej są maxi-inteinami, które domenę endonukleazową utraciły [12]). Charakterystycznym motywem budowy domeny splicingowej jest 12 elementów typu β -kartki (Ryc. 4). Interesującą cechą tej struktury jest to, że składa się ona z dwóch niemal identycznych subdomen. Uważa się, że powstały one przez tandemową duplikację jednego pierwotnego genu. Pionowa linia na rycinie 4 dzieli dwie subdomeny, podczas gdy linia pozioma wskazuje zduplikowane sekwencje. Dwie końcowe, antyrównoległe struktury β -kartki — β_n i β_c tworzą złącza splicingowe (ang. *splice junction*) inteiny. Domena endonukleazowa wciśnięta jest w inteinie pomiędzy elementy

β_3b i β_4b , w tym też miejscu występuje przerwa w podzielonej inteinie *Ssp DnaE* (Ryc. 4) [12, 23, 24]. W przypadku dwóch maxi-intein, których strukturę krystaliczną ustalono, w ich domenie splicingowej występują też dodatkowo domeny wiążące DNA zwane regionami rozpoznającymi DNA (ang. *DNA Recognition Region, DRR*). Region DRR inteiny PI *Sce* występuje pomiędzy motywami zachowawczymi N3 i N4 [23], w inteinie PI *Pfu* usytuowany jest on natomiast tuż za domeną endonukleazową [25] (wy-

daje się, że właśnie ta lokalizacja jest bardziej typowa dla reszty intein) [5].

VI. Motywy zachowawcze

Choć niealleleliczne inteiny wykazują niewielkie podobieństwo pod względem sekwencji aminokwasowej, w miarę poznawania kolejnych i porównywania ich sekwencji udało się zidentyfikować 6 motywów zachowawczych występujących we wszystkich inteinach (plus dodatkowe 4 charakterystyczne dla domeny endonukleazowej typu DOD) (Ryc. 2) [1, 26-28].



Ryc. 4. Struktura domeny splicingowej (wg. wzoru z [4]). Linia kropkowaną zaznaczono miejsce występowania ewentualnej domeny endonukleazowej lub miejsce podziału *trans*-splicingowej inteiny. Reszta opisu w tekście. N-ek i C-ek - N- i C-eksteiny

Motywy zachowawcze intein noszą podwójne nazwy. Pierwotne nazewnictwo (A, B, C, D, E, F, G, H) wprowadzono w 1994 roku [1], drugi zaś sposób nazywania (N1, N2, N3, N4, EN1, EN2, EN3, EN4, HNH, C1, C2) zaproponowano w roku 1998 po odkryciu dwóch dodatkowych motywów [28]. Blok A (N1) na aminowym końcu inteiny zawiera resztę cysteiny lub seryny — reszty aminokwasowe o nukleofilowych łańcuchach bocznych, odgrywające kluczową rolę w inicjacji reakcji splicingu. Dużym zaskoczeniem było odkrycie w tym miejscu, w przypadku dwóch intein, reszty alaninowej (która nie zawiera reaktywnej grupy OH ani SH) [29]. Doprowadziło to do sformułowania alternatywnej drogi splicingu białek [30]. W bloku B (N3) szczególnie zachowawczą resztą aminokwasową jest reszta histydyny (wyjątkowo zastępowana przez resztę treoniny), która asystuje reakcjom na N-końcowym złączu splicingowym. Motywy N2 i N4 są mniej zachowawcze i zostały zidentyfikowane dużo później niż reszta [28]. Bloki C, D, E i H (EN1, EN2, EN3, EN4) to zachowawcze motywy endonukleaz zasiedlających rodziny DOD (LAGLIDADG). Mini-inteiny nie mają tych bloków, a inteiny o domenach endonukleazowych typu HNH zawierają motyw o nazwie HNH.

Blok F (C2) ułatwia przebieg splicingu w C-końcowym złączu splicingowym. Blok G (C1) tworzy C-końcowe złącze splicingowe. C-koniec inteiny buduje dwupeptyd histydyna — asparagina lub histydyna — glicyna. Do bloku G zalicza się też drugą z kluczowych nukleofilowych reszt aminokwasowych, czyli występującą na pozycji +1 w C-eksteinie resztę cysteiny (najczęściej), seryny lub treoniny. Przedostatnia reszta aa inteiny — histydyna katalizuje cyklizację asparaginy (lub rzadziej glicyny) i C-końcowe rozcięcie.

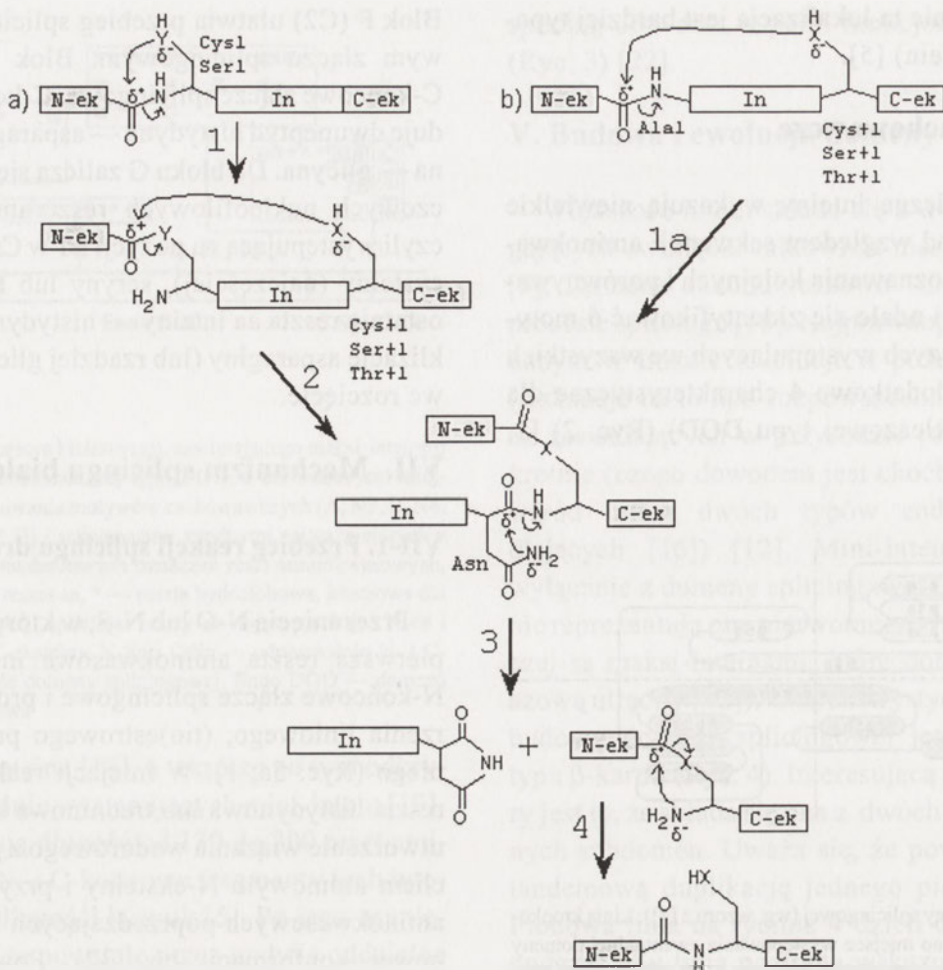
VII. Mechanizm splicingu białek

VII-1. Przebieg reakcji splicingu drogą klasyczną

Przesunięcie N-O lub N-S, w którym bierze udział pierwsza reszta aminokwasowa inteiny, aktywuje N-końcowe złącze splicingowe i prowadzi do utworzenia liniowego, (tio)estrowego produktu pośredniego (Ryc. 5a, 1). W inicjacji reakcji uczestniczy reszta histydynowa lub treoninowa bloku B poprzez utworzenie wiązania wodorowego z głównym łańcuchem atomowym N-eksteiny i przytrzymanie reszt aminokwasowych poprzedzających inteinę w nietypowej konformacji *cis* [32]. Powstałe wiązanie (tio)estrowe ulega rozszczepieniu podczas nukleofilowego ataku grupy hydroksylowej seryny, czy treoniny lub tiolowej cysteiny, zlokalizowanej na aminowym końcu C-eksteiny (Ryc. 5a, 2). W wyniku tej transestryfikacji N-eksteina ulega przemieszczeniu do łańcucha bocznego atakującej reszty aminokwasowej, tworząc rozgałęziony produkt pośredni. Cyklizacja C-końcowej asparaginy, w wyniku której powstaje imid kwasu bursztynowego, prowadzi do hydrolizy wiązania peptydowego między inteiną i C-eksteiną (występująca w niektórych inteinach w miejsce asparaginy glicyna też jest zdolna do cyklizacji) (Ryc. 5a, 3). Poprzedzająca asparaginę reszta histydyny uczestniczy w cyklizacji i C-końcowym rozcięciu przez utworzenie wiązania wodorowego z tlenem grupy karbonylowej Asn, czyniącym to wiązanie peptydowe bardziej ruchliwym [31]. Imid kwasu bursztynowego w oddzielonej już inteinie ulega hydrolizie do asparaginy lub izoasparaginy. Spontaniczne przesunięcie O-N lub S-N prowadzi do utworzenia wiązania peptydowego między eksteinami (Ryc. 5a, 4) [5, 7, 31].

VII-2. Alternatywna droga splicingu białek

Inteiny, których pierwszą resztą aminokwasową jest alanina, a więc nie posiadające nukleofilowej



Ryc. 5. Mechanizm splicingu białek. a) Przebieg reakcji splicingu drogą klasyczną, 1 — przesunięcie N-O lub N-S (X, Y — atom O lub S), 2 — transestryfikacja, 3 — cyklizacja asparaginy, 4 — przesunięcie O-N lub S-N b) Alternatywna droga splicingu białek, 1a — bezpośredni atak nukleofilowy +1 reszty aa, δ^+ , δ^- — odpowiednio: cząstkowy ładunek dodatni, ujemny.

grupy hydroksylowej lub tiolowej na N-kończym złącze splicingowym, nie są zdolne do utworzenia rozgałęzionego produktu pośredniego na drodze klasycznego mechanizmu. Rozgałęziony produkt pośredni powstaje tu poprzez bezpośredni atak zlokalizowanego na N-końcu C-eksteiny nukleofilu (reszty seryny, cysteiny lub treoniny) (Ryc. 5b, 1a). Jednak badane wcześniej inteiny, w których metodą ukierunkowanej mutagenyzy zastąpiono N-kończącą resztę aminokwasową, zawierającą nukleofilową grupę, inną resztą nie posiadającą takiej grupy, nie były zdolne do splicingu. Struktura krystalograficzna inteiny *Sce* VMA1 wskazuje, że w tym przypadku +1Cys leży za daleko, by przeprowadzić bezpośredni atak nukleofilowy na N-końcowe złącze splicingowe [5, 7, 30].

