

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 46, NR 4, 2000

Mikroprocesory DNA	272
Inicjacja replikacji	282
Genom drożdży	291
Translacja a mitochondria	299
Faza G1 podczas onkogenezy	309
Funkcje glutationu	318
Tuftsyna	327
Kalcyklina	336
Mucyna MUC1	342
Biochemia w nowym millennium	351

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

ZAPROSZENIE

Jeżeli chciałabyś/chciałbyś zapisać się na listę e-mailową Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyślij e-mail na adres: infoptbioch@ncncki.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 Dariusz Stępkowski, 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.ptbioch.edu.pl

Dariusz Stępkowski

Sekretarz Zarządu Głównego

Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Ze smutkiem zawiadamiamy, że dnia 1 sierpnia 2000 zmarł nagle

Ś.P. Profesor dr hab. Jacek Augustyniak,

wieloletni dyrektor Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Kierownik Zakładu Biochemii Biopolimerów, były Dziekan Wydziału Biologii UAM, wicedyrektor Międzyuczelnianego Instytutu Biochemii w Poznaniu, członek Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN, Komitetu Biotechnologii PAN, członek Rad Naukowych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Ośrodka Informacji Naukowej PAN, Instytutu Genetyki Roślin PAN i Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.

Zmarły był odznaczony Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski i Złotym Krzyżem Zasługi oraz Medalem Komisji Edukacji Narodowej.

Był znakomitym dydaktykiem, naukowcem, organizatorem, twórcą Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM oraz kierunku studiów Biotechnologia. Zawdzięczamy mu wiele tłumaczeń podręczników akademickich z zakresu biochemii i biologii molekularnej. Wychował wielu pracowników i nauczycieli akademickich, spośród których wielu pracuje w różnych częściach świata.

Ogarnął nas wielki smutek po Jego odejściu.

Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Poznaniu
wraz z Redakcją Kwartalnika „Postępy Biochemii”

Ośrodek Badawczo-Rozwojowy

Izotopów



POLATOM

05-400 Otwock-Świerk

tel.: 0-22 718-07-56, 718-07-55, fax: 0-22 718-03-50

e-mail: polatom@cyf.gov.pl

oferuje

mikroprocesory genetyczne

MICROMAX

Informacja o pełnej ofercie handlowej i usługowej dostępna w serwisie
www.biotechnologia.com.pl lub stronie internetowej www.polatom.cyf.gov.pl

Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Izotopów

POLATOM

wyłączny dystrybutor produktów do biologii molekularnej firmy **NEN Life Science Products** (www.nen.com) oferuje:

Mikroprocesory genetyczne

do porównawczej analizy ekspresji genów (Micromax™ cDNA Microarray Systems):

Micromax Human cDNA Microarray - do analizy ekspresji szerokiego spektrum genów człowieka (2400 znanych genów)

Micromax Direct System - zawierający 250 genów kodujących kinazy i fosfatazy

Micromax Direct System - zawierający 290 genów kodujących wybrane czynniki transkrypcyjne

Micromax Direct System - zawierający 161 onkogenów i genów supresorowych

Dla badaczy nie posiadających skanera laserowego (GSI Luminocs, Watertown, MA) firma NEN oferuje skanowanie płytki oraz opracowanie danych.

Zestaw do nieizotopowego znakowania kwasów nukleinowych

VersiTag-nieenzymatyczny system, oparty na bezpośrednim chemicznym wiązaniu kompleksu platyny w pozycji N7 adenozyiny i guanozyiny umożliwiającą detekcję techniką hybrydyzacji *in situ*, Northern, Southern

Nukleotydy oraz ich analogi

znakowane barwnikami fluorescencyjnymi, za pomocą haptenów (ponad 150 pozycji katalogowych) oraz izotopowo

Fluo-peptides

biologicznie aktywne, trwałe peptydy znakowane nowymi barwnikami fluorescencyjnymi przydatne w badaniu oddziaływania znakowanego ligandu z receptorami oraz w badaniach cytofluorometrycznych

TSA™ -Tyramidowy System Amplifikujący

opatentowany przez firmę NEN, wzmacnia chromogenne i fluorescencyjne sygnały w badaniach hybrydyzacji *in situ* oraz badaniach immunohistochemicznych

Filmy, ekrany intensyfikujące sygnały oraz kasety do autoradiografii

Membrany nylonowe i PVDF

Signal Screen™ Cloned Receptors

preparaty sklonowanych receptorów błonowych stosowane w poszukiwaniu nowych leków wraz ze znakowanymi ligandami (^{125}I , ^3H , ^{32}P , ^{14}C , ^{35}S , ^{45}Ca) i system FlashPlate (96- i 384-studzienkowych płytek titracyjnych) do ilościowego określenia oddziaływania ligandu z receptorem bez konieczności przemywania studzienek

Kodak Digital Science™ Image Station 440CF

kompaktowy system do analizy ilościowej sygnałów chemiluminescencyjnych, fluorescencyjnych, chromogennych oraz do densytometrii żeli i filmów autoradiograficznych

05-400 Otwock-Świerk

tel.: 0-22 718-07-56, 718-07-55, fax. 0-22 718-03 50

e-mail: polatom@cyf.gov.pl

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 NACZELNY

Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03

ZASTĘPCA

REDAKTORA NACZELNEGO

Executive Editor
GRAZYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02

REDAKTORZY

Editors
IWONA FIJAŁKOWSKA
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
LILIANA KONARSKA
ANNA SZAKIEL
ADAM SZEWCZYK

BIURO REDAKCJI

Editorial office
SEKRETARZ
Secretary
HANNA LASKOWSKA
poniedziałki, czwartki
monday—thursday
14—16
tel. 659-85-71 w. 441
SKŁAD I ŁAMANIE
Typesetting
MĄGORZATA BASAJ

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
GRZEGORZ BARTOSZ (Łódź)
PIOTR CEGŁOWSKI (Warszawa)
BARBARA GRZELAKOWSKA-
SZTABERT (Warszawa)
ARTUR JARMOŁOWSKI (Poznań)
JACEK KUŹNICKI (Warszawa)
ELWIRA LISOWSKA (Wrocław)
ANDRZEJ PASZEWSKI (Warszawa)
JOANNA RYTKA (Warszawa)
STANISŁAW ULASZEWSKI
(Wrocław)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Mikroprocesory DNA w badaniach biomedycznych DNA microarrays in biomedical studies MAREK MIROWSKI, JACEK BARTKOWIAK	272
Inicjacja replikacji chromosomu u Prokaryota i Eukaryota Initiation of chromosome replication in Prokaryotes and Eu- karyotes DAGMARA JAKIMOWICZ, JOLANTA ZAKRZEWSKA- CZERWIŃSKA	282
Organizacja i ewolucja genomu drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a problem sierocych otwartych ramek odczytu Organisation and evolution of the genome of yeast <i>Sac- charomyces cerevisiae</i> and the problem of ORFANs PAWEŁ MACKIEWICZ	291
Wzajemna regulacja translacji mitochondrialnej i translacji cytoplazmatycznej u drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Interrelationship between the mitochondrial and cytosolic translation in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AGATA KONOPIŃSKA, MAGDALENA BOGUTA	299
Zaburzenia kontroli fazy G1 cyklu komórkowego podczas onkogenezy Disorder of G1 phase control of cell cycle during oncoge- nesis RAFAŁ CZAJKOWSKI, TOMASZ DREWA, DOROTA OLSZEWSKA, ALINA WOŹNIAK	309
Glutation: niezwykle funkcje pospolitego tripeptydu Glutathione: unusual functions of the common tripeptide KATARZYNA WINIARSKA	318
Tuftsyna – endogeny immunomodulator Tuftsin – endogenous immunomodulator KRYSZYNA DZIERZBICKA, TOMASZ RAKOWSKI, ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK	327
Czy kalcyklina, białko wiążące Ca²⁺, pełni podobną funk- cję jak kalmodulina? Does calcyclin, a Ca ²⁺ -binding protein, play a similar role as calmodulin? ANNA FILIPEK	336
Mucyna MUC1 i jej znaczenie w procesach nowotwo- rzenia MUC1 mucin and its signification in cancerogenesis ANNA PASZKIEWICZ-GADEK, ANDRZEJ GINDZIENSKI	342
Biochemia w nowym millennium Biochemistry in the new millennium MIROSŁAWA Z. BARCISZEWSKA, JAN BARCISZEWSKI	351

Mikroprocesory DNA w badaniach biomedycznych

DNA microarrays in biomedical studies

MAREK MIROWSKI¹, JACEK BARTKOWIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mikroprocesory oligonukleotydowe
- III. Mikroprocesory cDNA
- IV. Czynniki wpływające na działanie mikroprocesorów DNA
- V. Wykorzystanie mikroprocesorów oligonukleotydowych
- VI. Wykorzystanie mikroprocesorów cDNA
- VII. Mikroprocesory DNA w badaniach ekspresji genów
- VIII. Inne obszary zastosowań mikroprocesorów DNA
- IX. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: *BRCA1* — (ang. *Breast Cancer Gene 1*) — gen dziedzicznej formy raka sutka, *CFTR* — (ang. *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) — regulator przewodzenia transmembranowego, gen warunkujący mukowiscydozę, Cy3 i Cy5 — (ang. *Cyanine 3 and 5*) — barwniki fluorescencyjne: cyjanina 3 i 5, DNP-cDNA — (ang. *Dinitrophenyl-cDNA*) — cDNA wyznakowany dinitrofenolem, GMS — (ang. *Genomic Mismatch Scanning*) — odszukiwanie sekwencji genomowych błędnie sparowanych, HRP — (ang. *Horse Radish Peroxidase*) — peroksydaza chrzanowa, IBD — (ang. *Identity by Descent*) — identyczność genomowych regionów uwarunkowanych dziedziczeniem, PCR — (ang. *Polymerase Chain Reaction*) — polimerazowa reakcja łańcuchowa, REPSA — (ang. *Restriction Endonuclease Protection Selection and Amplification*) — selekcja i amplifikacja fragmentów chromionych przed działaniem endonukleaz, RT-PCR — (ang. *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) — reakcja odwrotnej transkrypcji z następującą po niej polimerazową reakcją łańcuchową, SBH — (ang. *Sequencing by Hybridization*) — sekwencjonowanie za pomocą hybrydyzacji, SNP — (ang.

Contents:

- I. Introduction
- II. Oligonucleotide microarrays
- III. cDNA microarrays
- IV. Factors having influence on the performance of DNA microarrays
- V. Application of oligonucleotide microarrays
- VI. Application of cDNA microarrays
- VII. DNA microarrays for gene expression studies
- VIII. Others areas for DNA microarrays application
- IX. Concluding remarks

Single Nucleotide Polymorphism) — polimorfizm pojedynczych nukleotydów, T-DNA (ang. *Transgenic DNA*) — DNA transgenowy, ruchomy fragment DNA plazmidu *Ti Agrobacterium tumefaciens* lub *Ri A. rhizogenes*, T_m — (ang. *Melting Temperature*) - temperatura topnienia DNA, TMAC — (ang. *Tetramethylammonium Chloride*) — chlorek tetrametylamonowy, TSA — (ang. *Tyramide Signal Amplification*) — tyramidowy system wzmacniający sygnał.

I. Wstęp

Koncepcja mikroprocesorów DNA (mikrosiatki DNA; ang.: *DNA microarrays*, *DNA microchips*) została opracowana przez zespół badaczy z *Whitehead Institute for Biomedical Research* (Massachusetts, USA) [1]. Technologia przygotowywania mikroprocesorów DNA opiera się na wcześniejszych doświadczeniach nad hybrydyzacją oligonukleotydów unieruchomionych na podłożu stałym [2-4]. Sprowadza się ona do umieszczenia na błonach nylonowych, albo silikonowych lub szklanych płytkach, bardzo wielu cząsteczek jednoniciowych oligonukleotydów lub DNA. Pojedyncza cząsteczka zajmuje powierzchnię o średnicy mniejszej niż 250 mikronów. Handlowo dostępne mikroprocesory zawierają od 200 do 250 000 takich cząsteczek na cm². Związane z

¹Dr hab., Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Biochemii IBŚiB AM, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Izotopów, 05-400 Otwock-Świerk, e-mail: mirowski@pharm.am.lodz.pl, tel/fax. 042 678 2927; ²dr hab., Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Onkologii AM, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, e-mail: j.bartkowiak@pro.onet.pl; tel. 042 675 7630.

podłożem oligonukleotydy lub cząsteczki DNA pełnią rolę sond molekularnych. Nie zawierają jednak znaczników. Wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi są natomiast hybrydujące z nimi analizowane kwasy deoksyrybonukleinowe lub rybonukleinowe. Za pomocą mikroprocesorów można także badać wiązanie z DNA białek lub innych ligandów. Zastosowanie czułych technik detekcji fluorescencji umożliwia precyzyjną identyfikację każdego składnika badanej mieszaniny i ocenę ilościową jego wiązania. Uzyskiwane dane są gromadzone i opracowywane za pomocą zaawansowanych programów komputerowych. Mikroprocesory DNA w jednym doświadczeniu pozwalają na analizę tysięcy genów. Umożliwiają ich sekwencjonowanie, określanie polimorfizmu, a także szybkie badanie aktywności [5].

Mikroprocesory przygotowuje się przeprowadzając bezpośrednio na płytce syntezę zaprogramowanych oligonukleotydów lub adsorbując na niej cząsteczki DNA. Jednoniciowe oligonukleotydy zawierają od 10 do 25 nukleotydów (mikroprocesory oligonukleotydowe). Technika mikroosadzania pozwala na związanie dłuższych odcinków jednoniciowego DNA (0.5-2.0 kb). Najczęściej są to namnażane metodą PCR określone rodzaje cDNA. Taki mikroprocesor określany jest jako mikroprocesor cDNA.

II. Mikroprocesory oligonukleotydowe

Przygotowanie tych mikroprocesorów sprowadza się zwykle do syntezy deoksyoligonukleotydów. Najchętniej stosowanym podłożem jest szkło, charakteryzujące się obojętnymi właściwościami chemicznymi, niską wewnętrzną fluorescencją oraz możliwością chemicznego modyfikowania jego powierzchni. Ograniczeniem techniki syntezy oligonukleotydów na szkle jest ich długość. Zaletą — możliwość równoległej syntezy wielu oligonukleotydów o sekwencji zaplanowanej w oparciu o dane z banku genów, bez konieczności przeprowadzania dodatkowych zabiegów związanych z klonowaniem.

Stosuje się kilka strategii uzyskiwania mikroprocesorów oligonukleotydowych. Metoda tzw. odblokowywania światłem (ang. *Light-Directed Deprotection Method*), opisana przez F o d o r a i w s p., [2], wykorzystuje fosfamidowe pochodne nukleotydów. Powierzchnia płytek pokryta jest chemicznymi cząsteczkami łącznikowymi zawierającymi na końcach fotolabilne grupy zabezpieczające. Selektywne naświetlanie określonego obszaru podłoża, poprzez stosowanie ekranów fotolitograficznych, usuwa zabezpieczenia, co umożliwia przyłączenie nu-

kleotydu do odblokowanego łącznika. Powtarzanie procesu pozwala na równoległe syntetyzowanie różnych oligonukleotydów w zaplanowanych miejscach płytki. Wyprodukowanie za pomocą tej technologii mikroprocesora, na którym z czterech różnych zasad zsyntetyzowane byłyby oligonukleotydy o długości 20 zasad, wymaga cyklu kontrolowanej deprotekcji i wiązania powtórzonego 80-razy. Technologia ta dostarcza płytek o bardzo wysokiej gęstości naniesionych elementów (do 250 000 na cm²). Wydaje się być bardziej przydatna w masowej produkcji raz zaprojektowanych mikroprocesorów, niż w opracowywaniu mikrosiatek prototypowych.

Inną technologią wykorzystywaną do produkcji mikroprocesorów oligonukleotydowych jest metoda drukowania strumieniowego (ang. *Ink-Jet Printing*), oparta na bezpośrednim dostarczaniu fosfamidowych pochodnych nukleotydów do wybranych miejsc na płytce [6]. W tej technice powierzchnia szkła jest pokryta hydrofobowym materiałem światłoczułym. Wytrawianie fotolitograficzne odkrywa obszary na których ma być prowadzona synteza. Następnie do powstałych „studzienek” hydrofilnych dostarczane są fosfamidowe pochodne nukleotydów, gdzie następuje ich wiązanie. Technika drukowania strumieniowego pozwala uzyskiwać mikrosiatki o gęstości wynoszącej do 10 000 sekwencji nukleotydowych na cm².

III. Mikroprocesory cDNA

Mikroprocesory takie otrzymywane są w procesie nanoszenia cDNA o różnych sekwencjach na odpowiednie miejsca szklanej płytki. Nanoszenie odbywa się zwykle z wykorzystaniem mikronakraplania za pomocą kapilar, w których ilość nanoszonego DNA jest ściśle kontrolowana [7-11]. Zgodnie z sugestiami S o u t h e r n a [12] najbardziej wygodnym materiałem do przygotowywania tego typu mikroprocesorów są płytki szklane, których powierzchnia, poddana modyfikacjom chemicznym, silnie adsorbuje DNA. Modyfikacje te zwykle polegają na pokrywaniu powierzchni szkła polilizyną [7, 8, 13] lub reaktywnymi aldehydami [14, 15]. Roboty stosowane do produkcji mikroprocesorów tego typu pozwalają na przygotowywanie w ciągu 12 godzin około 100 płytek, z których każda zawiera ponad 10000 zaadsorbowanych sekwencji DNA.

Inną możliwością jest drukowanie strumieniowe ze stosowaniem wtryskiwaczy, nanoszących roztwory DNA na powierzchnię szkła. W konstrukcji urządzeń wtryskowych wykorzystuje się materiały wykazujące efekt piezoelektryczny [6]. Technikę tę

stosuje się do produkcji mikroprocesorów DNA służących do porównawczej analizy ekspresji genów [16]. Niewątpliwą zaletą tej technologii jest możliwość adsorbowania na płytce różnych makromolekuł (obok DNA także przeciwciał, węglowodanów, lipidów).

IV. Czynniki wpływające na działanie mikroprocesorów DNA

Analiza za pomocą mikroprocesorów oligonukleotydowych i cDNA oparta jest na reakcji hybrydyzacji. Zjawiska hybrydyzacyjne zależą od szeregu parametrów, do których należy zaliczyć temperaturę i siłę jonową mieszaniny reakcyjnej, sekwencję nukleotydową tworzonego heterodupleksu oraz stężenia zaadsorbowanych na stałym podłożu sond i stężenia nanoszonych kwasów nukleinowych. Proces hybrydyzacji prowadzi się zazwyczaj w temperaturze niższej od T_m heterodupleksów. W analizie za pomocą mikroprocesorów oligonukleotydowych i cDNA najczęściej stosowanymi przedziałami temperatur są odpowiednio: 25-42°C i 55-70°C. Ponadto, na przebieg hybrydyzacji mają wpływ kationy jednowartościowe, zwiększające szybkość formowania heterodupleksów poprzez zobojętnianie ujemnie naładowanych szkieletów fosforanowych, hamujących oddziaływanie pomiędzy zaadsorbowaną sondą a sekwencją naniesionego kwasu nukleinowego. W przypadku obu typów mikroprocesorów zwykle stosuje się jony sodowe. Sekwencja nukleotydowa jest parametrem, który praktycznie pozostaje poza kontrolą eksperymentatora, ale którego znaczenie uwidacznia się w przypadku mikroprocesorów oligonukleotydowych. Różne ilości wiązań wodorowych pomiędzy parami G:C i A:T powodują, że większą stabilność wykazują dupleksy tworzone pomiędzy regionami bogatymi w reszty GC. Może to prowadzić do błędów w ocenie ilościowej przy tworzeniu heterodupleksów, a nawet być powodem wymuszenia niespecyficznego hybrydyzacji. W przypadku mikroprocesorów oligonukleotydowych stosuje się zatem związki chemiczne, które równoważą energię wiązania pomiędzy zasadami G:C i A:T. Do tego typu związków należy m.in. chlorek tetrametylamonowy (TMAC).

Przy stosowaniu mikroprocesorów DNA należy ustalić optymalne warunki prowadzenia analizy i wprowadzać szereg prób kontrolnych, zarówno pozytywnych, jak i negatywnych. Producenci mikrosiatek dążą do tego, aby stężenie sekwencji DNA zaadsorbowanej na płytce przewyższało 10-krotnie stężenie komplementarnej do niej sekwencji obecnej w

analizowanym kwasie nukleinowym [7, 8, 13, 14, 16-23]. Tylko wtedy bowiem kinetyka procesu hybrydyzacji ma przebieg zgodny z reakcją pseudo I-rzędu, tzn. praktycznie zależy jedynie od stężenia nanoszonego kwasu nukleinowego. Dwukrotny wzrost stężenia badanego kwasu nukleinowego spowoduje zatem dwukrotne wzmocnienie sygnału. W sytuacji, kiedy stężenie zaadsorbowanego na płytce DNA byłoby równe lub mniejsze od stężenia komplementarnej sekwencji zawartej w analizowanym kwasie nukleinowym, niewielkie różnice w stężeniach immobilizowanego DNA, wynikające z technologii przygotowania mikrosiatek, powodowałyby znaczne zmiany w efektywności procesów hybrydyzacji a końcowe odczyty sygnałów obciążone byłyby znacznymi błędami.

V. Wykorzystanie mikroprocesorów oligonukleotydowych

Teoretycznie płytka szklana ze wszystkimi możliwymi sekwencjami 8-merowego fragmentu DNA umożliwia sekwencjonowanie DNA [24-26]. Stosowanie jednak mikrosiatek oligonukleotydowych do sekwencjonowania DNA poprzez hybrydyzację nie zdaje egzaminu. Trudno jest uzyskać jednoznaczny sygnał po procesie hybrydyzacji dużej liczby analizowanych równolegle oligonukleotydów i znaleźć granicę pomiędzy właściwym sygnałem a tłem. Wykorzystanie mikroprocesorów oligonukleotydowych do sekwencjonowania DNA stanie się możliwe kiedy pojawią się nowe technologie poprawiające jakość samej płytki i wybiórczość procesu hybrydyzacji. Możliwe jest natomiast stosowanie mikroprocesorów oligonukleotydowych do identyfikowania zmian pojedynczych nukleotydów w ustalonej sekwencji DNA [17, 18, 23, 27-29]. Mogą one być przydatne w poszukiwaniu mutacji warunkujących różne choroby. Na mikroprocesorze umieszcza się serie 4 krótkich oligonukleotydów, które różnią się jedną centralnie położoną zasadą (A, G, C lub T). Zmiana mutacyjna w centralnej części oligonukleotydu ma znacznie większy wpływ na destabilizację wytwarzanego dupleksu niż zmiana występująca w pozycjach skrajnych. Inkubacja tak przygotowanego mikroprocesora oligonukleotydowego z badanym DNA, wyznakowanym znacznikiem fluorescencyjnym, spowoduje najintensywniejszą jego hybrydyzację z oligonukleotydem o całkowicie komplementarnej sekwencji. Analiza porównawcza intensywności fluorescencji każdego pola mikroprocesora pozwala na resekwencjonowanie badanego fragmentu prawidłowego i zmutowanego DNA. Taka strategia,

z powodzeniem stosowana w mikroprocesorach produkowanych przez firmę Affymetrix, zyskała miano strategii dachówkowej (ang. *Tiling Strategy*). Resekwencjonowanie tą techniką fragmentu DNA o długości równej 10 kb wymaga mikroprocesora zawierającego 40 000 unieruchomionych na podłożu stałym sekwencji oligonukleotydowych. W oparciu o tę strategię opracowano mikroprocesor pozwalający na wykrywanie mutacji w ludzkim mitochondrialnym DNA [4]. Kompletna sekwencja ludzkiego mitochondrialnego genomu może być zawarta w postaci 16 000 20-merowych oligonukleotydów. Cały mikroprocesor zawiera 64000 sekwencji i umożliwia wykrywanie w jednym eksperymencie mutacji obecnych w całym genomie mitochondrialnym. Płytki takie mogą być wykorzystane również w analizach porównawczych, kiedy celem doświadczenia jest porównanie sekwencji DNA uzyskanego z materiału badanego i kontrolnego. W tym przypadku oba rodzaje DNA muszą być wyznakowane różnymi barwnikami fluorescencyjnymi [30].

Strategia dachówkowa w mikroprocesorach oligonukleotydowych jest wykorzystywana również do wykrywania zmutowanych i polimorficznych alleli. Przykładem mogą być mikroprocesory zaplanowane do wykrywania zmutowanych alleli w genach *CFTR* [18], *BRCA1* [23] i genie beta-globiny [29]. Do analizy genu *CFTR* wykorzystano 2 mikroprocesory. Jeden, zawierający 428 sekwencji oligonukleotydowych, pozwalający na wykrywanie mutacji w eksonie 11 genu i drugi, zawierający 1480 elementów do wykrywania znanych delecji, insercji i mutacji punktowych. Mikroprocesor zaplanowany do detekcji mutacji w genie *BRCA1* składał się z 96600 20-merowych fragmentów DNA i umożliwiał ich identyfikację w odrębnie całego eksonu 11 o długości wynoszącej 3.45 kb.