VIII. Strategie przetrwania intein

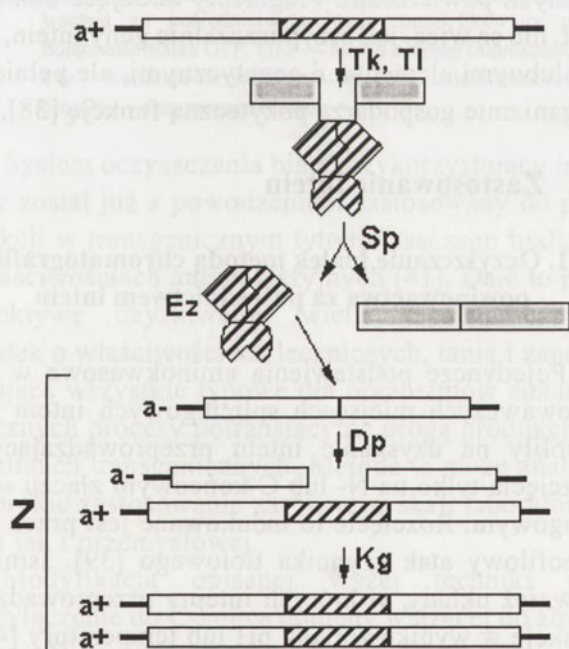
VIII-1. Rola i wertykalny transfer intein

Powstający bezpośrednio po translacji prekursor białkowy jest formą nieaktywną, splicing białek

mógłby być więc mechanizmem regulującym ekspresję białka zawierającego inteinę. Z dotychczasowych badań wynika, że, z wyjątkiem podzielonej inteiny *Ssp* DnaE [22] i potencjalnie funkcjonalnej inteiny *Tre* DnaE-1 z *Trichodesmium erythraeum* [15], inteiny nie pełnią jednak żadnej funkcji w organizmie gospodarza. Ze względu na szybkość wycinania się, nie wydaje się również, aby były szkodliwe. Presja selekcyjna skierowana przeciw obecności intein jest więc niewielka, aczkolwiek prawidłowość i skuteczność splicingu musi podlegać ścisłej selekcji [9]. Geny intein są więc prawdopodobnie przykładem tzw. „samolubnego DNA” [13]. Inteiny, jak już wcześniej wspomniano, zajmują w białkach miejsca ważne z punktu widzenia ich funkcji. Biorąc pod uwagę, że występują one w istotnych dla komórki białkach, usunięcie sekwencji nukleotydowej genu inteiny z genu gospodarza musiałoby być niezwykle precyzyjne — każda insercja lub delecja blokowałaby funkcję przyszłego białka. Powyższe fakty wskazują na prawdopodobną, wysoką skuteczność wertykalnego transferu intein [9].

VIII-2. Zasiedlanie

Większość intein zawiera domenę endonukleaz zasiedlających. Endonukleazy takie charakteryzują się tym, że sekwencje, jakie rozpoznają, są dość długie i najczęściej występują w genomie tylko raz [6, 17]. W inteinach specyficzność wiązania z określoną sekwencją DNA zapewniają dodatkowo regiony rozpoznające DNA (DRR) [23, 25]. Cecha ta związana jest bezpośrednio z istotą procesu zasiedlania. Zasiedlanie jest to przemieszczanie ruchomego elementu genetycznego do pokrewnego „pustego” allelu, nie zawierającego tego elementu, w wyniku czego dochodzi do jego duplikacji (Ryc. 6). Mechanizm tego zjawiska opiera się na przecinaniu przez endonukleazę zasiedlającą „pustego” allelu (allelu⁻) w miejscu ściśle odpowiadającym miejscu integracji genu tej endonukleazy w drugim allelu. Matrycą dla naprawy rozszczepionej nici DNA staje się allel z genem endonukleazy (allel⁺) [6, 17]. W zainicjowanym w ten sposób procesie konwersji genowej biorą udział białka uczestniczące w naprawie i replikacji DNA [12].



Ryc. 6. Schemat procesu zasiedlania (Z). Tk — transkrypcja, Tl — translacja, Sp — splicing białek, Ez — endonukleaza zasiedlająca, Dp — powstanie dwuniciowej przerwy, Kg — konwersja genowa, a⁺ — allel genu zawierającego region kodujący inteinę, a⁻ — allel genu nie zawierającego regionu kodującego inteinę.

Zasiedlanie prowadzi do szybkiego rozprzestrzeniania się ruchomych elementów genetycznych, skutkiem czego allele⁺ zostają utrwalone w populacji. W tym momencie presja selekcyjna przestaje działać i domena endonukleazowa degeneruje. Na skutek przypadkowych mutacji dochodzi do zmian w

strukturze tej domeny, prowadzących do jej inaktywacji, a nawet utraty. W przypadku intein zjawisko to może zająć o tyle łatwo, że nie umniejsza ono w niczym zdolności intein do splicingu [18, 13]. Część intein wydaje się zawierać nieaktywne domeny endonukleazowe [5], uważa się też, że mini-inteiny pochodzą od maxi-intein, które takie domeny utraciły (wskazuje na to fakt występowania tych samych alleli mini-intein u niespokrewnionych bliżej gatunków) [12]. Wspomniano już, że inteiny szczególnie często znajduje się w białkach związanych z metabolizmem kwasów nukleinowych. Geny takich białek (a wraz z nimi fragmenty kodujące inteiny), ulegają ekspresji podczas naprawy DNA i podziałów komórki. W okresie tym w komórce znajdują się wszystkie białka niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu zasiedlania, więc potencjalnie niebezpieczne dwuniciowe rozszczepienie DNA gospodarza może być szybko i skutecznie naprawione [12]. Dla samolubnych elementów genetycznych wykazujących aktywny mechanizm rozprzestrzeniania Gogarten [13] proponuje się wprowadzić nazwę „pasożytniczy DNA”.

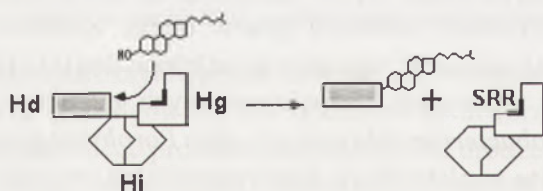
VIII-3. Horyzontalny transfer intein

Inteiny alleliczne, charakteryzujące się takimi samymi miejscami integracji, wykazują znacznie większe wzajemne podobieństwo, niż w stosunku do pozostałych intein [5]. W dużej mierze jest to skutek wertykalnego transferu genów intein. Zauważono jednak obecność tego samego allelu w DnaB helikazie u tak wysoce niespokrewnionych gatunków jak *Mycobacterium tuberculosis*, glon *Porphyrea purpurea* (tu w plastydzie), fotosyntetyzująca cyjanobakteria *Nostoc punctiforme* czy morska, ciepłolubna, heteroautotroficzna bakteria *Rhodothermus marinus* [5, 33]. Są to niezbite przykłady horyzontalnego transferu intein. W innym przypadku, bliskie pokrewieństwo wykazują nawet inteiny białek różniących się funkcją — topoizomerazy I z *Pyrococcus furiosus* i gyrazy z *Methanococcus janaschii* (zawierają one jednak wspólny motyw strukturalny, w obrębie którego właśnie znajdują się miejsca integracji obu intein) [34]. Niekiedy podobieństwo między allelicznymi inteinami jest większe niż pomiędzy białkami, w jakich je znaleziono (dotyczy to np. sekwencji aminokwasowej, zawartości par GC, czy wzoru wykorzystania kodonów) [33]. Ponieważ fragmenty kodujące inteiny często występują w genach polimeraz i innych typów białek spotykanych także w genomach wirusowych, możliwe jest, że wirusy służą jako wektory przenoszące inteiny między szczepami bakteryjnymi i gatunkami gospodarzy [12].

IX. Rodzina domen Hint

IX-1. Białka Hedgehog

Po określeniu struktury domeny splicingowej intein za pomocą krystalografii rentgenowskiej okazało się, że przypomina ona strukturę N-końcowej domeny części Hog występującego u *Drosophila* białka Hedgehog. Białko to bierze udział w regulacji rozwoju zarodkowego [24]. Białka podobne do Hedgehog znalaziono u kręgowców, owadów i trzech różnych rodzin nicieni [35]. Składają się one z dwóch części — Hedge i Hog i autokatalizują swoje rozcięcie przez przyłączenie cząsteczki cholesterolu (część Hedge jest cząsteczką sygnałową i przyłączenie cholesterolu umożliwia jej zakotwiczenie w błonie komórkowej) (Ryc. 7) [36, 37]. Pierwszy etap reakcji przeprowadzanej przez domenę splicingową intein i N-końcową domenę części Hog jest identyczny i polega na przekształceniu N-końcowego wiązania peptydowego w reaktywne wiązanie (tio)estrowe [31]. Wiązanie to atakowane jest następnie przez czynnik nukleofilowy. W przypadku intein jest nim grupa OH lub SH pierwszej reszty aminokwasowej C-eksteiny. Natomiast w białkach Hedgehog rolę nukleofilu spełnia hydroksylowa grupa cząsteczki cholesterolu, wiązanej przez region rozpoznający sterole (ang. *Sterole Recognition Region*, *SRR*) C-końco-



Ryc. 7. Schemat reakcji prowadzonej przez białko Hedgehog. Hd — część Hedge, Hg — część Hog, Hi — domena Hint, SRR — region rozpoznający sterole

wej domeny części Hog [36, 37]. Wspomniane już podobieństwo między obydwoimi typami domen nie odnosi się więc jedynie do struktury, ale i do mechanizmu prowadzonej reakcji [14, 24, 28]. Także część motywów zachowawczych domen występujących w białkach typu Hedgehog i w inteinach jest jednako- wa. Ten typ struktury postanowiono więc nazwać domeną Hint (od pierwszych liter nazw: **H**edgehog, **I**NTeina) [24]. Filogenetycznie domena Hint białka Hedgehog może wywodzić się bezpośrednio od domeny splicingowej intein lub też domeny te miały jedynie wspólnego przodka [24]. Występowanie obu domen Hint wskazuje, że ich rozdzielenie nastąpiło przed lub w momencie pojawienia się organizmów wielokomórkowych [9].