VI. Wykorzystanie mikroprocesorów cDNA

Mikroprocesory cDNA mogą być użyteczne w identyfikacji genomowych regionów niedopasowań (GMS). Metoda ta, oparta na technice hybrydyzacji, pozwala na szybką identyfikację u dwóch spokrewnionych osobników identycznych genomowych regionów uwarunkowanych dziedziczeniem (IBD) bez konieczności określania genotypu lub sekwencjonowania [31-35]. Regiony IBD, wyselekcjonowane za pomocą techniki GMS, są hybrydyzowane z mikrosiatką uporządkowanych genomowych klonów. Dokonuje się w ten sposób ich mapowania w strukturze chromosomów. Technika GMS przy użyciu mikroprocesora jest więc sposobem badania linii

genetycznych. Służyć może ponadto do wykrywania miejsc złamań chromosomów w trakcie mejotycznych procesów rekombinacji.

Metoda GMS obecnie jest chętnie i szeroko stosowana w badaniach genetycznych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* ze względu na fakt, że praktycznie cały genom drożdżowy został już zsekwencjonowany [36, 37]. Poznanie nieomal kompletnej sekwencji genomu ludzkiego pozwala przypuszczać, że tego typu badania wkrótce rozpoczną się także na tym genomie.

Pokrewieństwa genetyczne pomiędzy organizmami zwierzęcymi lub roślinnymi można także badać przy wykorzystaniu mikroprocesorów z polimorficznymi sekwencjami powtarzającymi się (np. *Alu*, *AluI*, *Adh*). Innym przykładem metod, które opierają się mogą o technikę siatek DNA, jest metoda selekcji i amplifikacji fragmentów chronionych przed działaniem nukleaz (REPSA) [38]. Technika REPSA jest kombinacją cięcia DNA enzymami restrykcyjnymi oraz unieruchamiania na podłożach stałych zamplifikowanych metodą PCR fragmentów chronionych przed działaniem endonukleaz. Pozwala na identyfikację analogicznych sekwencji rozpoznawanych przez białka wiążące się z DNA.

VII. Mikroprocesory DNA w badaniach ekspresji genów

Mikroprocesory DNA najczęściej i z największym powodzeniem wykorzystywane są w porównawczej analizie aktywności genów. W tego typu badaniach stosowane są zarówno mikroprocesory oligonukleotydowe, jak i cDNA [7, 13, 14, 19, 20, 37-39]. W trakcie jednego doświadczenia możliwa jest ocena ekspresji nawet wielu tysięcy genów. Za pomocą mikrosiatek DNA można selekcjonować geny odgrywające decydującą rolę w różnych procesach biologicznych. Taką drogę postępowania zastosowali m. in. Heller i wsp. [15] w badaniu procesów zapalnych. Mikroprocesory DNA mogą być wykorzystywane do przyspieszonej analizy klonów cDNA, co pozwala ograniczyć wykonywanie klasycznych analiz sekwencyjnych [14]. Konstruuje się także mikroprocesory DNA z sekwencjami wszystkich genów ulegających ekspresji w danym organizmie [40, 41]. Takie mikroprocesory stwarzają nadzieję na odkrycie nowych powiązań pomiędzy szlakami metabolicznymi i ich podłożem genetycznym oraz dają szansę określenia rzeczywistych funkcji wielu genów. Mikroprocesory DNA znajdują coraz szersze zastosowanie. Obok najbardziej wykorzystywanego porównawczego badania ekspresji genów są

one również stosowane do sekwencjonowania, badania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów, określania genotypu i aktywności antysensowych oligonukleotydów. Niektóre osiągnięcia w zakresie badania genomów uzyskane techniką mikroprocesorów DNA przedstawia Tabela 1. Zasadę porównawczej

dowego systemu wzmacniającego sygnał (TSA) — *MICROMAX TSA* (Ryc. 3 i 4). System TSA umożliwia nawet 1000-krotną amplifikację sygnałów chromogennych i fluorescencyjnych w standardowych procesach hybrydyzacji *in situ*, a także w badaniach immunohistochemicznych. Zastosowanie tego syste-

Tabela 1

Niektóre osiągnięcia w zakresie badania genomów uzyskane techniką mikroprocesorów DNA

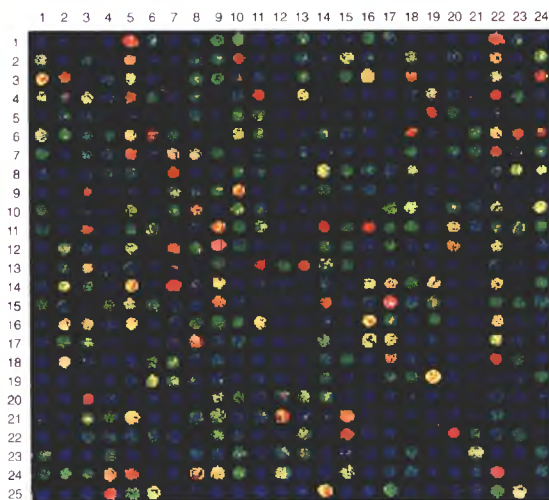
Osiągnięcie	Piśmiennictwo
Możliwość badania ekspresji całego genomu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> za pomocą mikroprocesora zawierającego ponad 6000 genów	Zhang MQ (1999) [42]
Opracowanie bazy danych drożdżowego RNA pozwalającej na szybką i standaryzowaną analizę wyników badań funkcjonalnych genomu drożdży	Aach J i wsp., (2000) [43]
Identyfikacja genów <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ulegających ekspresji w różnych stadiach cyklu komórkowego, w różnych warunkach wzrostu a także w obecności czynnika alkilującego, powodującego uszkodzenia DNA	Spellman PT i wsp., (1998) [44] DeRisi JL i wsp., (1997) [40] Wodicka LH i wsp., (1997) [41] Jelinsky SA i Samson LD (1999) [45]
Zastosowanie mikroprocesora DNA, skonstruowanego w oparciu o poznaną sekwencję nukleotydów w genomie <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , do monitorowania ekspresji genów tej bakterii w odpowiedzi na isoniazyd. Wykazanie, że lek ten indukuje geny kodujące białka związane z mechanizmem jego działania	Wilson M i wsp., (1999) [46]
Określenie przydatności analizy polimorfizmu alleli 2D6 i 2C19 cytochromu P ₄₅₀ dla oceny wydajności metabolicznej leków	Touw DJ (1997) [47] Liu WW i wsp., (1997) [48]
Identyfikacja genów ludzkiego włóknakiomięsaka, ulegających ekspresji pod wpływem α -, β - i γ -interferonu, jako markerów skuteczności terapii	Der SD i wsp., (1998) [49]
Zidentyfikowanie ponad 100 genów ludzkiej białaczki mieloblastycznej HL-60 regulowanych przez kwas retinowy. Wykazanie m. in., że marker różnicowania komórek mieloidalnych — <i>mac1</i> ulega indukcji, a protoonkogen <i>bcl2</i> — represji	Warrington JA i wsp., (2000) [50]
Określenie za pomocą mikrosiatki cDNA ekspresji genów w raku jajnika i identyfikacja genów istotnych dla procesu kancerogenezy	Wang K i wsp., (1999) [51]
Wyselekcjonowanie genów kodujących białka błonowe o potencjalnej wartości diagnostycznej i terapeutycznej (P503S, P504S i P510S) ulegających nadekspresji w tkance prawidłowej lub raku prostaty Opracowanie metody szybkiej identyfikacji genów związanych z rozwojem raka prostaty do postaci hormononiezależnej	Xu J i wsp., (2000) [52] Bubendorf L i wsp., (1999) [53]
Wykrywanie i identyfikacja dla klinicznych badań diagnostycznych i badań populacyjnych substytucji, insercji i delecji w regionach kodujących onkogenów <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> odpowiedzialnych za dziedziczną predyspozycję do rozwoju raka sutka	Favis R i wsp., (2000) [54] Favis R i Barany F, (2000) [55]
Opracowanie możliwej do stosowania w badaniach populacyjnych bezpośredniej metody wykrywania kilkudziesięciu mutacji punktowych w regionie kodującym supresorowego genu <i>p53</i>	Warrington JA i wsp., (2000) [50] Favis R i Barany F, (2000) [55]
Wykrywanie mutacji w genach kodujących proteazę i odwrotną transkryptazę wirusa HIV, warunkujących oporność tych kluczowych dla terapii enzymów na działanie inhibitorów	Kozal MJ i wsp., (1996) [56] Gunthard HF i wsp., (1998) [57]

analizy aktywności genów za pomocą mikroprocesora DNA przedstawiono na Ryc. 1 i 2.

Dostępne mikroprocesory. Obecnie kilka firm oferuje mikroprocesory do porównawczych badań ekspresji genów. Firma NEN Life Science Products (www.nen.com) opracowała mikroprocesory cDNA na płytkach szklanych bez — *MICROMAX Direct* (Ryc. 2) i z wykorzystaniem opatentowanego tyrami-

mu w analizach z wykorzystaniem mikrosiatek DNA pozwala na wykonanie badania przy dysponowaniu jedynie 4 μ g całkowitego RNA. W przypadku mikroprocesorów nie zawierających tyramidowego systemu amplifikacji sygnału wyjściowa ilość RNA wynosi około 100 μ g. Pierwszy dostępny mikroprocesor firmy NEN zawierał 2400 znanych genów (z 18 różnych rodzin genowych), wyselekcjonowanych z

ludzkich bibliotek genowych przez firmę AlphaGene (www.alphagene.com). Spośród genów zaadsorbowanych na tej płytce ponad 40% stanowią geny o



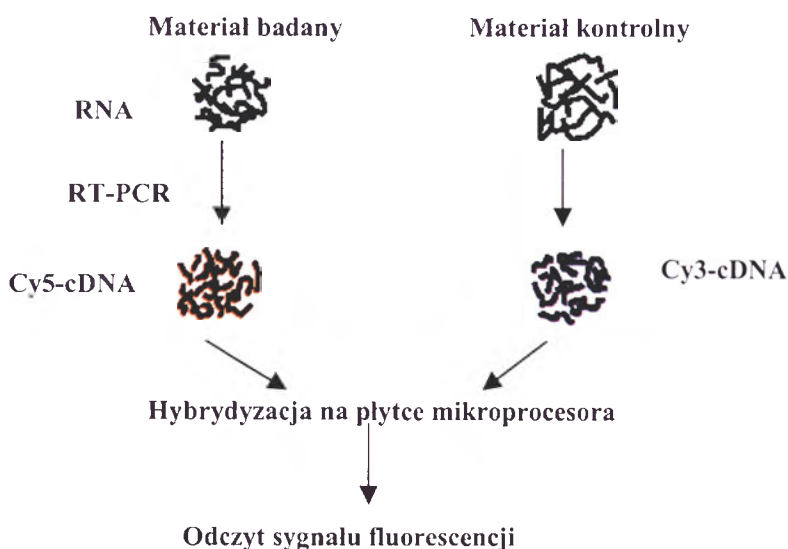
Ryc. 1. Ekspresyjny mikroprocesor DNA. Płytkę z 600 genami (lub ich fragmentami) po hybrydyzacji z badanym cDNA wyznakowanym znacznikiem fluorescencyjnym. Geny ulegające nadekspresji lub wyciszeniu są identyfikowane poprzez określenie stosunku intensywności sygnału fluorescencyjnego próby badanej do próby kontrolnej. Stosunek ten dla genów metabolizmu podstawowego, tzw. „House Keeping Genes”, jest bliski 1. Stosunek powyżej 3 świadczy o nadekspresji, a wyraźnie niższy od jedności o wyciszeniu ekspresji badanego genu.

pełnej długości, a średnia długość zaadsorbowanego genu wynosi 220 kz. Większość (80%) zaadsorbowanych genów dotyczy mózgu. W puli 2 400 genów znajduje się 100 genów odnośnikowych. Są to m.in. geny kodujące białka metabolizmu podstawowego, zawsze obecne w stałych ilościach w tkankach ssa-

nowała mikroprocesory o zawężonym zakresie genów. Pierwszy z nich zawiera 250 genów kodujących kinazy i fosfatazy, drugi obejmuje 290 genów kodujących wyselekcjonowane czynniki transkrypcyjne. Zaproponowano także płytkę z zaadsorbowanymi 161 onkogenami i genami supresorowymi. Szczegółowy wykaz zaadsorbowanych genów jest dostępny na stronie internetowej firmy NEN.

Głównymi zaletami oceny ekspresji genów za pomocą mikroprocesora DNA, w stosunku do tradycyjnej metody *Northern blot*, to olbrzymie skrócenie czasu analizy i możliwość równoczesnego badania szerokiego panelu genów. Intensywność sygnału fluorescencyjnego na mikroprocesorze DNA odczytywana jest na czytniku laserowym. Skanery do tego typu analiz wraz z odpowiednim oprogramowaniem oferowane są m.in. przez firmy GSI Luminoc (www.genscan.com), Genetic MicroSystem (www.geneticmicro.com), Axon Instruments Inc (www.axon.com), Clontech–AtlasNavigator 1.0 Software (www.clontech-gmbh.com), GenomeSystems Inc. (www.genome system.com) oraz Affymetrix (www.affymetrix.com).

Clontech Laboratories GmbH (www.clontech.com) również specjalizuje się w produkcji ekspresyjnych mikroprocesorów DNA. W ofercie handlowej tej firmy znajdują się mikroprocesory z genami zaadsorbowanymi na płytkach szklanych lub na membranach nylonowych. Firma oferuje mikrosiatki, które zawierają dobrze scharakteryzowane ludzkie geny przydatne w badaniach procesów biochemicznych (*Atlas Human Array I*). Oferuje także analogiczne



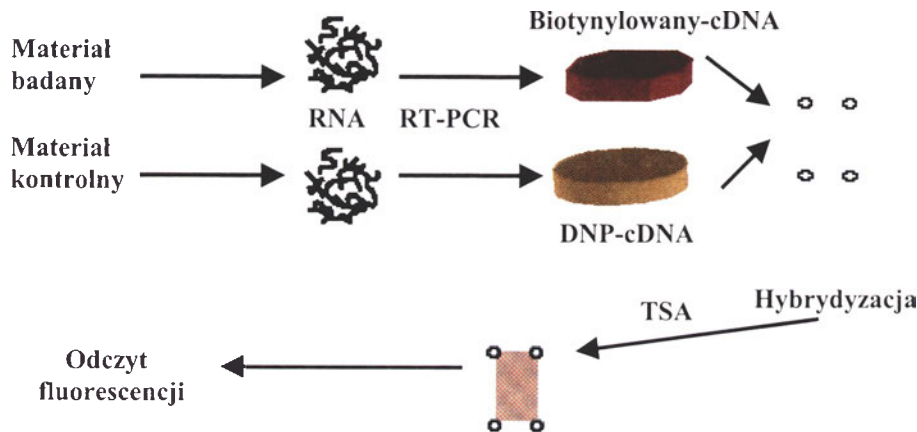
Ryc. 2. Zasada działania bezpośredniego mikroprocesora ekspresyjnego. 1. Wyizolowanie całkowitego RNA z materiału badanego i kontrolnego (ok. 100 µg). 2. Oddzielna synteza cDNA z materiału badanego i kontrolnego metodą RT-PCR z użyciem dUTP wyznakowanego odpowiednio cyjaniną 5 (Cy5-cDNA) i cyjaniną 3 (Cy3-cDNA). 3. Hybrydyzacja z mikroprocesorem obu połączonych puli cDNA. 4. Odczytanie sygnału fluorescencyjnego w skanerze laserowym.

ków (ang. *House Keeping Genes*) oraz geny pochodzenia roślinnego. Stanowią one kontrolę, która świadczy o prawidłowo przeprowadzonej analizie mikroprocesorowej. Niedawno firma NEN zapropo-

mikroprocesory z genami mysimi i szczurzymi (*Atlas Mouse Array I*, *Atlas Rat Array I*). Obok mikroprocesorów o szerokim spektrum analizowanych genów oferowane są mikroprocesory z genami wyse-

lekcjonowanymi do badań: procesu nowotworzenia u ludzi (*Atlas Human Cancer Array I* — 588 genów), procesu apoptozy (*Atlas Human Apoptosis Array* — 440 geny), toksykologicznych (*Atlas Stress/Toxicology Array* — 234 geny), neurologicznych (*Atlas Human Neurobiology Array* — 588 genów), hematologicznych i immunologicznych (*Atlas Human Hematology/Immunology Array* — 440 geny), interakcji komórek (*Atlas Human Cell Interaction Array* — 265 genów), cytokin i ich receptorów (*Atlas Human*

ba, mózg, nerka, gruczoł krokowy, płuca, gruczoł sutkowy, śledziona). Genome System Inc. (www.genome-system.com) dostarcza mikroprocesory na membranach nylonowych pod handlową nazwą Gene Discovery Array, zawierające 18 376 ludzkich klonów cDNA. Research Genetics (www.res-gen.com) oferuje mikroprocesory na nylonowych membranach zawierające ponad 5 000 ludzkich genów. Amersham Pharmacia Biotech (www.apbiotech.com) wytwarza mikroprocesory z panelem ty-



Ryc. 3. Zasada działania mikroprocesora ekspresyjnego z tyramidowym systemem wzmacniającego sygnał. 1. Wyizolowanie całkowitego RNA z materiału badanego i kontrolnego (ok. 4 µg). 2. Oddzielna synteza cDNA metodą RT-PCR z użyciem dCTP wyznakowanego biotyną (biotynylowany-cDNA) lub dinitrofenolem (DNP-cDNA). 3. Hybrydyzacja z mikroprocesorem obu połączonych puli cDNA. 4. Przyłączenie systemu wzmacniającego sygnał (TSA). 5. Odczytanie sygnału fluorescencyjnego w skanerze laserowym.

Cytokine/Receptor Array — 268 genów), cyklu komórkowego (*Atlas Human Cell Cycle Array* — 111 genów), onkogenów (*Atlas Human Oncogene/Tumor Suppressor Array* — 190 genów).

Firmą dominującą na rynku i produkującą najszerszy zestaw mikroprocesorów DNA jest Affymetrix (www.affymetrix.com). W ofercie tej firmy znajdują się mikroprocesory DNA z zaadsorbowanymi genami ludzkimi, szczurzymi, mysimi, drożdżowymi i bakteryjnymi. Przeznaczone są one m. in. do badań genomów tych organizmów, badań medycznych i toksykologicznych. Affymetrix oferuje również przygotowywanie mikroprocesorów DNA na indywidualne zamówienia placówek badawczych. Firma ta wraz z Instytutem Badania Genomu Mercka w ostatnich latach stworzyła program, który umożliwił powstanie ekspresyjnej bazy danych, dostępnej na stronach internetowych (www.HUGEindex.org i www.tigr.org/tdb/tbase.html), pozwalającej na znaczącą standaryzację tego typu badań i ciągle jej poszerzanie o nowe informacje.

Pojawiają się wciąż nowe firmy oferujące mikroprocesory DNA. W ofercie firmy Display System Biotech. (www.displaysystem.com) znajdują się mikroprocesory zawierające geny ludzkie i mysie uzyskiwane z poszczególnych narządów (serce, wątro-

sięcy genów ludzkich, mysich lub drożdżowych).

Ciekawą propozycję poszukiwania zmian w genomie ludzi dotkniętych chorobą nowotworową stworzyła firma Vysis (www.vysis.com) poprzez opracowanie mikroprocesora o handlowej nazwie Geno-Sensor. Analiza oparta jest na identyfikacji zwielokrotnienia liczby kopii lub delecji określonych genów.

VIII. Inne obszary zastosowań mikroprocesorów DNA

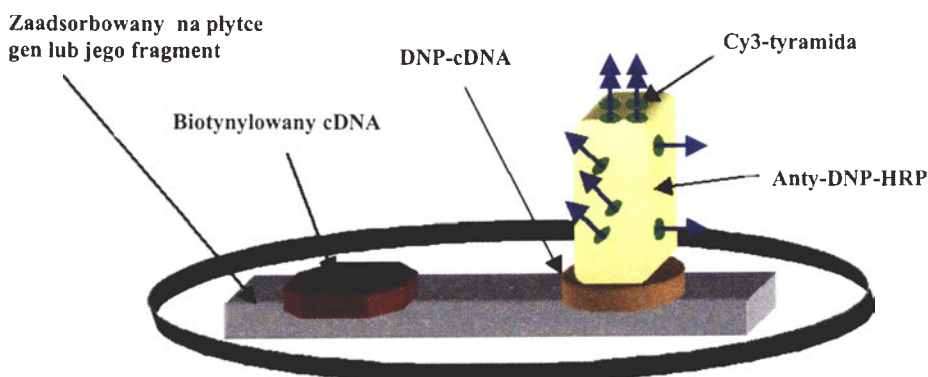
Hybrydyzacja na mikrosiatkach DNA może być szybkim sposobem identyfikacji genów zaangażowanych w oddziaływanie białkami, a także ułatwiać badania interakcji białko-białko oraz identyfikację białek wiążących ligandy w komórce [58, 59]. Fields i Song [59] zaproponowali na modelu białka GAL4 *Saccharomyces cerevisiae* tzw. system dwuhybrydowy. Analiza wzajemnych oddziaływań dwóch badanych białek wymaga konstrukcji białek fuzyjnych. Do jednego z nich dołącza się domenę cząsteczki GAL4 odpowiedzialną za wiązanie z DNA. Do drugiego dobudowuje się domenę cząsteczki GAL4 determinującą aktywację transkrypcji. W teście detekcyjnym warunkiem tran-

skrypcji wskaźnikowego genu jest oddziaływanie obu badanych białek i konformacyjne zbliżenie ich fuzyjnych aktywnych domen.

cza intensywności fluorescencji po hybrydyzacji na mikrosiatce DNA pozwala na ustalenie genu zablokowanego przez badany czynnik toksyczny. Techni-

1. Inkubacja DNP-cDNA z anti-DNP-HRP

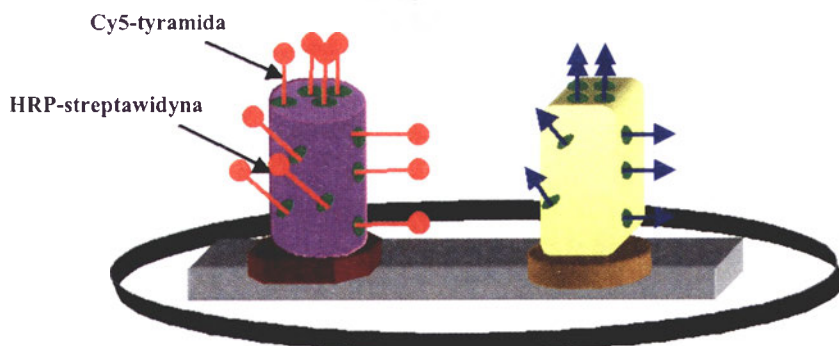
2. Przyłączenie Cy3-tyramidy



3. Inaktywacja związanej HRP

4. Inkubacja biotynylowanego cDNA z HRP-streptawidyną

5. Przyłączanie Cy5-tyramidy



Ryc. 4. Zasada działania tyramidowego systemu wzmacniającego sygnał (TSA). 1. Związanie przeciwciała anti-DNP sprzęgniętego z peroksydazą chrzanową (HRP) z DNP-cDNA zhybrydowanym na płytce mikroprocesora. 2. Przyłączenie pod wpływem HRP tyramidy (kolor zielony) sprzęgniętej z cyjaniną 3 (kolor niebieski) do białek związanych z DNP-cDNA. 3. Inaktywacja związanej HRP. 4. Związanie kompleksu HRP-streptawidyna z biotynylowanym cDNA. 5. Przyłączanie pod wpływem HRP tyramidy (kolor zielony) sprzęgniętej z cyjaniną 5 (kolor pomarańczowy) do białek związanych z biotynylowanym cDNA.

Niedawno B u l y k i w s p. [60] oraz B r a u n i w s p. [61] opracowali technologię uzyskiwania mikroprocesorów zawierających dwuniciowe deoksylogonukleotydy. Pozwalają one na analizę oddziaływań białek z dwuniciowym DNA w procesie transkrypcji.

Mikrosiatki DNA mogą być przydatne również w wykrywaniu mutantów powstałych pod wpływem toksycznych czynników środowiskowych. S h o e m a k e r i w s p. [22] zaproponowali metodę przesiewowej identyfikacji mutantów komórek drożdży z delecjami pojedynczych genów. Analiza porównaw-

ka mikroprocesorów DNA może być także stosowana w identyfikacji elementów insercyjnych w genach, np. T-DNA w genomie roślinnym [62].

IX. Uwagi końcowe

Mikroprocesory DNA, w powiązaniu z zaawansowanym oprogramowaniem komputerowym, stwarzają możliwość olbrzymiego postępu w molekularnych badaniach genetycznych. Pozwalają na analizę tysięcy genów i ocenę ich ekspresji w niezwykle krótkim czasie w toku jednego doświadczenia. Do-

skonalenie technologii wytwarzania mikroprocesorów i przygotowywanie ich w wersjach zawierających różne panele genów, umożliwi stosowanie tej techniki w wielu dziedzinach nauki i pracach aplikacyjnych, m.in. w diagnostyce klinicznej. Mikroprocesory DNA z pewnością ułatwią poznanie funkcji genów oraz identyfikację chorób genetycznych i zakaźnych. Pozwolą na wykrywanie różnic molekularnych pomiędzy nowotworami, na precyzyjną ich klasyfikację, przewidywanie przebiegu klinicznego oraz na ocenę ich reakcji na leki. Mikrosiatki DNA znajdą szerokie zastosowanie w badaniach wrażliwości osobniczej na leki, optymalizacji działania i w poszukiwaniu nowych leków. Umożliwią rozwój badań toksykologicznych na poziomie oddziaływania z genomem toksycznych czynników środowiskowych i przemysłowych. Dodatkowe możliwości wykorzystania mikroprocesorów DNA rysują się w zakresie badania interakcji makrocząsteczek z materiałem genetycznym i regulacji aktywności genów w komórce.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować Panu prof. Ryszardowi Wierzbickiemu, kierownikowi Zakładu Biochemii IBSiB AM w Łodzi za uwagi i sugestie w trakcie przygotowywania maszynopisu oraz Dyrekcji Ośrodka Badawczo-Rozwojowego Izotopów w Świerku za sfinansowanie kolorowych rycin.