IX-2. Domeny BIL

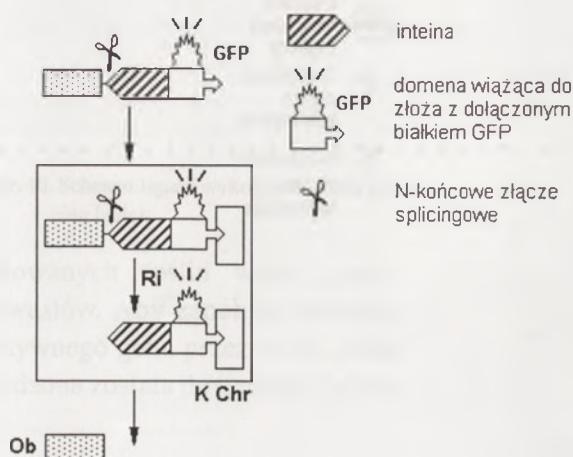
Niedawno doniesiono o odkryciu dwóch nowych typów domen Hint. Oba nowe typy (A i B) mają motywy zachowawcze znanych domen Hint, ale posiadają też dodatkowe, charakterystyczne dla siebie motywy. Nowe domeny mają długość 130-155 reszt aa i zidentyfikowano je *in silico* w ponad 50 różnych białkach obecnych u różnorodnych eubakterii. Nazwano je bakteryjnymi domenami podobnymi do intein (ang. *bacterial intein-like domains*, *BIL*). W odróżnieniu od intein nie występują one w zachowawczych miejscach ważnych białek, nie zawierają też domeny endonukleazowej. Przypuszcza się, że domeny BIL mogą wykazywać szereg aktywności: N- lub/i C-końcowe rozcięcie białka, splicing białek, czy też przyłączanie cząstek różnorodnych nukleofilu (analogicznie do przyłączania cząsteczki cholesterolu do części Hedge przez N-końcową domenę części Hog). Nowe domeny Hint prawdopodobnie (i) biorą udział w dojrzewaniu białek, (ii) służą zwiększeniu ich różnorodności, a także (iii) są jednym ze sposobów umożliwiających bakteriom wiązanie do różnych powierzchni. Fragmenty kodujące domeny BIL nie są więc, jak przypuszczalnie geny intein, samolubnymi elementami genetycznymi, ale pełnią w organizmie gospodarza pożyteczną funkcję [38].

X. Zastosowanie intein

X-1. Oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa za pośrednictwem intein

Pojedyncze podstawienia aminokwasowe w zachowawczych miejscach splicingowych intein pozwoliły na uzyskanie intein przeprowadzających rozcięcie tylko na N- lub C-końcowym złączu splicingowym. Rozcięcie to indukowane jest przez nukleofilowy atak czynnika tiolowego [39]. Istnieją również układy, w których inteiny przeprowadzają reakcję w wyniku zmiany pH lub temperatury [40]. W technice tej docelowe białko łączy się swoim N- lub C-końcem z inteiną. Do takiej inteiny wprowadza się, w miejsce zajmowane przez domenę endonukleazową, domenę mającą powinowactwo do złoża (np. domenę wiążącą chitynę — ang. *chitin binding domain*, *CBD*). Domenę taką można także dołączyć do drugiego końca tej inteiny. Po uzyskaniu ekspresji i lizie komórek, produkty lizy nakłada się na kolumnę. Białka fuzyjne wiążą się ze złożem, a pozostałe białka i zanieczyszczenia wypływają z kolumny. Inkubacja złoża z odczynnikiem tiolowym (lub zmiana warunków temperaturowych, czy też pH) prowadzi

do uwolnienia docelowego białka, wolnego od dodatkowych reszt aminokwasowych (Ryc. 8). System ten pozwala na jednoetapowe oczyszczanie białek i nie wymaga stosowania drogich i sprawiających dodatkowe kłopoty proteaz. Dostępny handlowo system oczyszczania białek za pośrednictwem intein zawierających dołączoną domenę o powinowactwie do złoża nazywa się IMPACT™ i oferowany jest przez firmę New England Biolabs.



Ryc. 8. Schemat oczyszczania białek metodą chromatografii powinowactwa za pośrednictwem intein zmodyfikowanej przez dołączenie białka GFP. GFP — białko zielonej fluorescencji, K Chr — kolumna chromatograficzna, Ri — indukowane rozcięcie, Ob — oczyszczane białko

System oczyszczania białek wykorzystujący inteiny został już z powodzeniem zastosowany do produkcji w transgenicznym tytoniu ssaczego białka o właściwościach antybakteryjnych [41]. Daje to perspektywę uzyskiwania wielu ksenogenicznych białek o właściwościach leczniczych, tanią i zapewniającą wszystkie typowe dla organizmów eukariotycznych procesy potranslacyjne drogą produkcji w roślinach transgenicznych. Metoda ta może znaleźć szerokie zastosowanie zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej.

Modyfikacją opisanej wyżej techniki jest przyłączenie do C-końca domeny wiążącej do złoża, której N-koniec połączony jest z inteiną, białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP). Daje to możliwość monitorowania poziomu ekspresji docelowego białka oraz przewidzenia końcowej wydajności produkcji na podstawie całkowitej fluorescencji komórek [40].

X-2. Ligacje białek za pośrednictwem intein (ang. *Intein-mediated protein ligation, IPL*)

W stosowanej od dawna w inżynierii białkowej natywnej ligacji chemicznej (ang. *native chemical li-*

gation), uzyskiwany syntetycznie peptyd z C-końcowym α -tioestrem reaguje z peptydem zawierającym N-końcową resztę cysteinową. W wyniku chemoselektywnej kondensacji (analogicznej do drugiego etapu splicingu białek) powstaje między nimi wiązanie tioestrowe, a następnie przesunięcie S-N przekształca je w typowe wiązanie peptydowe [42].

Produktem końcowym oczyszczania białek metodą chromatografii powinowactwa za pośrednictwem intein, w obecności reagenta tiolowego, jest peptyd z C-końcowym α -tioestrem. Dzięki tej technice łatwo można tworzyć także polipeptydy z N-końcową cysteiną. Dało to możliwość włączenia do natywnej ligacji chemicznej peptydów uzyskiwanych drogą ekspresji (stąd inna nazwa tej techniki — ligacja białek ulegających ekspresji — ang. *expressed protein ligation, EPL*), a także łączenia ich z syntetycznymi peptydami (Ryc. 9a). Wprowadzane segmenty mogą zawierać różnego typu modyfikacje, reaktywne grupy, znaczniki, czy też nie występujące naturalnie aminokwasy [43].

Techniką IPL udało się włączyć do badanego enzymu syntetyczny moduł złożony z β -aminokwasów, który nadał mu większą stabilność konformacyjną przy zachowanej aktywności [44]. Otwiera to drogę do tworzenia analogów naturalnych białek, w których reszty aminokwasowe, tworzące centrum aktywne, zostałyby zachowane, a komponenty strukturalne wymienione na bardziej stabilne nienaturalne segmenty (można tą drogą stworzyć chemioterapeutyki o dłuższym czasie półtrwania w organizmach żywych).

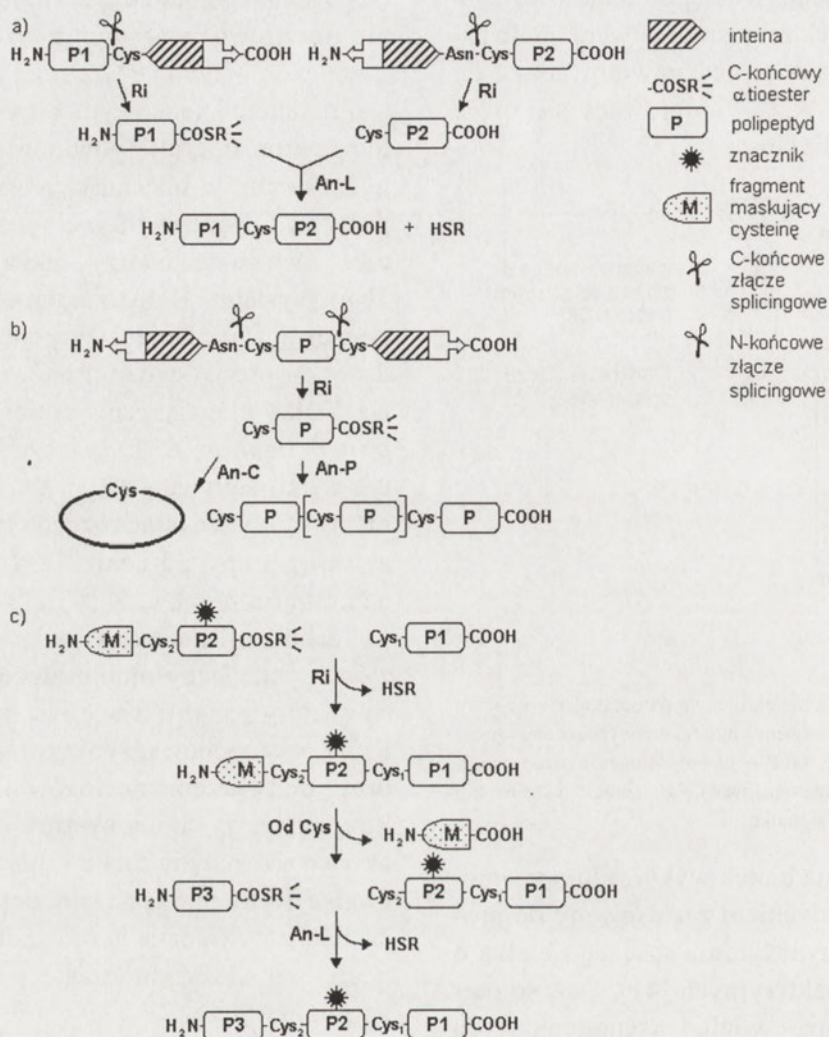
Inną metodą, dzięki której można uzyskiwać bardziej odporne na czynniki fizyczne jak i biologiczne (np. egzoptydazy) białka, jest również wykorzystująca IPL cyrkularyzacja białek. Jeżeli stworzymy peptyd, który będzie miał C-końcowy α -tioester i N-końcową cysteinę, to w rezultacie, zależnie od warunków reakcji, zajdzie jego cyrkularyzacja lub polimeryzacja (Ryc. 9b) [43].

Wielokrotne łączenie różnych peptydów możliwe jest przez dodawanie kolejnych fragmentów do N-końca, począwszy od C-końcowego segmentu białka. Każdy następny blok budujący musi posiadać reaktywny α -tioester na końcu karboksylowym i zamaskowaną cysteinę na końcu aminowym. Cysteinę ujawnia się przez trawienie proteazą lub indukcję rozcięcia przez specjalnie zmodyfikowaną inteinę (Ryc. 9c) [43].

Dzięki tej metodzie można np. do większego białka, zawierającego wiele domen, wprowadzić tylko jedną domenę znakowaną ciężkimi izotopami. Umożliwia to określenie za pomocą spektroskopii

jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) struktury wewnętrznych regionów białka. Stosowanie tej metody ograniczało się dotychczas do niewielkich peptydów, gdyż wraz ze wzrostem ilości znakowa-

ryzowanie więcej niż jednej podzielonej inteiny jednocześnie umożliwia wielokrotną ligację peptydów (Ryc. 10a). Jeżeli zaś obie części *trans*-splicingowych intein przyłączymy do tego samego białka, w



Ryc. 9. Ligacje białek za pośrednictwem intein (IPL): a) schemat IPL b) schemat cyrkularyzacji i polimeryzacji wykorzystujący IPL c) schemat wielokrotnej ligacji różnych peptydów. Ri — indukowane rozcięcie, An — atak nukleofilowy C-końcowego α-tioestru na N-końcową cysteinę prowadzący do L - ligacji, C — cyrkularyzacji, P — polimeryzacji, Od Cys — odsłonięcie cysteiny.

nych reszt aminokwasowych spadała jej rozdzielczość [44].

X-3. Metody ligacji wykorzystujące podzielone inteiny

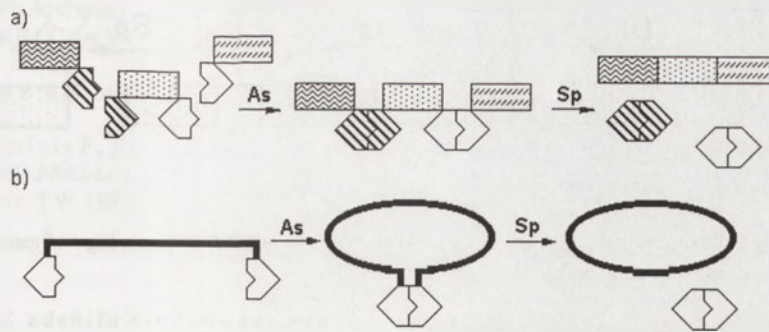
Za pomocą podzielonych intein także można przeprowadzić łączenie białek. Przebiega ono analogicznie do procesu przeprowadzanego przez naturalnie występującą podzieloną inteinę *Ssp DnaE*. Asocjacja dwóch, osobno ulegających transkrypcji, części inteiny aktywuje proces splicingu, rekonstruując z dołączonych do nich dwóch fragmentów jedno białko. W technice tej wykorzystuje się zarówno *Ssp DnaE*, jak i sztucznie stworzone, przez usunięcie domeny endonukleazowej, podzielone inteiny. Wyko-

wyniku splicingu zajdzie jego cyrkularyzacja (Ryc. 10b). W odróżnieniu od technik wykorzystujących IPL produkty końcowe opisanych wyżej metod zawierają w miejscu łączenia nie tylko resztę cysteiny, ale i parę dodatkowych reszt aminokwasowych [7, 43].

Ligacje za pośrednictwem podzielonych intein można przeprowadzić zarówno *in vitro* (jeśli ekspresja transgenów będzie przebiegała w różnych organizmach), jak i *in vivo* (jeśli ekspresja transgenów będzie przebiegała w jednym organizmie). Zastosowanie dwóch genów dla jednego białka u roślin pozwoliłoby „obejść” problemy z ekspresją większych i bardziej złożonych lub toksycznych białek (w tym ostatnim przypadku najlepszym rozwiązaniem jest ligacja *in vitro*) [45].

Ciekawym pomysłem jest wykorzystanie właściwości inteiny *Ssp DnaE* w celu zapobiegania rozprzestrzenianiu transgenów z genetycznie zmody-

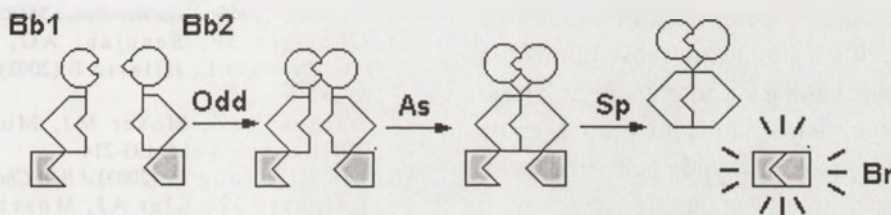
zy), w wyniku czego obserwuje się fluorescencję. Wykorzystywane w tej technice podzielone inteiny mają małe powinowactwo do siebie i splicing białka



Ryc. 10. Schemat ligacji wykorzystujących podzielone inteiny. a) wielokrotnej ligacji, b) cyrkularyzacji. As — asocjacja obu części inteiny, Sp — splicing białek

fikowanych roślin wśród pokrewnych gatunków chwastów. Aby zapobiec przenoszeniu kompletnego aktywnego genu przez pyłek, jedna jego część wprowadzona została do genomu jądrowego (a powstający

reporterowego zachodzi dopiero wtedy, gdy obie połówki inteiny zostaną zestawione razem przez związanie przyłączonych do ich drugiego końca badanych białek (Ryc. 11) [47].



Ryc. 11. Układ do wykrywania oddziaływań białko-białko. Bb1 i Bb2 — badane białka, Br — białko reporterowe, Odd — oddziaływanie między Bb1 i Bb2, As — asocjacja obu części inteiny, Sp — splicing białka reporterowego

z niej konstrukt zawierał sekwencję sygnałową, kierującą do chloroplastu), a druga, uzupełniająca ją, do DNA chloroplastowego. Docelowe białko odtwarzało w chloroplastach *trans*-splicing. W przeprowadzonej próbie docelowym białkiem był enzym dający oporność na herbicyd glifosat i wypadła ona pomyślnie — w ekstrakcie komórkowym z transgenicznymi roślinami obecny był pełnej długości enzym i wykazywały one zwiększoną odporność na herbicyd w stosunku do roślin typu dzikiego [46]. Metoda ta nadaje się do tych gatunków roślin, u których występuje tylko matczyne dziedziczenie plastydów.

X-4. Badanie oddziaływań białko-białko

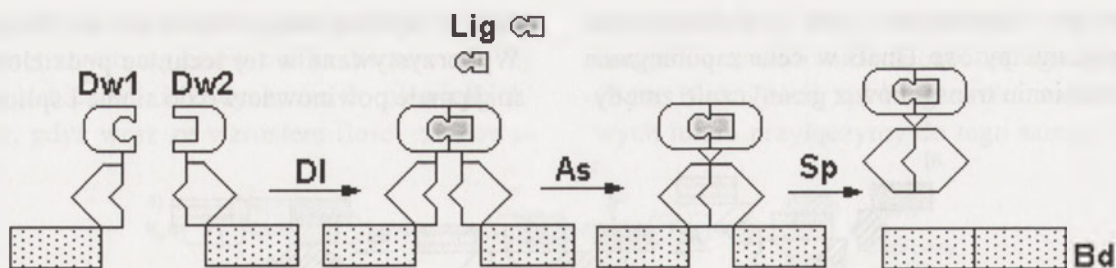
Inteiny podlegające *trans*-splicingowi zastosowano do wykrywania oddziaływań pomiędzy białkami. Tradycyjne systemy dwuhybrydowe opierają się na włączaniu transkrypcji genów reporterowych. Systemy oparte na inteinach bazują na odtwarzaniu struktury białka reporterowego (białka GFP lub lucyfera-

X-5. Układ do indukowanej ekspresji genów

Technika przypomina opisaną wyżej metodę. W miejsce oddziałujących białek wprowadza się dwie różne domeny, mające powinowactwo do jednego z dwóch miejsc znajdujących się w ligandzie. Zamiast białka reporterowego występuje natomiast białko docelowe (Ryc. 12). Odtwarzanie w pełni funkcjonalnego białka po indukcji ligandem następuje w ciągu kilku minut (w odróżnieniu od długości czasu reakcji rzędu kilku godzin w dotychczasowych systemach opartych na włączaniu transkrypcji). Systemy takie pozwalają na regulowaną ekspresję wybranych genów [48].

X-6. Nowe typy leków inaktywujące inteiny

Inteiny znaleziono w białkach chorobotwórczych bakterii — *Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium leprae* oraz pasożytniczych drożdży *Filobasella neoformans*. Ponieważ występują one w



Ryc. 12. Układ, w którym splicing indukowany jest dodaniem ligandu. Dw1 i Dw2 — domeny wiążące, Lig — ligand, DI — dodanie ligandu, As — asocjacja obu części inteiny, Sp — splicing białek, Bd — docelowe białko

białkach ważnych dla przeżycia organizmu gospodarza, więc substancje blokujące splicing mogłyby stać się nowego typu lekami. Leki takie działałyby wybitnie selektywnie — tylko na określony gatunek drobnoustrojów i byłyby całkowicie nietoksyczne dla ludzi [49].