Artykuł otrzymano 7 sierpnia 2000 r.

Zaakceptowano do druku 26 listopada 2000 r.

Piśmiennictwo

- Stephenson J (1999) *JAMA* **282**: 1801-1802, 282 oraz Kaczorek A, (2000) *JAMA-PL* **2**: 167-169 (tłumaczenie na jęz. polski)
- Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Tsai Lu A, Solas D (1991) *Science* **251**: 767-773
- Maskos U, Southern EM (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 1679-1684
- Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5022-5026
- Lemicux B, Aharoni A, Schena M (1998) *Molecular Breeding* **4**: 277-289
- DonRose (2000) W: Schena M (red) *Microarray Biochip Technology*. A BioTechniques Books Publication. Eaton Publishing, str. 19-38
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) *Science* **270**: 467-470
- Shalon D, Smith SJ, Brown PO (1996) *Genome Res* **6**: 639-645
- Augenlicht L (1991) *United States Patent* **4**, 981, 783
- Drmanac RT, Crkvenjakov RB (1993) *United States Patent* **5**: 202, 231
- Khrapko KR, Khorlin AA, Ivanov IB, Chernov BK, Lysov You P, Vasilenko SK, Florent'ev VL, Mirzabekov AD (1991) *Mol Biol* **25**: 581-591
- Southern E (1989) *European Patent Specification* PCT/GB89/00460
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM (1996) *Nat Genet* **14**: 457-460
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10614-10619
- Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2150-2155
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW (1998) *Trends Biotech* **16**: 301-306
- Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D, Winkler J, Lockhart DJ, Morris MS, Fodor SPA (1996) *Science* **274**: 610-614
- Cronin MT, Fucini RV, Kim SM, Masino RS, Wespi RM, Miyada CG (1996) *Human Mutation* **7**: 244-255
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL (1996) *Nature Biotechnol* **14**: 1675-1680
- Schena M (1996) *BioEssays* **18**: 427-431
- Southern E, Mir K, Shchepinov M (1999) *Nat Genet* **21** (1 Suppl): 5-9
- Shoemaker DD, Lashkari DA, Morris D, Mittmann M, Davis RW (1996) *Nature Genet* **14**: 450-456
- Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SPA, Collins FS (1996) *Nature Genet* **14**: 441-447
- Bains W, Smith GC (1988) *J Theor Biol* **135**: 303-307
- Drmanac R, Crkvenjakov R (1987) *Yugoslav patent application* 570/87
- Khrapko KR, Lysov YuP, Khorlyn AA, Shick VV, Florentiev VL, Mirzabekov AD (1989) *Febs Letters* **256**: 118-122
- Drmanac S, Kita D, Labat I, Hauser B, Schmidt C, Buczak JD, Drmanac R (1998) *Nature Biotech* **16**: 54-58
- Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell E, Chee M, Gingeras TR (1996) *Nature Med* **2**: 793-799
- Yershov G, Barsky V, Belgovsky A, Kirillov E, Kreindlin E, Ivanov I, Parinov S, Guschin D, Drobishev A, Dubiley S, Mirzabekov A (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4913-4918
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) *Science* **258**: 818-821
- Nelson SF, McCusker JH, Sander MA, Kee Y, Modrich P, Brown PO (1993) *Nature Genet* **4**: 11-18
- Mirzayans F, Mear AJ, Guo SW, Pearce WG, Walter MA (1997) *Am J Hum Genet* **61**: 111-119
- Cheung VG, Nelson SF (1998) *Genomics* **47**: 1-7
- McAllister L, Penland L, Brown PO (1998) *Genomics* **47**: 8-14
- Au KG, Welsh K, Modrich P (1992) *J Biol Chem* **267**: 12142-12148
- McCusker JH, Clemons KV, Stevens DA, Davis RW (1994) *Genetics* **136**: 1261-1269
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13057-13062
- Hardenbol P, Wang JC, Van Dyke MW (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 3339-3344
- deSaizieu A, Certa U, Warrington J, Gray C, Keck W, Mous J (1988) *Nature Biotech* **16**: 45-48
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) *Science* **278**: 680-686
- Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ (1997) *Nature Biotech* **15**: 1359-1367
- Zhang MQ (1999) *Comput Chem* **23**: 233-250
- Aach J, Rindone W, Church GM (2000) *Genome Res* **10**: 431-445
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (1998) *Mol Biol Cell* **9**: 3273-3297
- Jelinsky SA, Samson LD (1999) *Genetics* **96**: 1486-1491

46. Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, Imboden P, Ranc S, Brown PO, Schoolnik GK (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12833-12838
47. Touw DJ (1997) *Drug Metabol Drug Interact* **14**: 55-82
48. Liu WW, Webster T, Aggarwal A, Pho M, Cronin M, Ryder T (1977) *Am J Hum Genet* **61**: 1494-1494
49. Der SD, Zhou A, Williams BRG, Silverman RH (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15623-15628
50. Warrington JA, Dee S, Trulson M (2000) W: Schena M (red) *Microarray Biochip Technology*. A BioTechniques Books Publication. Eaton Publishing, str. 119-148
51. Wang K, Gan L, Jeffery E, Gayle M, Gown AM, Skelly M, Nelson PS, Ng WV, Schummer M, Hood L, Mulligan J (1999) *Gene* **229**: 101-108
52. Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, Vedvick TS, Leslie KB, Badaro R, Reed SG (2000) *Cancer Res* **60**: 1677-1682
53. Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, Koivisto P, Moyses S, Chen Y, Mahlamaki E, Schraml P, Moch H, Willi N, Elkahaloun AG, Pretlow TG, Gasser TC, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1999) *J Natl Cancer Inst* **91**: 1758-1764
54. Favis R, Day JP, Gerry NP., Phelan C, Narod S, Barany F (2000) *Nat Biotechnol* **18**: 561-564
55. Favis R, Barany F (2000) *Ann N Y Acad Sci* **906**: 39-43
56. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell E, Chee M, Gingeras TR (1996) *Nat Med* **2**: 753-759
57. Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Havlir DV, Richman DD (1998) *Hum Retroviruses* **14**: 869-876
58. Bartel PL, Roecklein JA, Sen Gupta D, Fields S (1996) *Nat. Genet* **12**: 72-77
59. Fields S, Song O (1989) *Nature* **340**: 245-246
60. Bulyk ML, Gentalen E, Lockhart DJ, Church GM (1999) *Nat Biotechnol* **17**: 573-577
61. Braun E, Eichen Y, Sivan U, Ben Yoseph G (1998) *Nature* **391**: 775-778
62. Azpiroz — Lechan R, Feldman KA (1997) *Trends Genet* **13**: 152-156

Inicjacja replikacji chromosomu u Prokaryota i Eukaryota

Initiation of chromosome replication in prokaryotes and eukaryotes

DAGMARA JAKIMOWICZ¹,
JOLANTA ZAKRZEWSKA- CZERWIŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Organizacja regionu *oriC* u pro- i eukariota.
 - II-1. Sekwencje wiążące inicjatorowe białka
 - II-2. Sekwencje bogate w pary AT
 - II-3. Sekwencje regionów *oriC* rozpoznawane przez inne białka
- III. Białka inicjatorowe u pro- i eukariota
- IV. Mechanizm inicjacji replikacji u pro- i eukariota
- V. Regulacja inicjacji replikacji

Wykaz stosowanych skrótów: ACS, 11. nukleotydowy fragment ARS o ściśle zachowawczej sekwencji (ang. *ARS core consensus sequence*); ARS sekwencje inicjacyjne replikacji (ang. *autonomously replicating sequence*); FIS, zasadowe białko "histonopodobne" (ang. *Factor for Inversion Stimulation*); IHF, zasadowe białko "histonopodobne" (ang. *Integration Host Factor*); MCM – białka o aktywności helikazowej (ang. *minichromosome maintenance*); ORC, kompleks sześciu białek inicjujący replikację (ang. *Origin Recognition Complex*); *oriC*, region inicjacji replikacji chromosomu (ang. *origin of chromosomal replication*) SSB – białka stabilizujące jednoniciową strukturę DNA(ang. *single-strand binding proteins*).

I. Wstęp

Podział każdej komórki pro- i eukariotycznej musi być poprzedzony podwojeniem materiału genetycznego. Proces replikacji DNA jest regulowany na poziomie inicjacji replikacji. Inicjacja replikacji za-

Contents:

- I. Introduction
- II. Organization of *oriC* region in prokaryotes and eukaryotes
 - II-1. Sequences binding initiator proteins
 - II-2. AT-rich sequences
 - II-3. Other proteins binding to *oriC*
- III. Initiator proteins in prokaryotes and eukaryotes
- IV. Mechanism of initiation of chromosomal replication in prokaryotes and eukaryotes
- V. Regulation of initiation of replication

tem wydaje się być najważniejszym etapem kontrolującym częstość podziałów komórkowych a tym samym tempo wzrostu komórki.

Replikacja rozpoczyna się w ściśle określonym miejscu na chromosomie, zwanym *oriC* (ang. *origin of chromosomal replication*). Bakteryjny chromosom zawiera jedno takie miejsce, natomiast w eukariotycznym chromosomie występuje wiele regionów *oriC* (nawet do kilkudziesięciu tysięcy) [1]. Ponad 35 lat temu Jacob, Brenner i Cuzin [2] zaproponowali model inicjacji replikacji chromosomu *E. coli*, w którym założyli, że proces ten jest regulowany poprzez specyficzne związanie się białka (inicjatora) do miejsca startu replikacji (replikatora). Dwadzieścia lat później model ten został doświadczalnie potwierdzony przez Fullera i wsp. [3, 4]. W 1988 r. Kornberg zaproponował mechanizm inicjacji replikacji chromosomu *E. coli* (patrz p. IV i ryc. 2A) [5]. Badania nad inicjacją replikacji u eukariota, ze względu na złożoną strukturę chromosomu oraz brak systemu replikacji *in vitro*, są znacznie mniej zaawansowane niż u bakterii. Wydaje się jednakże, że inicjację replikacji chromosomu organizmów pro- i eukariotycznych opisuje wspólny mechanizm. Poprzez specyficzne związanie się inicja-

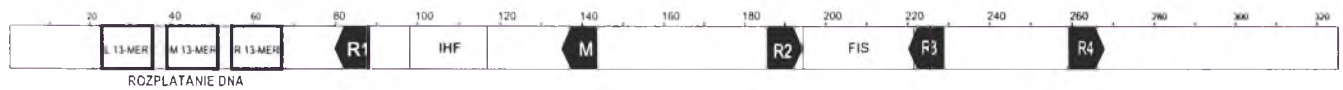
¹Dr; ²dr hab., Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, Tel.: 071 373 2274; Fax: 071 373 2587

torowego białka (białek) do sekwencji regionu *oriC* tworzy się kompleks nukleoproteinowy, a następnie dochodzi do miejscowego rozplątania podwójnej helisy DNA i powstania oczka replikacyjnego. Rozplatanie DNA jest wynikiem charakterystycznej dla regionu *oriC* niestabilności helikalnej dodatkowo zwiększonej po związaniu białka. W miejscu rozdzielania nici DNA tworzy się para widełek replikacyjnych.

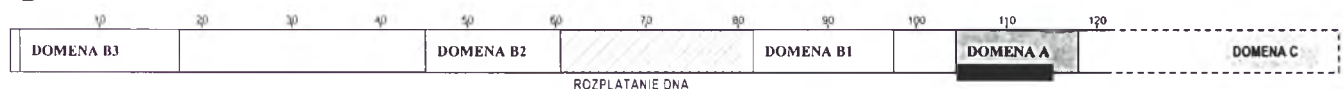
II. Organizacja regionu *oriC* u pro- i eukariota

Organizacja regionu *oriC* organizmów pro- i eukariotycznych najlepiej została poznana na przykładzie *E. coli* (Ryc. 1A) i *Saccharomyces ce-*

A



B



Ryc. 1. Struktura regionu inicjacji replikacji chromosomu *Escherichia coli* (A) i *Saccharomyces cerevisiae* (B). R1 – R4, M – sekwencje DnaA.

revisiae (Ryc. 1B). Badania nad minichromosomami *E. coli* oraz drożdżowymi plazmidami zawierającymi sekwencje ARS (ang. *autonomously replicating sequences*) umożliwiły poznanie funkcji poszczególnych strukturalnych elementów regionu inicjacji replikacji. Do najważniejszych elementów tego regionu należą sekwencje wiążące inicjatorowe białka (II-1) oraz sekwencje w obrębie których rozwijana jest podwójna helisa DNA (II-2). Ponadto w regionie tym występują sekwencje, do których wiążą się białka wpływające na architekturę kompleksu inicjacyjnego lub aktywatory transkrypcji zwiększające wydajność replikacji (II-3).