XI. Podsumowanie

Inteiny zaskakują szybkością i skutecznością przeprowadzanej przez siebie reakcji splicingu białek. Wydaje się, że właśnie ta zdolność pozwoliła im przetrwać w komórkach gospodarzy, gdyż (zgodnie z dotychczasowymi badaniami) nic nie wskazuje aby w jakikolwiek sposób sprzyjały ich przeżyciu. Domena splicingowa inteiny stała się wygodnym „schronieniem” dla endonukleaz zasiedlających, czyniąc inteiny ruchomymi elementami genetycznymi. Poznanie intein doprowadziło do odkrycia innych ciekawych członków rodziny domen Hint, do której zalicza się domeny splicingowe intein. Dzięki swym nietypowym właściwościom inteiny znalazły szerokie zastosowanie w biotechnologii i inżynierii białkowej. Wiele technik jest jeszcze w fazie testów, ale ich różnorodność jest naprawdę zdumiewająca. Niedawno w „Science” ukazał się, mówiący m.in. o inteinach, artykuł zatytułowany „Obracanie śmieci w złoto” („Spinning Junk Into Gold”) [50]. Tytuł ten bardzo dobrze obrazuje rolę intein w przyrodzie, jak i ich wartość dla nauki i przemysłu.

Artykuł otrzymano 15 grudnia 2003
Zaakceptowano do druku 27 lutego 2004

Piśmiennictwo

- Perler FB, Davis EO, Dean GE, Gimble FS, Jack WE (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 1125-1127
- Hirata R, Ohsumi Y, Nakano A, Kawasaki H, Suzuki K, Anraku Y (1990) *J Biol Chem* 265: 6726-6733
- Kane PM, Yamashiro CT, Wolczyk DF, Neff N, Goebel M, Stevens TH (1990) *Science* 250: 651-657
- Szweykowska-Kulińska Z, Jarmołowski A (1998) A Ratajczak (red) *Na pograniczu biologii i chemii T.II, cz.1*, Wydawnictwo UAM, Poznań str.67-79
- Perler FB (2002) *Nucleic Acids Res* 30: 383-384 [http://www.neb.com/neb/inteins.html]
- Belford M, Roberts RJ (1997) *Nucleic Acids Res* 25: 3379-3388
- Evans TC, Xu MQ (2002) *Chem Rev* 102: 4869-4883
- Perler FB, Roberts RJ, Adam E (1997) *Nucleic Acids Res* 25: 1087-1093
- Petrokovski S (2001) *Trends Genet* 17: 465-472
- Petrokovski S (1998) *Curr Biol* 8: R634-635
- European Bioinformatics Institute [http://www.ebi.ac.uk/genomes/]
- Liu XQ (2000) *Annu Rev Genet* 34: 61-76
- Gogarten JP, Senejani AG, Zhaxybayeva O, Olendzenski L, Hilario E (2002) *Annu Rev Microbiol* 56: 263-287
- Dalgaard JZ, Moser MJ, Mughey R, Mian IS (1997) *J Comput Biol* 4: 193-214
- Liu XQ, Yang J. (2003) *J Biol Chem* 278: 26315-26318
- Dalgaard JZ, Klar AJ, Moser MJ, Holley WR, Chatterjee A, Mian IS (1997) *Nucleic Acids Res* 25: 4626-4638
- Guhan N, Munipayappa K (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38: 199-248
- Chong S, Xu MQ (1997) *J Biol Chem* 272: 15587-15590
- Telenti A, Southworth M, Alcaide F, Daugelat S, Jacobs WR, Perler FB (1997) *J Bacteriol* 179: 6378-6372
- Mills KV, Lew BM, Jiang S, Paulus H (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3543-3548
- Southworth MW, Adam E, Panne D, Byer R, Kautz R, Perler FB (1998) *EMBO J* 17: 918-926
- Wu H, Hu Z, Liu XQ (1998) *Proc. Natl Acad Sci USA* 95: 9226-9233
- Duan X, Gimble FS, Quijcho FA (1997) *Cell* 89: 555-564
- Hall TM, Porter JA, Young KE, Koonin EV, Beachy PA, Leahy DJ (1997) *Cell* 91: 85-97
- Ichihanagi K, Ishimo Y, Ariyoshi M, Komori K, Morikawa K (2000) *J Mol Biol* 300: 889-901
- Petrokovski S (1998) *Protein Sci* 3: 2340-2350
- Perler FB, Olsen GJ, Adam E (1997) *Nucleic Acids Res* 26: 1741-1748
- Petrokovski S (1998) *Protein Sci* 7: 64-71
- Gorbalenya AE (1998) *Nucleic Acids Res* 26: 1741-1748
- Southworth MW, Benner J, Perler FB (2000) *EMBO J* 19: 5019-5026
- Paulus H (2000) *Annu Rev Biochem* 69: 447-496
- Klabunde T, Sharma S, Telenti A, Jacobs WR, Sacchettini JC (1998) *Nature Struct Biol* 5: 31-36
- Liu XQ, Hu Z (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7851-7856
- Chute IC, Hu Z, Liu XQ (1998) *Gene* 210: 85-92
- Aspöck G, Kagoshima H, Niklaus G, Burglin TR (1999) *Genome Res* 9: 909-923

36. Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH (1996) *Cell* **86**: 21-34
37. Porter JA, Young KE, Beachy PA (1996) *Science* **274**: 255-259
38. Amitai G, Belenkiy O, Dassa B, ShainskaYa A, Pietrokovski S (2003) *Mol, Microbol.* **47**: 61-73
39. Chong S, Mersha FB, Comb DG, Scott ME, Landry D (1997) *Gene* **192**: 271-281
40. Zhang A, Gonzalez SM, Cantor EJ, Chong S (2001) *Gene* **275**: 241-252
41. Morasutti C, De Amicis F, Skerlavaj B, Zanetti M, Marchetti S, (2002) *FEBS Letters* **519**: 141-146
42. Camarero JA, Muir TW (1999) *Curr Protocols Protein Sci* **18.4.1-21**
43. Perler FB, Adam E (2000) *Curr Opin Biotech* **11**: 377-383
44. Arnold U, Hinderaker P, Nilsson BL, Huck BR, Gellman SH, Raines RT (2002) *J Am Chem Soc* **124**: 8522-8523
45. Yang J (2003) *ISB News Report* may 2003 [<http://www.isb.vt.edu>]
46. Chin HG, Kim GD, Marin I, Mersha F, Evans TC Jr, Chen L, Xu MQ, Pradhan S (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4510-4515
47. Ozawa T, Umezawa Y (2001) *Curr Opin Chem Biol* **5**: 578-583
48. Mootz HD, Muir TW (2002) *J AM Chem Soc* **124**: 9044-9045
49. Paulus H (2003) *Front Biosci* **8**: 1157-1165
50. Wickelgren I (2003) *Science* **300**: 1646-1648

Endoglikozydazy i glikoamidazy

Endoglycosidases and glycoamidases

ANNA STYPUŁKOWSKA¹, PIOTR ZWIERZ¹, KRZYSZTOF ZWIERZ²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Substraty endoglikozydaz i glikoamidaz:
 - II-1. O-glikany
 - II-2. N-glikany
 - II-3. Proteoglikany
- III. Występowanie endoglikozydaz i glikoamidaz
- IV. Właściwości niektórych endoglikozydaz i glikoamidaz
- V. Zastosowanie endoglikozydaz i glikoamidaz
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Substrates of endoglycosidases and glycoamidases:
 - II-1. O-glycans
 - II-2. N-glycans
 - II-3. Proteoglycans
- III. Distribution of endoglycosidases and glycoamidases
- IV. Properties of endoglycosidases and glycoamidases
- V. Application of endoglycosidases and glycoamidases
- VI. Concluding remarks

I. Wprowadzenie

Budowę i biosyntezę glikoprotein i proteoglikanów opisano w kilku artykułach opublikowanych wcześniej w Postęпах Biochemii [1-4] oraz Higieny i Medycyny Doświadczalnej [5], dlatego też w niniejszym artykule ograniczymy się do przedstawienia niektórych zagadnień dotyczących funkcji ich reszt cukrowych. Łańcuchy oligosacharydowe glikoprotein wewnątrzkomórkowych zwiększają rozpuszczalność i oporność na denaturację glikoprotein przez pokrycie resztami hydrofilowymi obszarów białka i decydują o kierunku wędrówki glikoprotein, np. reszta mannozo-6-fosforanu oligosacharydu N-acetylo- β -glukozaaminidazy kieruje ją do lizosomów [6]. Łańcuchy oligosacharydowe na powierzchni komórki pełnią rolę „adresu” w procesach rozpoznania biologicznego: podczas rozwoju narządów zarodka [7], różnicowaniu się komórek [7], wędrówki leukocytów [8] oraz w oddziaływaniach między komórkami, a elementami macierzy zewnątrzkomórkowej [9].

W niektórych chorobach genetycznych [5,10] i nabytych np. w chorobie alkoholowej [5] zmieniają się struktury oligosacharydowe glikoprotein. Rosnąca świadomość roli biologicznej i diagnostycznej glikokoniuatów (glikoprotein, glikolipidów, proteoglikanów) stymuluje rozwój technik badawczych oligosacharydów [11]. Obecnie do badania struktur oligosacharydowych glikoprotein są stosowane głównie lektyny [12,13]. Lektyny wprawdzie wykrywają odpowiednie epitopy, ale nie potrafią zlokalizować tych epitopów ani w łańcuchu oligosacharydowym, ani polipeptydowym. Do określenia struktury całych łańcuchów oligosacharydowych i ich lokalizacji w łańcuchu polipeptydowym konieczne jest uwolnienie łańcucha oligosacharydowego z glikoproteiny lub glikopeptydu. Do uwalniania i analizy struktur łańcuchów oligosacharydowych glikoprotein stosuje się egzo- i endoglikozydazy. Egzoglikozydazy zastosowano jako odczynniki w analizie łańcuchów oligosacharydowych [14], jako markery chorób genetycznych oraz uszkodzenia wątroby i nerek [15]. Do zbadania pozostaje potencjalna przydatność endoglikozydaz i glikoamidaz jako markerów diagnostycznych, natomiast wiadomo, że są one pomocne w uwalnianiu oligosacharydów z glikokoniuatów [16]. Glikoamidazy odcinają oligosacharydy od polipeptydów (Ryc. 1), natomiast endoglikozydazy odcinając oligosacharydy od polipeptydów (Ryc. 2) hydrolizują ponadto wiązania glikozydowe

¹Mgr, ²prof. dr hab., Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2a, 15-222 Białystok 8, tel. 48 85 7485691, fax. 48 85 7485416, e-mail: kzwie@amb.edu.pl

w środku łańcuchów oligosacharydowych glikoprotein i proteoglikanów [16,19].

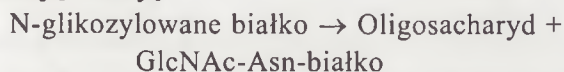
II. Substraty endoglikozydaz i glikoamidaz

II-1. O-glikany

Znane endo-O-glikozydazy odcinają związane O-glikozydowo oligosacharydy struktur rdzeniowych I i II od łańcucha polipeptydowego glikoprotein np. mucyn (Ryc. 1) [20]. Endo- α -N-acetylogalaktozaminidaza D rozcina nienaruszone disacharydy a nie rozszczepia ich pochodnych zawierających kwas sjałowy, obecny powszechnie w glikoproteinach zwierzęcych. Aby ułatwić działanie endogalaktozaminidazy D, należy zatem usunąć kwas sjałowy od O-wiązanych łańcuchów oligosacharydowych. Dostępność oligosacharydów dla O-endoglikozydaz zwiększa denaturacja (np. gotowanie glikoprotein przez kilka minut w 1% SDS). Jednoprocentowy SDS hamuje endo- α -N-acetylogalaktozaminidazę D, zatem przed dodaniem enzymu mieszaninę inkubacyjną należy 10x rozcieńczyć buforem z 1% NP-40 [21].

II-2. N-glikany

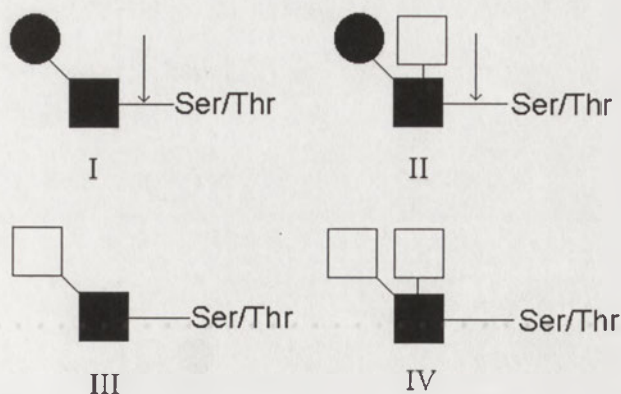
Na rdzeń N-glikanów działają: endo-N-acetylo- β -D-glukozaaminidazy (Ryc. 2-I) i glikoamidazy (Ryc. 2-II). Endo-N-acetylo- β -D-glukozaaminidazy katalizują reakcję:



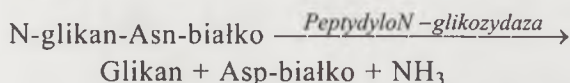
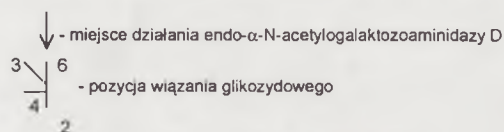
Ze względu na strukturę hydrolizowanego oligosacharydu wydzielono trzy grupy endo-N-acetyloglukozaminidaz (Tab. 1). Endo F₁ i H N-acetyloglukozaminidazy, hydrolizują tylko bogatomannozyne i hybrydowe N-glikany [22]. Nie hydrolizują struktur kompleksowych, di i triantenowych. Endo F₁ i H mają identyczną sekwencję w 32% i bardzo podobne substraty [23]. Endo B, F₂ i F₃ N-acetyloglukozaminidazy hydrolizują diantenowe kompleksowe glikany. Endo F₃ hydrolizuje również triantenowe N-glikany, ale mniej wydajnie niż struktury diantenowe [24]. Trzecią podgrupę tworzy endo-D-N-acetyloglukozaminidaza, która wymaga albo wolnej α -1,3 mannozy na końcu nieredukującym albo struktury typu N-acetylolaktozamininy podstawionej w pozycji C-4. Struktury bogatomannozyne są bardzo słabym substratem dla tego enzymu.

Glikoamidazy (Peptydylo-N-Glikozydazy – PNGazy) (Ryc. 2-II i Tab. 2) hydrolizują wiązanie amidowe między N-aminoglikozydem N-acetylo-

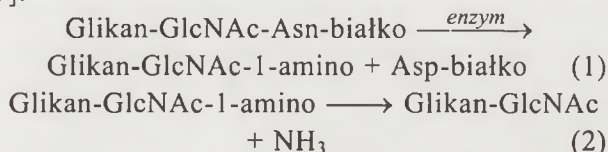
glukozaminy redukującego końca oligosacharydu a grupą kwasową łańcucha bocznego kwasu asparaginowego wbudowanego w łańcuch polipeptydowy glikoproteiny.



Ryc. 1. Struktury korowe najczęściej występujące w O-glikanach [17]. Przedstawione struktury korowe I-IV O-glikanów różnią się rodzajem, ilością i sposobem przyłączenia monosacharydów do GlcNAc wiążącej oligosacharyd z białkiem. Objasnienia:

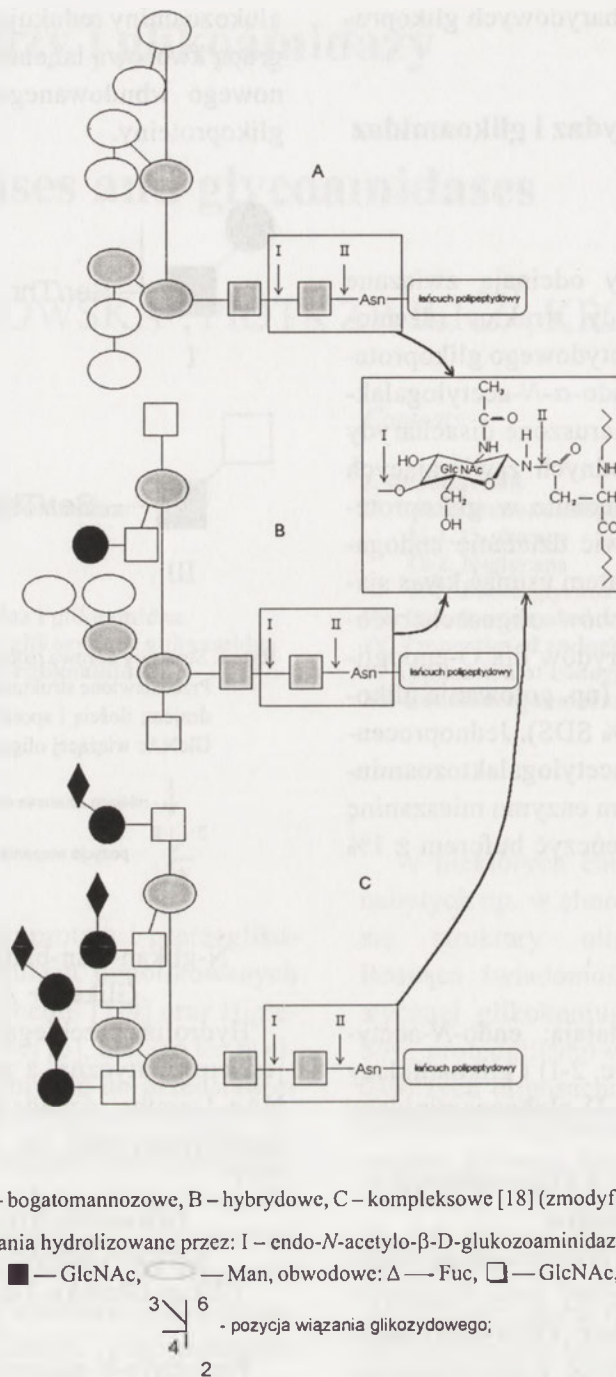


Hydroliza przebiega w dwóch etapach: reakcja (1) jest enzymatyczna, a powstały produkt glikan-GlcNAc-1-amino rozpada się samorzutnie w reakcji (2) nieenzymatycznej na glikan- GlcNAc i amoniak [25].



Peptydylo-N-glikozydazy (PNGaza A, PNGaza F) hydrolizują wszystkie trzy typy N-glikanów [26], przy czym peptydylo-N-glikozydaza A nie zawsze odcina wszystkie oligosacharydy z łańcucha polipeptydowego. Natomiast PNGaza F całkowicie usuwa oligosacharydy ze wszystkich glikoprotein i glikopeptydów [27], tak długo jak końce N- i C-wiążącej asparaginy są związane z peptydem [28].

Minimalna długość łańcucha polipeptydowego dla PNGazy A wynosi 2 aminokwasy (Asn-Phe) na N-końcu łańcucha polipeptydowego [29]. Natomiast dla pełnej aktywności PNGazy F właściwym substratem jest oligosacharyd związany przynajmniej z tripeptydem. Glikopeptyd z oligosacharydem na N-końcu łańcucha polipeptydowego jest lepszym substratem niż oligosacharyd znajdujący się na C-końcu białka [29]. Natomiast wystarczająca struktura oli-



Ryc. 2. N- wiązane oligosacharydy: A – bogatomannozowe, B – hybrydowe, C – kompleksowe [18] (zmodyfikowane). Skróty wyjaśniono w opisie ryciny 1. Objaśnienia: ↓ – wiązania hydrolizowane przez: I – endo-N-acetylo-β-D-glukozaaminidazy, II – glikoamidazy (peptydyl-N-glikozydazy – PNGazy), rdzeniowe: ■ – GlcNAc, ○ – Man, obwodowe: Δ – Fuc, □ – GlcNAc, ○ – Man, ◆ – NeuNAc, ● – Gal

3 6
4 1
2
- pozycja wiązania glikozydowego;

gosacharydu dla aktywności PNGaz A i F to struktura dicukru di-N-N'-acetylochitobiozy [30, 31].

II-3. Proteoglikany

Wiązanie heksozoamidynowe w kwasie hialuronowym i siarczenie chondroityny jest hydrolizowane przez hialuronidazy, endoglikozydazę występującą w leukocytach, komórkach owodni i surowicy [32]. Z kwasu hialuronowego powstają tetrasacharydy o strukturze (GlcUA-1,3-GlcNAc-1,4)₂. Tetrasacharydy te mogą być dalej degradowane przez egzoglikozydazy: β-glukuronidazę i N-acetylo-D-glukozaaminidazę.