Regiony *oriC* zawsze występują w nie kodujących odcinkach międzygenowych, a ich długość wynosi około 250 pz u *E. coli* i od 100 do 200 pz u drożdży [6,7].

II-1. Sekwencje wiążące inicjatorowe białka

U bakterii w regionie *oriC* występują 9-cio nukleotydowe niepalindromowe sekwencje wiążące inicjatorowe białko DnaA, nazwane dalej sekwencjami DnaA (ang. *DnaA box*) [6]. Ich sekwencje nukleotydowe w przeciwieństwie do ich ilości oraz rozmiesz-

czenia, są konserwatywne wśród bakterii. W regionie *oriC E. coli* występuje pięć sekwencji DnaA (R1-R4, M; Ryc. 1A). Na podstawie stałych powinowactwa białka DnaA do DNA ustalono sekwencję najwyższej zgodności: 5'-TT(A/T)TNCACA-3' [8]. Dla zachowania aktywności replikacyjnej regionu *oriC* ważny jest układ sekwencji DnaA; delecje i insercje odcinków DNA pomiędzy sekwencjami DnaA są jedynie wtedy tolerowane gdy obejmują pełny obrót helisy [9, 10].

U drożdży, inicjatorowe białka wiążą się do domeny A [11, 12] (Ryc. 1B) regionu ARS [13] (Ryc. 1B). W domenie tej występuje 11-to nukleotydowy odcinek DNA o ściśle zachowanej sekwencji, 5'-(T/A)-TTTA(T/C)(A/G)TTT(T/A)-3', identycznej dla wszystkich ARS u drożdży [11, 14]. Sekwencje tę

nazwano ACS (ang. *ARS core consensus sequence*). Inicjatorowe białka specyficznie rozpoznają sekwencję ACS [15]. Wykazano, że zarówno mutacje punktowe jak i delecje w sekwencji ACS oraz jej inwersja zaburzają funkcję ARS [16]. Ponadto stwierdzono, że inicjatorowe białka wiążą się dodatkowo do domeny B1 regionu ARS [14, 17, 18] (Ryc. 1B). Jak jednak wykazała analiza mutantów domeny B1 nie jest ona niezbędna dla specyficznego rozpoznania sekwencji przez białko [18]. Prawdopodobnie więc, wiązanie sekwencji ACS umożliwia istotne, ale niespecyficzne oddziaływania białka z innymi elementami regionu ARS.

II-2. Sekwencje bogate w pary AT

Najczęściej do miejscowego rozplątania podwójnej nici DNA regionu *oriC* dochodzi w obrębie sekwencji bogatych w pary A-T. U *E. coli* są to 3 odcinki DNA o długości 13 pz i sekwencji najwyższej zgodności 5'-GATCTVTTHWWWK-3' (V=A/G/C, H=A/C/T, W=A/T, K=G/T) znajdujące się w pobliżu 5'końca regionu *oriC* [6, 19] (Ryc. 1A). Drożdżowy region *oriC* charakteryzuje się podwyższoną zawartością par A-T na całej swej długości. Rozplatanie

DNA w tym regionie prawdopodobnie rozpoczyna się w domenie B2, ale także zaobserwowano tworzenie jednoniciowego DNA we fragmencie A (Ryc. 1B). Obie te sekwencje biorą prawdopodobnie udział w tworzeniu oczka replikacyjnego [20].

II-3. Sekwencje regionów *oriC* rozpoznawane przez inne białka

W obrębie regionu *oriC* *E. coli* stwierdzono ponadto występowanie sekwencji wiążących białka wpływające na architekturę kompleksu inicjacyjnego. Są to histonopodobne, zasadowe białka IHF (ang. *Integration Host Factor*) i FIS (ang. *Factor for Inversion Stimulation*), które wiążąc się do *oriC* po-

plikacji u bakterii pełni białko DnaA (Tabela 1). Jak wykazały badania replikacji w ekstraktach komórkowych, a także badania z zastosowaniem mutantów warunkowych, białko to jest niezbędne do zainicjowania replikacji u bakterii zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych [26, 27, 28, 29]. W trakcie tego procesu białko DnaA nie tylko wiąże się specyficznie z sekwencjami DnaA, ale spełnia ono również dwie inne funkcje: umożliwia rozplatanie podwójnej helisy DNA w regionie *oriC* bogatym w pary A-T oraz ułatwia wprowadzenie do kompleksu helikazy DnaB [6, 19, 23, 30]. Najlepiej scharakteryzowanym bakteryjnym inicjatorem replikacji jest białko DnaA z *E. coli* (Tabela 1). Białko to występuje w dwu formach: aktywnej replikacyjnie związanej z ATP oraz

Tabela 1

Białka inicjujące replikację chromosomu

Funkcja	<i>E. coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Inicjatorowe białko — wiązanie DNA — wiązanie ATP — oddziaływania międzycząsteczkowe — miejscowe rozplecenie DNA w obrębie sekwencji bogatych w pary A-T	DnaA (4 domeny, 52 kDa) domena IV domena III domena I i III +	ORC (6 białek, 414 kDa) Orc1, Orc2, Orc4, Orc5 Orc1, Orc5 wszystkie —
Wprowadzenie helikazy do kompleksu inicjacyjnego	DnaC	Cdc6
Rozwijanie dwuniciowego DNA	DnaB	białka MCM

wodują zagięcie DNA [21, 22] (Ryc. 1A). Ta zmiana konformacji DNA ułatwia zajście kolejnych etapów procesu inicjacji replikacji [23, 24]. Obecność białek IHF i FIS nie jest konieczna do zajścia inicjacji replikacji DNA, lecz mutanty pozbawione jednego z tych białek cechuje asynchroniczność inicjacji replikacji (liczba *oriC* w komórkach jest różna od 2ⁿ) [25].

Eukariotyczne regiony *oriC* są miejscem wiązania aktywatorów transkrypcyjnych. U drożdży, aktywator transkrypcyjny ABF1 wiąże się do domeny B3 regionu *oriC* [12] (Ryc. 1B). Przyłączanie aktywatora powoduje zwiększenie wydajności replikacji nawet 1000-krotnie.

III. Białka inicjatorowe u pro- i eukariota

Najważniejszą funkcją białka inicjującego replikację DNA jest specyficzne rozpoznanie sekwencji zlokalizowanych w regionie *oriC*. Rolę inicjatora re-

nieaktywnej, związanej z ADP [6, 31]. Na podstawie stopnia podobieństwa sekwencji aminokwasowych białek pochodzących z różnych mikroorganizmów w DnaA wyróżniono cztery domeny [6, 32, 33]. Podział ten odpowiada funkcjonalnym domenom. C-końcowa domena (domena IV) białka DnaA jest odpowiedzialna za wiązanie DNA [34]. W domenie III znajduje się miejsce wiązania ATP [35]. Według najnowszych badań N-końcowa domena (I) oraz domena III uczestniczą w oligomeryzacji białka DnaA [36, 37]. Domena II charakteryzuje się dużą zmiennością sekwencji aminokwasowej i nie zawiera żadnych konserwatywnych elementów strukturalnych [32]. Prawdopodobnie domena ta pełni funkcję elastycznego łącznika oddzielającego części białka zaangażowane w różne oddziaływania. Sugeruje się, że za oddziaływania białka DnaA z helikazą DnaB odpowiedzialne są domeny I i III [38].

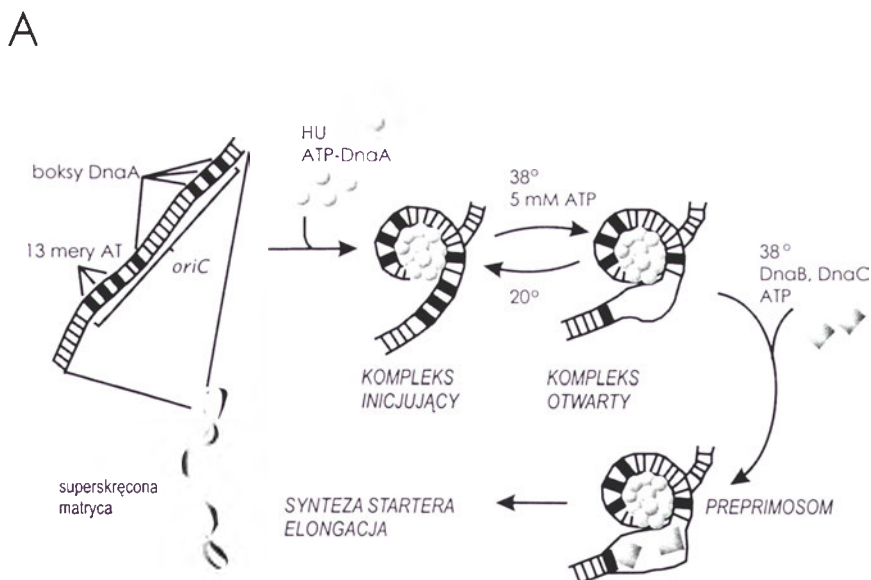
Rolę inicjatora u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przypisuje się nie pojedynczemu białku lecz

kompleksowi białkowemu ORC (ang. *Origin Recognition Complex*) złożonemu z sześciu polipeptydów [7, 39] (Tabela 1). Wykazano, że wszystkie sześć podjednostek kompleksu, nazwanych wraz za zmniejszającą się masą cząsteczkową od Orc1p do Orc6p, są niezbędne dla przeżycia komórek drożdżowych [40, 41, 42]. Ostatnio sklonowano geny z innych organizmów eukariotycznych (*Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Xenopus levis*) kodujące białka o podobieństwie aminokwasowym do elementów kompleksu ORC oraz ludzkie geny *orc* [43]. Za specyficzne rozpoznanie sekwencji ACS i B1 regionu *oriC* prawdopodobnie są odpowiedzialne białka Orc1p, Orc2p, Orc4p i Orc5p [44]. Podobnie jak w przypadku białka DnaA, kompleks ORC dla zachowania aktywności replikacyjnej wymaga obecności ATP a także jego hydrolizy. Podjednostkami mogącymi wiązać ATP są Orc1p i Orc5p zawierające motyw wiążący nukleotydy [12]. Dokładna rola ATP w wiązaniu kompleksu ORC nie jest jeszcze poznana. Być może wiązanie i hydroliza ATP indukują zmiany konformacyjne kompleksu niezbędne do związania DNA.

IV. Mechanizm inicjacji replikacji u prokariota

Inicjacja replikacji jest procesem wieloetapowym, w trakcie którego powstają kompleksy o złożonej strukturze trzeciorzędowej z udziałem białka inicjującego, białek wspomagających oraz helikazy. Białka inicjatorowe przyłączając się do regionu *oriC* powodują zmiany strukturalne DNA (m. in. zagięcie DNA), które w dalszych etapach inicjacji replikacji prowadzą do rozwinięcia podwójnej helisy DNA i utworzenia oczka replikacyjnego.