III. Występowanie endoglikozydaz i glikoamidaz

Endoglikozydazy występują w roślinach, bakteriach [33-36] i tkankach ssaków [37]. Bogatym źródłem endoglikozydaz jest przesącz z *Flavobacterium meningosepticum*, zawierający: endo F₁, F₂ i F₃ [38, 39] deglikozylujące glikoproteiny o strukturach zestawionych w tabeli 1 [40, 41]. Nie wiadomo, dlaczego *Flavobacterium meningosepticum* i kilka innych bakterii produkuje i wydziela endoglikozydazy, mimo, że N-wiązane oligosacharydy będące substratami tych endoglikozydaz normalnie nie występują w ich otoczeniu [42].

Tabela 1

Substraty endoglikozydaz

Enzym	(↓) hydrolizowane wiązania	optymalne pH
I Endoglikozydaza F ₁ (Endo F ₁)		5.0
II Endoglikozydaza B (Endo B)		5.0-7.0
III Endoglikozydaza D (Endo-β-N-acetylo- glukozaminidaza D)		6.5

Peptydyl-*N*-glikozydazy wykryto w wodnych wyciągach: migdałów [43, 44], fasoli Jaś, soczewicy, grochu (*Pisum sativum*), jęczmienia i surowych zarodków pszenicy. Najwyższą aktywność specyficzną PNGaza F ma w emulsji migdałów oraz w fasoli Jaś [45]. Źródła endoglikozydaz i peptydyl-*N*-glikozydaz zestawiono w tabeli 3.

IV. Właściwości niektórych endoglikozydaz i glikoamidaz

Endoglikozydaza H jest wybitnie trwałym enzymem i nie traci aktywności podczas 48 godzin inkubacji w 37°C, długiego przechowywania w stanie zamrożonym, a także w temperaturze 4°C w obecności

Tabela 2

Substraty glikoamidaz

<p>Peptydylo-N-glikozydaza A (PNGaza A)</p>		4.0-6.0
<p>Peptydylo-N-glikozydaza F (PNGaza F)</p>		7.0-8.0

Tabela 3

Źródła endoglikozydaz i glikoamidaz

ENZYM	ZRODŁO	LITERATURA
Endo-β-N-acetylglikoaminiidaza	Fasola Jaś	[33]
	Jaja kurze	[46]
	Świnia (wątroba, śledziona)	[47]
	Szczur-wątroba	[48, 49]
Endo A	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	[50]
Endo B	<i>Sporotrichum dimorphosorum</i>	[51]
Endo D	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	[34]
Endo F	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	[35, 36]
Endo H	<i>Streptomyces plicatus</i>	[51]
Endo L	<i>Streptomyces plicatus</i>	[51, 52]
Endo M	<i>Mucar heimalis</i>	[53]
Endo S	<i>Dictyostellium discoideum</i>	[54]
Peptydylo-N ⁴ -(N-acetylo-β-gluko- zoamino)-asparagino amidaza		
PNGaza A	Migdały (ang. <i>Almond</i>)	[55]
PNGaza F	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	[35, 36]
PNGaza J	Fasola Jaś (ang. <i>Jack bean meal</i>)	[33]
Endo-β-D-galaktozydaza	<i>Escherichia freundii</i>	[56, 57]
	<i>Clostridium perfringens</i>	[58]
Endo-α-N-acetylogalaktozoamidaza	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	[59]

azydku lub innego środka przeciw bakteryjnego. Jest też odporna na zamrażania i odmrażania. Endo H ma optimum aktywności i stabilności w pH 5-6; przy pH 4 i 8 zatrzymuje jeszcze około 30% maksymalnej aktywności. Jest niewrażliwa na trawienie pronazą, chymotrypsyną lub trypsyną [60]. Gotowanie bez SDS deaktywuje enzym częściowo, a z SDS całkowicie. Dlatego też przed trawieniem glikoprotein denaturowanych SDS-em endo H należy usunąć detergent np. przez filtrację na żelu [61]. Detergenty niejonowe np. Triton X-100 i oktyloglukozyd nie wpływają na aktywność endo H.

PNGaza A w 0,01 % SDS zachowuje tylko 20% aktywności. Jest nie wrażliwa na 0,75 M NaSCN, Triton X-100, NP-40 i mocznik, a w 1,5 M chlorowodoru guanidyny zachowuje około 40% aktywności. EDTA nie wpływa na enzym, a jony: Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} i Cu^{2+} są aktywatorami. Optimum pH PNGazy A wynosi 4-6. PNGaza A jest trwała przez kilka miesięcy w temperaturze 4°C w 10 mM buforze octanowym o pH 5,0 ale przechowywanie w temperaturze -20°C zarówno w obecności 50% glicerolu jak i bez glicerolu, powoduje częściową stratę aktywności [62,63]

PNGaza F jest stabilna przez około 6 miesięcy w temperaturach 4°C lub -70°C, ale nie wytrzymuje zamrażania i odmrażania. Enzym ma masę cząsteczkową 35,5 kDa i optimum pH między 7 i 8. Przy pH 6,5 i 9,5 pozostaje 60%, a w pH 5 i 10 tylko 10% aktywności. Jest niewrażliwy na wysokie stężenie EDTA oraz o-fenantroliny, zachowuje stabilność w 37°C przez 24 h oraz w obecności 2,5 M mocznika, podczas gdy w 5 M moczniku traci ok. 60% swojej aktywności.

V. Zastosowanie endoglikozydaz i glikoamidaz

Egzoglikozydazy i endoglikozydazy stosuje się głównie do uwalniania struktur łańcuchów oligosacharydowych z glikoprotein i ich dalszej analizy. Użycie enzymów do izolacji i badań strukturalnych oligosacharydów glikoprotein jest jedną z najbardziej specyficznych metod, choć niewątpliwie najdroższą. Metody enzymatyczne mają dużą przewagę nad chemicznymi. Chemiczne metody niszczą peptyd przy izolacji łańcuchów cukrowych, oraz degradowują oligosacharyd przy izolacji łańcuchów polipeptydowych. Za pomocą endoglikozydaz z glikoproteiny można otrzymać niezniszczone oligosacharydy i natywne białka [64].

Enzym używany do badania struktury oligosacharydów musi być wolny od aktywności innych gliko-

zydaz, a substrat powinien mieć określoną strukturę (dotyczy to głównie endoglikozydaz). Ilość enzymu wymagana do całkowitego oddzielenia oligosacharydów od łańcucha polipeptydowego zależy od struktury glikoproteiny, stąd ilości enzymu i substratu powinny być wyznaczone doświadczalnie dla każdego przypadku. Zwykle do całkowitej deglikozytacji natywnych glikoprotein trzeba stosować wysokie stężenia enzymów i szczególne warunki reakcji [65]. Denaturacja glikoprotein (np. przez gotowanie w 100°C w obecności 1% SDS) znacznie zwiększa wydajność deglikozytacji [66]. Niejonowe związki (Triton X-100, Nonidet P-40) przeciwdziałają hamowaniu endoglikozydaz przez jonowe detergenty i ułatwiają uwalnianie N-glikanów. Glikopeptydy są bardziej podatne na działanie endoglikozydaz niż natywne lub zdenaturowane glikoproteiny [67].

K ü s t e r i w s p. [68] trawili PNGazą F glikoproteiny w żelu poliakrylamidowym, po rozdziale na SDS-PAGE. Uwolnione oligosacharydy analizowali za pomocą szybkich i czułych technik HPLC i spektrometrii masowej. Wyjściowa ilość materiału (glikoprotein) wynosiła od 1,5 do 15 g i mimo to możliwa była analiza struktur uwolnionych oligosacharydów. Użyteczną metodę rozdzielania oligosacharydów po enzymatycznym uwolnieniu z glikokoniugatów opisali L e e i w s p. [69], którzy na siedem fluorescencyjnie znaczonych oligosacharydów działali endoglikozydazami, a następnie analizowali produkty przy pomocy elektroforezy żelowej.

VI. Uwagi końcowe

Opisano rolę biologiczną i specyficzność substratową [15, 70] oraz zastosowanie analityczne endoglikozydaz i glikoamidaz [16]. Opracowanie prostych, czułych metod oznaczania aktywności endoglikozydaz i glikoamidaz w prawidłowym i patologicznym materiale biologicznym pozostaje wyzwaniem na najbliższą przyszłość.

Artykuł otrzymano 24 kwietnia 2003

Zaakceptowano do druku 22 marca 2004

Piśmiennictwo

1. Palamarczyk G, (1987) *Post Biochem* 33: 297-307
2. Koźma EM, Głowacki A, Olczyk K, Jaźwiec M, (1997) *Post Biochem* 43: 158-172
3. Tomaszewski JJ, Donica H, (1988) *Post Biochem* 34: 209-228
4. Noworytko J, Guzdek A, (1987) *Post Biochem* 33: 65-80
5. Zwierz K, Midro A (1997) *Post Hig Med Dośw* 51: 205-226
6. Hasilig A, Neufeld EF (1980) *J Biol Chem* 255: 4946-4950
7. Priestman DA, Platt FM, Dwek RA, Butters TD (2000) *Glycobiology* 10: iv-vi

8. Lityńska A, Przybyło M, Pocheć E, Laidler P (2002) *Acta Biochim Polon* **49** (3): 643-650
9. Alberts B, Bray D, Levis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publ., New York & London
10. Kościelak J (1999) *Acta Biochim Polon* **46**: 727-738
11. Ichikawa Y, Look GC, Wong CH (1992) *Anal Biochem* **202**: 215-238
12. Ferens-Sieczkowska M, Zwierz K, Midro A, Kątnik-Prastowska I (2002) *Arch Immunol Ther Exp* **50**: 75-81
13. Khan F, Khan RH, Sherwani A, Mohmond S, Afzer MA (2002) *Med Sci Monit* **8**: 293-300
14. Rudd PM, Guile GR, Kuster B, Harvey DJ, Opdenakker G, Dwek RA (1997) *Nature* **388** (6638): 205-207
15. Zwierz K, Zalewska A, Zoch-Zwierz W (1999) *Acta Biochim Polon* **46** (3): 739-757
16. Merry T (1999) *Acta Biochim Polon* **46**: 303-314
17. Zalewska A, Zwierz K, Żółkowski K, Gindzieński A (2000) *Acta Biochim Polon* **47**: 1067-1079
18. Zalewska A, Borzym M, Marcinkiewicz M, Zwierz K (1999) *Magazyn Stomat* **10**: 28
19. Gamian A (1992) *Post Biochem* **38**: 81-87
20. Schachter H (1986) *Biochem Cell Biol* **64**: 163
21. Piller F, Piller V (1993) W: Fukuda M, Kobata A (red) *Glycobiology. A practical approach*, IRL Press, Oxford, str. 291-328
22. O'Neil RA (1996) *J Chromatogr A* **720**: 201-215
23. Van Roey P, Rao V, Plummer TH Jr, Tarentino AL (1994) *Biochemistry* **33**: 13989-13996
24. Tarentino AL, Quinones G, Schrader WP, Changchien LM, Plummer TH Jr (1992) *J Biol Chem* **267**: 3868-3872
25. Kuhn P, Guan Ch, Cui T, Tarentino AL, Plummer TH Jr, Van Roey P (1995) *J Biol Chem* **270**: 29493-29497
26. Suzuki T, Seko A, Kitajima K, Inoue Y, Inoue S (1994) *J Biol Chem* **269**: 17611-17618
27. Takahashi N, Nishibe H (1981) *Biochim Biophys Acta* **652**: 456-467
28. Trimble RB, Tarentino AL (1991) *J Biol Chem* **266**: 1646-1651
29. Fan JQ, Lee YC (1997) *J Biol Chem* **272**: 27058-64
30. Altmann F, Schweiszer S, Weber C (1995) *Glycoconj J* **12**: 84 - 93
31. Chu FK (1986) *J Biol Chem* **261**: 172 -177
32. Jourdian GW (1996) W: Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H (red) *Glycoproteins and disease*, Elsevier, Amsterdam, str. 3-54
33. Yet MG, Wold F (1988) *J Biol Chem* **263**: 118-122
34. Muramatsu TJ (1971) *J Biol Chem* **246**: 5535
35. Plummer TH Jr, Tarentino AL (1991) *Glycobiology* **1**: 257-263
36. Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH Jr (1985) *Biochemistry* **24**: 4665-4671
37. Tochibana Y, Yamashita K, Kobata A (1982) *Arch Biochem Biophys* **214**: 199-200
38. Reddy A, Grimwood BG, Plummer TH Jr, Tarentino AL (1998) *Glycobiology* **8**: 633-636
39. Plummer TH Jr, Phelan AW, Tarentino AL (1996) *Anal Biochem* **235**: 98-101
40. Tarentino AL, Plummer TH Jr (1994) *Meth Enzymol* **230**: 44-57
41. Grueninger-Leitch F, D'Arcy A, D'Arcy B, Chene C (1996) *Protein Sci* **5**: 2617-2622
42. Waddling ChA, Plummer TH Jr, Tarentino AL, Van Roey P (2000) *Biochemistry* **39**: 7878-7885
43. Plummer TH Jr, Tarentino AL (1981) *J Biol Chem* **256**: 10243-10246
44. Tarentino AL, Plummer TH Jr (1982) *J Biol Chem* **257**: 10776-10780
45. Plummer TH Jr, Phelan AW, Tarentino AL (1987) *J Biochem* **163**: 167-173
46. Tarentino AL, Maley F (1976) *J Biol Chem* **251**: 6537-6543
47. Nishigaki M, Muramatsu T, Kobata A (1974) *Biochem Biophys Res Commun* **59**: 638-645
48. Pierce RJ, Spik G, Montreuil J (1980) *Arch Biochem Biophys* **214**: 199-210
49. Takegawa K, Nakoshi M, Iwahara S, Yamamoto K, Tochikura T (1989) *Appl Environ Microbiol* **55**: 3107-3112
50. Kol O, Brassart C, Spik G, Montreuil J, Bouquet S (1989) *Glycoconjugate J* **6**: 333-348
51. Tarentino AL, Maley F (1974) *J Biol Chem* **249**: 811-817
52. Trimble RB, Tarentino AL, Evans F, Maley F (1979) *J Biol Chem* **254**: 9705-9713
53. Kadowaki S, Yamamoto K, Fujisaki M, Izumi K, Tochikura T, Yokoyama T (1990) *Agric Biol Chem* **54**: 97
54. Freeze HH, Etchison JR (1984) *Arch Biochem Biophys* **232**: 414
55. Taga EM, Waheed A, Van Etten RL (1984) *Biochemistry* **23**: 815-822
56. Nakagawa H, Yamada T, Chien J-L, Gardas A, Kitamikado M, Li SC, Li YT (1980) *J Biol Chem* **255**: 5955-5959
57. Fukuda MN, Matsumura G (1976) *J Biol Chem* **251**: 6218-6225
58. Fushuku N, Muramatsu H, Uezono MM, Muramatsu T (1987) *J Biol Chem* **262**: 10086-10092
59. Umemoto J, Bhavanandan, VP, Davidson EA (1977) *J Biol Chem* **252**: 8609-8614
60. Trimble RB, Maley F (1984) *Anal Biochem* **141**: 515-522
61. Ziegler FD, Maley F, Trimble RB (1985) *J Biol Chem* **263**: 6986-6992
62. Tarentino AL, Plummer TH Jr (1994) *Meth Enzymol* **230**: 44-57
63. Takahashi N (1977) *Biochem Biophys Res Commun* **76**: 1194-1201
64. Deras JL, Kato J, Lee YC (2000) *Anal Biochem* **278**: 213-220.
65. Packer NH, Lawson MA, Jardine DR, Redmond JW (1998) *Glycoconjugate J* **15**: 737-747
66. Treuheit MJ, Vaghy PL, Kirley TL (1992) *J Biol Chem* **267**: 11777-11782
67. Bouquet S (1995) W: Verbert A (red) *Methods on Glycoconjugates*, Harwood Academic Publishers, Lille, str. 51-59
68. Küster B, Wheeler SF, Hunter AP, Dwek RA, Harvey DJ (1997) *Anal Biochem* **250**: 82-101
69. Lee KB, Al-Hakim A, Loganatham D, Linhardt RJ (1991) *Carbohydr Res* **214**: 155-168
70. Czartoryska B (1996) *Post Biochem* **42** (4): 350-357

IV Konferencja Sekcji Endokrynologii Molekularnej Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego

Termin: 2-3 października 2004 r.
Miejsce obrad: Sala Konferencyjna Muzeum Archeologicznego
w Poznaniu
Pałac Górków,
Poznań, ul. Wodna 27

Program naukowy:

Wykłady plenarne i prezentacje prac oryginalnych z zakresu endokrynologii molekularnej (postępy w badaniach molekularno-genetycznych endokrynopatii — choroby tarczycy, przysadki, nadnerczy, przytarczyc, zaburzenia różnicowania i dojrzewania płci, otyłość, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, osteoporoza, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, nowotwory gruczołów endokrynnych); diagnostyka molekularna; terapia genowa i rekombinowanymi hormonami.

Organizator: Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego
dr hab. med. Katarzyna Łącka
tel. (61) 8691323 kom 604 90 50 86
fax (61) 8691682
e-mail: K_Lacka@wp.pl i gradeckakubik@op.pl

Wskazówki dla Autorów

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

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

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

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 jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenia 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: prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako *.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny z lewym marginesem około 4 cm, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Arial CE 11 lub 12. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ołówkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji,

tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (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 i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

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]. Odnosiłki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

1. Hildebrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* 631: 499-502
2. Bostock CJ, Summer AT (1978) *The Eucaryotic 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, s. 541-553
4. Deleij J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stoltz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t. 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 1-7
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 243-272

ILUSTRACJE: ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: *.tif, lub *.cdr, lub *.psd, lub *.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. 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. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i 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.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przesać na adres:

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

KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Dotyczący składek członkowskich i prenumeraty „Postępów Biochemii” w roku 2004

Składka członkowska w 2004 roku wynosi:

dla Członków rzeczywistych 80.- zł.

dla Członków studentów 40.- zł

w tym roczna prenumerata „Postępów Biochemii”.

Małżeństwa mogą opłacać składki w wysokości 80. + 40. = 120 zł.

Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 30 czerwca 2004, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą mogli otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania się zapasów magazynowych.

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa.

Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 30.- zł.

Osoby niebędące członkami Towarzystwa mogą być prenumeratorami „Postępów Biochemii”. Koszt w 2004 roku — 80 zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2004 120.- zł.

UWAGA: ZMIANA NUMERÓW KONT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Składki członkowskie i prenumerata Kwartalnika “Postępy Biochemii”: BPH PBK S.A. III Oddz. Warszawa, ul. Krucza 24-26; Nr **95 1060 0076 0000 4110 5000 0371**.

Prenumerata Kwartalnika “Acta Biochimica Polonica”: BPH PBK S.A. III Oddz. Warszawa, ul. Krucza 24-26; Nr **35 1060 0076 0000 4110 5000 0384**

Jolanta Barańska

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

ZAPROSZENIE

Jeżeli chciałabyś/chciałbyś zapisać się na listę e-mailową Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyślij e-mail na adres: infoptbioch@nencki.gov.pl. W polu „subject”, umieść swoje nazwisko i imię (w takiej kolejności i bez polskich znaków diakrytycznych) oraz adres e-mailu. Wysyłając taki mail zgadzasz się na to, aby na Twój adres e-mailowy przychodziły informacje ZG, listy pojedynczych lub grup członków do ogółu członków, informacje z FEBS o zjazdach i kursach oraz materiały reklamowe. Lista będzie rozsyłać materiały kontrolowane przez moderatora, którym będzie Adam Szewczyk, sekretarz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, tak więc nie będzie Ci grozić zalew śmieciowej poczty i zawirusowanych „attachmentów”. Mam nadzieję, że tą drogą poprawi się stan poinformowania naszych członków o różnych wydarzeniach naukowych, stypendiach, kursach i wreszcie o aktywności poszczególnych oddziałów naszego Towarzystwa. Być może również „Listy do biochemików” redagowane przez p. Teresę Wesołowską będą obok wersji drukowanej kolportowane przez naszą listę. Zapraszam także do odwiedzenia strony [www](http://rcin.org.pl) naszego Towarzystwa

Adam Szewczyk

Sekretarz Zarządu Głównego

Polskiego Towarzystwa Biochemicznego