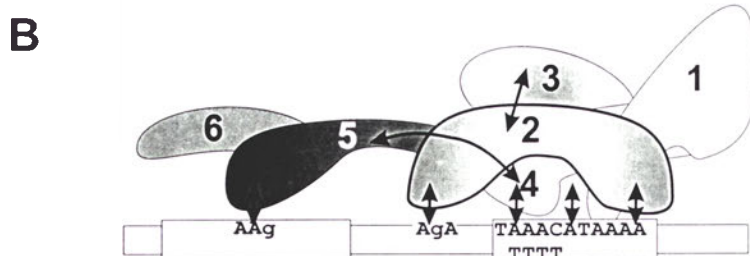
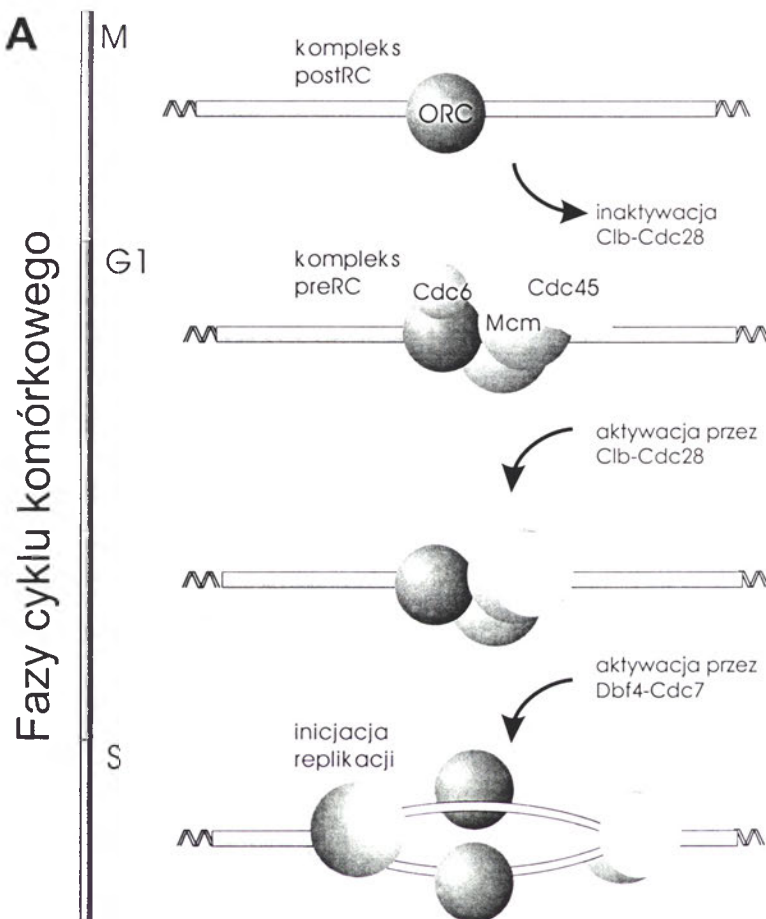
Kornberg i wsp. [1, 19] na podstawie obrazów z mikroskopu elektronowego i ochrony DNA przed trawieniem DNaząI (*DNaseI footprinting*) postulują, że w pierwszym etapie inicjacji replikacji chromosomu *E. coli* około 20 do 40 cząsteczek białka DnaA przyłącza się do regionu *oriC* tworząc rdzeń białkowy, wokół którego zostaje owinięty DNA (Ryc. 2A). Woelker i Messer [45] przedstawili inny model kompleksu inicjującego (Ryc. 2A). Postulują oni tworzenie przez 10 monomerów białka DnaA podwójnego pięcioczłonowego pierścienia. DNA w tym modelu nie tylko owija pierścień



Ryc. 2. Inicjacja replikacji u *Escherichia coli*. Kolejne etapy inicjacji replikacji wg. Kornberga [5]. Schemat kompleksu inicjującego wg. Woelker i Messera [6].

białkowy ale także przechodzi przez jego wnętrze. W powstałym w ten sposób nukleoproteinowym kompleksie wszystkie sekwencje DnaA mają jednakową orientację przestrzenną, a wygięcia cząsteczki DNA ułatwiają białka IHF i FIS. Ostatnie badania wykazały, że rdzeń białkowy tworzy się dzięki od-

we zakrzywienie DNA ułatwia jego rozplatanie. W miejsce częściowego rozplecenia helisy DNA dostarczana jest, przy udziale białka DnaA, helikaza DnaB [30]. Białko DnaB występuje w postaci heksameru i jest wprowadzane w kompleksie z DnaC. W ten sposób powstaje preprimosom, który w po-



Ryc. 3. Inicjacja replikacji u *Saccharomyces cerevisiae*. Białka regulujące inicjację replikację wg. Diffley'a [49]. Schemat oddziaływania kompleksu ORC z regionem ARS wg. Lee i Bella [44]. Białka kompleksu ORC zaznaczono odpowiednio numerami Orc1p (1) – Orc6p (6). Strzałkami zaznaczono oddziaływania typu białko-białko, białko-DNA.

działaniom pomiędzy cząsteczkami białka DnaA. Prawdopodobnie za oddziaływania te odpowiedzialne są domeny I i III białka DnaA [26, 36]. W następnym etapie inicjacji replikacji chromosomu *E. coli* w wyniku strukturalnych zmian polegających na rozplataniu DNA w regionie bogatym w pary A-T dochodzi do utworzenia kompleksu otwartego. Etap ten wymaga hydrolizy ATP związanego do białka DnaA. Tworzenie kompleksu otwartego jest stymulowane przez białka HU pokrywające 3-5% DNA i powodujące wygięcie DNA. Prawdopodobnie to dodatko-

równaniu do kompleksu otwartego jest większy i bardziej asymetryczny [46]. Helikaza DnaB w kompleksie z białkiem DnaC jest nieaktywna. Uwolnienie DnaC z preprimosomu aktywuje helikazę DnaB. Na tym etapie białko DnaA również opuszcza kompleks replikacyjny.

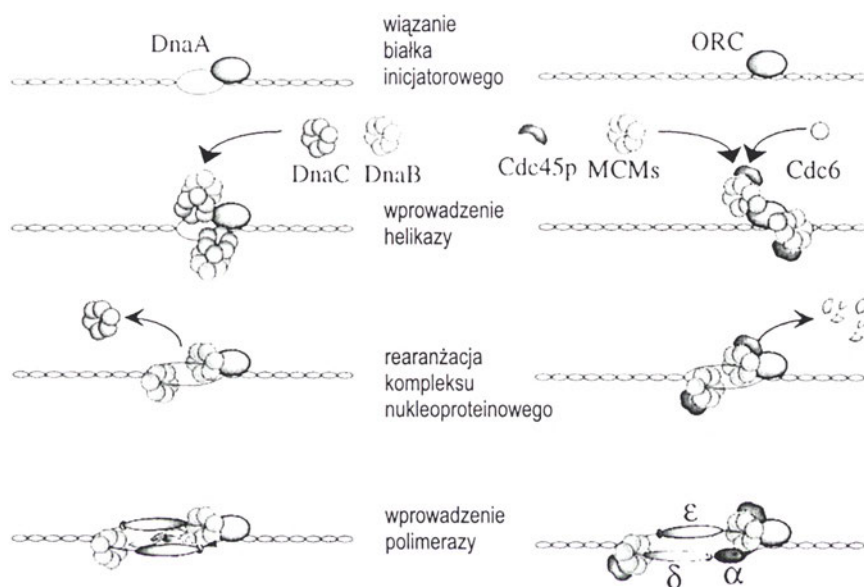
Podobnie jak u *E. coli*, kompleks ORC wiążąc się do sekwencji ARS powoduje owijanie się nici DNA wokół kompleksu oraz silne zagięcie DNA [7, 39]. W przeciwieństwie do *E. coli*, gdzie rdzeń białkowy tworzy się w trakcie pierwszego etapu inicjacji repli-

kacji, kompleks sześciu białek ORC tworzy się jeszcze przed związaniem z DNA [41]. Kompleks ORC nie jest w stanie samodzielnie rozpleść podwójnej helisy w regionie *oriC*, jak ma to miejsce w przypadku białka DnaA (Tabela 1). Stanowi to drugą istotną różnicę pomiędzy mechanizmem inicjacji replikacji chromosomu pro- i eukariotycznego (Ryc. 4). U *E. coli*, po rozpleceniu DNA białko DnaA oddziałuje z jedną z nici rozplecionej helisy [47]. Nato-

a także zapobiega powtórnej inicjacji [14, 51]. W trakcie tworzenia preRC do kompleksu ORC-DNA kolejno przyłączają się Cdc6/Cdc18 i MCM [52, 53]. Sugeruje się, że MCM może pełnić rolę helikazy a Cdc6/Cdc18 czynnika odpowiedzialnego za wprowadzenie helikazy do kompleksu [53]. Białka te zatem pełnią analogiczną funkcję do bakteryjnych białek DnaB i DnaC. Białko Cdc6 oddziałuje z ORC [51]. Kolejnym czynnikiem asocjującym przed ini-

Escherichia coli

Saccharomyces cerevisiae



Ryc. 4. Porównanie kompleksów nukleoproteinowych powstających w trakcie inicjacji replikacji chromosomu *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae* wg. Baker i Bella [41].

miast ORC już podczas wiązania rozpoznaje tylko nieć Watsona w sekwencji ARS [44]. Wiązanie kompleksu białkowego ORC w obrębie ARS nie jest jedynym czynnikiem uruchamiającym inicjację replikacji. Wykazano, że kompleks ORC pozostaje związany do ARS przez większą część cyklu komórkowego: w czasie mitozy i fazy G2 [48]. Dokładniejsza analiza kompleksu białkowego w regionie inicjacji replikacji pozwoliła na wyodrębnienie dwóch rodzajów kompleksów: preRC (ang. *preReplicative Complex*) i postRC (ang. *postReplicative Complex*) [14, 49] (Ryc. 3A). Kompleks postRC zbudowany jest tylko z białek ORC. Tworzy się on po zakończeniu syntezy nowych nici DNA i jest niezdolny do zainicjowania replikacji. Kompleks preRC jest związany do *ori* w fazie G1 i oprócz ORC zawiera inne białka niezbędne do uruchamiania inicjacji replikacji. Są to białka rodziny MCM (ang. *minichromosome maintenance*) i Cdc6 [12]. Mutanty MCM są niezdolne do utworzenia oczka replikacyjnego [50]. Białko Cdc6 syntetyzowane w końcu fazy M jest odpowiedzialne za przejście komórek do fazy S,

co jest białko Cdc45 o dotychczas nieznanej roli, oddziałujące z ORC i MCM [52]. Uruchamianie inicjacji jest procesem regulowanym przez kinazy cyklu komórkowego Cdc28/Clb5, Cdc7/Dbf4 działające na składniki kompleksu preRC [12, 14]. Substratem dla Cdc7/Dbf4 są prawdopodobnie białka MCM. Cdc28/Clb5 oprócz uruchamiania replikacji są odpowiedzialne także za hamowanie powtórnej inicjacji [12].

W regionie ARS udowodniono wiązanie białek SSB rozpoznających jednoniciowy DNA [54]; wiążą się one w obrębie domeny B. Prawdopodobnie rozplatanie DNA rozpoczyna się w sekwencji B2, ale także zaobserwowano tworzenie I-niciowego DNA we fragmencie A. Sekwencje te biorą prawdopodobnie udział w tworzeniu oczka replikacyjnego [20].

U organizmów pro- i eukariotycznych, inicjatorowy kompleks nukleoproteinowy powstaje w wyniku złożonych oddziaływań typu białko-DNA, białko-białko. Architektura inicjatorowych kompleksów nukleoproteinowych ze względu na złożoność oddziaływań nie jest jeszcze dobrze poznana (Ryc. 4).

W bakteryjnym kompleksie nukleoproteinowym rdzeń białkowy jest homomultimerem, utworzonym z cząsteczek inicjatorowego białka DnaA. Białko to za pomocą domeny IV wiąże się do powtórzonych sekwencji DNA (sekwencji DnaA) regionu *oriC*. U drożdży natomiast sześć różnych białek kompleksu ORC oddziałując ze sobą tworzą rdzeń białkowy (heteromultimer). Ostatnie badania wykazały, że aż cztery z sześciu białek Orc wchodzi w bezpośredni kontakt z DNA. Białka Orc1p, Orc2p i Orc4p wiążąc się do dużej bruzdy DNA rozpoznają specyficznie sekwencję ACS, natomiast białko Orcp5 wiąże się do sekwencji B1 [44] (Ryc. 3B). Te złożone oddziaływania prowadzą do istotnych zmian w topologii DNA. Dochodzi do zawinięcia łańcucha DNA wokół cząsteczek białka. Wynikiem zmian struktury DNA jest lokalne rozplecenie podwójnej helisy w obrębie sekwencji bogatych w pary A-T. Sekwencje bogate w pary A-T, w obrębie których dochodzi do rozplatania podwójnej helisy DNA są niezbędne do zainicjowania replikacji, ale udowodniono, że u *E. coli* [55] i *S. cerevisiae* [56] funkcjonalnie mogą być zastąpione przez inne sekwencje charakteryzujące się niestabilnością helikalną.

V. Regulacja inicjacji replikacji

Replikacja zachodzi tylko raz w czasie cyklu komórkowego i musi być ściśle powiązana z podziałem komórkowym. Częstość replikacji jest kontrolowana na poziomie inicjacji. Za regulację inicjacji replikacji według hipotezy replikonu zaproponowanej przez Jacoba i wsp. [2] mogą odpowiadać dwa czynniki działające *cis* – miejsce inicjacji replikacji oraz *trans* – inicjator.

Zarówno białko DnaA jak i białka ORC spełniają kryteria inicjatora. U *E. coli*, nagromadzenie białka DnaA w komórce uruchamia replikację. Zaobserwowano, że wzrost ilości białka DnaA w komórce *E. coli* zwiększa częstość inicjacji replikacji. Na chromosomie *E. coli* stwierdzono występowanie 1600 sekwencji DnaA nie zaangażowanych w replikację [25]. Wiązanie do nich obniża poziom wolnego białka w komórce, działając negatywnie na częstość inicjacji replikacji [57]. Także u *B. subtilis* sekwencje DnaA występujące w regionach zwanych *inc* (ang. *incompatibility*) biorą udział w hamowaniu inicjacji replikacji. W tych przypadkach sekwencja DnaA pełni funkcję elementu regulującego ilość wolnego białka DnaA w komórce. Postulowano, że u *E. coli* regulujący wpływ na uruchomienie replikacji ma wiązanie DnaA do sekwencji DnaA o najniższym powinowactwie w regionie *oriC* np. R3 [8].

Wyniki badań ostatnich kilku lat potwierdziły, że kompleks ORC jest eukariotycznym inicjatorem replikacji. Mutacje w regionie ARS wiążącym białka ORC jak i mutacje poszczególnych genów kodujących te białka zaburzają funkcje ARS lub są wręcz letalne dla komórek drożdży [43].

Oba białka inicjatorowe DnaA i ORC wykorzystują energię ATP do rozplecenia DNA w regionie *oriC* i dlatego poziom ATP reguluje inicjację replikacji zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych. W przypadku białka DnaA wiązanie ATP nie ma znaczenia przy rozpoznawaniu DNA, lecz podczas tworzenia oczka replikacyjnego. Inaczej sytuacja wygląda u *Eukaryota*, gdzie udowodniono konieczność hydrolizy ATP przy wiązaniu do DNA drożdżowego ORC [15]. Dodatkowo, u eukariotów aktywność kompleksu replikacyjnego regulowana jest w sposób właściwy tylko dla tych organizmów — poprzez fosforylację białek replikacyjnych. Przy przejściu do fazy S kluczową rolę odgrywają specyficzne kinazy cyklu komórkowego [53].

Poza białkami inicjatorowymi, na częstość inicjacji wpływa również architektura regionu inicjacji replikacji, o której decydują na przykład oddziaływania z białkami histonopodobnymi (HU, IHF i FIS) u *E. coli* lub białkami struktury chromatyny u organizmów eukariotycznych (patrz niżej). Ostatnio wykazano, że u *E. coli* przy niskim stężeniu białka DnaA, IHF ułatwia inicjatorowemu białku wiązanie się do sekwencji DnaA, R3 (Ryc. 1) [58]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na *oriC* u *E. coli* są zmiany konformacji wywołane metylacją [59]. Mają one znaczenie w negatywnej regulacji inicjacji replikacji — po zajęciu replikacji nić rodzicielska jest zmetylowana natomiast potomna nie. Hemimetylowany DNA tworzy kompleks z błoną komórkową i dlatego jest nieaktywny w replikacji [60]. Postuluje się także związek metylacji z zagięciem DNA [61]. Jednak regulacja przez metylację może zachodzić tylko u *E. coli* – u innych mikroorganizmów nie stwierdzono homologicznych sekwencji w regionie *oriC*.

Kolejnym elementem kontroli inicjacji replikacji u organizmów pro-i eukariotycznych jest aktywacja transkrypcyjna regionu *oriC*. U *E. coli*, transkrypcja z promotorów *gida* i *mioC* znajdujących się w pobliżu *oriC* aktywuje replikację *oriC* [6]. Może się to odbywać przez tworzenie pętli R przez RNA hybridujące z matrycą DNA lub udział ujemnych superskrętów na DNA indukowanych przez polimerazę RNA.

W komórkach eukariotycznych aktywacja transkrypcyjna odgrywa znaczącą rolę w regulacji inicjacji replikacji [62]. Czynniki transkrypcyjne przede

wszystkim poprzez oddziaływanie typu białko-białko wprowadzać mogą inne białka zaangażowane w inicjację replikacji. Podobnie jak w przypadku inicjacji transkrypcji, czynniki transkrypcyjne wiążące się do regionu ARS mogą również powodować "rozluźnienie" struktury białek chromatyny umożliwiając łatwiejszy dostęp innym składnikom kompleksu inicjacyjnego do tego regionu. U drożdży, mutacje w domenie B3 wiążącej czynnik transkrypcyjny ABFI, prowadzą do znacznego obniżenia aktywności replikacyjnej. Dla zachowania odpowiednio wysokiej aktywności replikacyjnej ważna jest sama obecność promotora w regionie ARS, natomiast rodzaj promotora odgrywa mniejszą rolę. Ostatnio skonstruowano białko hybrydowe składające się z domeny wiążącej DNA białka Gal4 oraz kwaśnej aktywacyjnej domeny białka BRC1 raka sutka, a sekwencję B3 zastąpiono promotorem Gal4 [63]. W układzie takim hybrydowe białko wydajnie aktywowało replikację, a mutacje w obrębie domeny aktywacyjnej prowadziły do znacznego obniżenia aktywności replikacyjnej. Ostatnie badania wykazały, że czynniki transkrypcyjne zmieniając architekturę regionu *oriC* poprzez rozluźnienie struktury chromatyny, ułatwiają białkom szkieletowym macierzy jądrowej aktywowanie regionów *oriC* [64].

Podziękowania

Praca finansowana przez KBN, projekt grantowy nr 6PO4A 006 15

Dagmara Jakimowicz składa podziękowanie Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej za stypendium dla młodych naukowców.

Artykuł otrzymano 27 kwietnia 2000 r.

Zaakceptowano do druku 16 października 2000 r.

PIŚMIENNICTWO

- Kornberg A, Baker T (1992) Second edition. Freeman WH & Co., New York
- Jakob FS, Brenner S, Cuzin F (1963) *Quant Biol* **28**: 329-348
- Fuller RS, Funnell BE, Kornberg A (1984) *Cell* **38**: 889-900
- Fuller RS, Kornberg A (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 5817-5821
- Kornberg A (1988) *J Biol Chem* **263**: 1-4
- Messer W, Weigel C (1996) W: Neidhardt F.C. i współpr. (red) *Cellular and Molecular Biology*. ASM Press Washington, D.C., 1579-1601
- Dutta A, Bell SP (1997) *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 293-332
- Schaper S, Messer W (1995) *J Biol Chem* **270**: 17622-17626
- Langer U, Richter S, Roth A, Weigel C, Messer W (1996) *Mol Microbiol* **21**: 301-311
- Messer W, Hartmann-Kuhlein H, Langer U, Mahlow E, Roth A, Schaper S, Urmoncit B, Woelker B (1992) *Chromosoma* **102**: 1-6
- Marahrens Y, Stillman B (1994) *EMBO J* **13**: 3395-3400
- Toone WM, Aerne BL, Morgan BA, Johnston LH (1997) *Annu Rev Microbiol* **51**: 125-149
- Stinchcomb DT, Struhl K, Davis RW (1979) *Nature* **282**: 39-43
- Donovan S, Diffley JF (1996) *Curr Opin Genes & Dev* **6**: 203-207
- Bell SP, Stillman B (1992) *Nature* **357**: 128-134
- Van Houten JV, Newlon CS (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 3917-3925
- Diffley JF, Cocker JH (1992) *Nature* **357**: 169-172
- Rao H, Stillman B (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2224-2228
- Bramhill DI, Kornberg A (1988) *Cell* **54**: 915-918
- Natale DA, Umek RM, Kowalski D (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 555-560
- Polaczek P, Cieśla Z (1984) *Mol Gen Genet* **194**: 227-231
- Polaczek P (1990) *New Biol* **2**: 265-271
- Gille H, Egan JB, Roth A, Messer W (1991) The Fis protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res* **19**: 4167-4172
- Ramstein J, Lavery R (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7231-7235
- Messer W, Egan B, Gille H, Holz A, Schaefer C, Woelker B (1991) *Res Microbiol* **142**: 119-125.
- Jakimowicz D, Majka J, Lis B, Konopa G, Węgrzyn G, Messer W, Schrempf H, Zakrzewska-Czerwińska J (2000) *J Mol. Biol* **298**: 351-364
- Moriya S, Kato K, Yoshikawa H, Ogasawara N (1990) *EMBO J* **9**: 2905-2910
- Helmstetter CE, Pierucci O (1976) *J Mol Biol* **102**: 477-486
- Hirota Y, Mordoh J, Jacob F (1970) *J Mol Biol* **53**: 369-387
- Marszałek J, Kaguni JM (1994) *J Biol Chem* **269**: 4883-4890
- Skarstad KI, Boye E (1994) *Biochim Biophys Acta* **1217**: 111-130
- Schaper S, Messer W (1997) *Proteins* **28**: 1-9
- Yoshikawa H, Ogasawara N (1991) *Mol Microbiol* **5**: 2589-97
- Roth A, Messer W (1995) *EMBO J* **14**: 2106-2111
- Sekimizu K, Bramhill D, Kornberg A (1987) *Cell* **50**: 259-265
- Weigel Ch, Schmidt A, Seitz H, Tngler D, Welzcek M, Messer W (1999) *Mol Microbiol* **34**: 53-66
- Messer W, Blaesing F, Majka J, Nardmann J, Schaper S, Schmidt A, Seitz H, Speck C, Tüngler D, Węgrzyn G, Weigel C, Welzcek M., Zakrzewska-Czerwińska J (1999) *Biochemie* **81**: 819-825
- Sutton MD, Carr KM, Vicente M, Kaguni JM (1998) *J Biol Chem* **273**: 34255-34262
- Li JJ, Herskowitz I (1993) *Science* **262**: 1870-1874
- Bell SP, Kobayashi R, Stillman B (1993) *Science* **262**: 1844-1849
- Baker TA, Bell SP (1998) *Cell* **92**: 295-305
- Micklem G, Rowley A, Harwood J, Nasmyth K, Diffley JF (1993) *Nature* **366**: 87-89
- Quintana DG, Dutta A (1999) *Front Biosci* **4**: D805-815
- Lee DG, Bell SP (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 7159-7168
- Woelker B, Messer W (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 5025-5033
- Baker TA, Sekimizu K, Funnell BE, Kornberg A (1986) *Cell* **45**: 53-64
- Hwang DS, Kornberg A (1992) *J Biol Chem* **267**: 23083-23086
- Diffley JF, Cocker JH, Dowell SJ, Rowley A (1994) *Cell* **78**: 303-316
- Diffley JF (1998) *Curr Biol* **8**: R771-773

50. Yan H, Merchant AM, Tye BK (1993) *Genes Dev* **7**: 2149-2160
51. Liang C, Weinreich M., Stillman B (1995) *Cell* **81**: 667-676
52. Aparicio OM, Weinstein DM, Bell SP (1997) *Cell* **91**: 59-69
53. Leatherwood J (1988) *Curr Opin Cell Biol* **10**: 742-748
54. Matsumoto K, Ishimi Y (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 4624-4632
55. Kowalski DI, Eddy MJ (1989) *EMBO J* **8**: 4335-4344
56. Huang RY, Kowalski D (1993) *EMBO J* **12**: 4521-4531
57. Hansen FG, Kocfoed S, Sorensen L, Atlung T (1987) *EMBO J* **6**: 255-258
58. Grimwade JE, Ryan VT, Leonard AC (2000) *Mol Microbiol* **35**: 835-844
59. Polaczek P, Kwan K, Liberics DA, Campbell JL (1997) *Mol Microbiol* **26**: 261-275
60. Messer W, Noyer-Weidner M (1988) *Cell* **54**: 735-737
61. Kimura T, Asai T, Imai M, Takanami M (1989) *Mol Gen Genet* **219**: 69-74
62. Murakami Y, Yoshiaki I (1999) *Front Biosci* **4**: D824-833
63. Hu YF, Hao ZL, Li R (1999) *Genes and Dev* **13**: 637-642
64. Amati BB, Gasser SM (1988) *Cell* **54**: 967-978

Organizacja i ewolucja genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* a problem sierocych otwartych ramek odczytu

Organisation and evolution of the genome of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the problem of ORFANs

PAWEŁ MACKIEWICZ

Spis treści:

- I. Znaczenie drożdży jako organizmu modelowego w analizie genomów eukaryotycznych
- II. Ogólna charakterystyka genomu *S. cerevisiae*
- III. Rozkład par GC w chromosomach drożdżowych
- IV. Klasyfikacja otwartych ramek odczytu
- V. Paradoks sierocych otwartych ramek odczytu
- VI. Charakterystyka innych elementów genetycznych w genomie drożdżowym
- VII. Duplikacje i ich rola w ewolucji genomu drożdżowego

Wykaz stosowanych skrótów: ORF (ang. *Open Reading Frame*) — otwarta ramka odczytu, ORFAN (ang. *orphan ORF*) — sieroca otwarta ramka odczytu, CAI (ang. *Codon Adaptation Index*) — współczynnik używalności kodonu.

I. Znaczenie drożdży jako organizmu modelowego w analizie genomów eukaryotycznych

Odczytanie sekwencji nukleotydowej pierwszego genomu eukaryotycznego — drożdży *Saccharomyces cerevisiae* stało się jednym z najważniejszych wydarzeń w postępie sekwencjonowania i analizie dużych genomów. Sekwencjonowanie rozpoczęto w 1989 r. w ramach programu European Community's Biotechnology Action Programme. W przedsięwzięciu tym uczestniczyło ponad 100 laboratoriów z Europy, USA, Kanady i Japonii. Pierwszą pełną sekwencję chromosomu III opublikowano w 1992 roku [1]. Sekwencja całego genomu została skompletowana na początku 1996 r., a udostępniona w bazach danych w kwietniu 1996 r. [2-4].

Contents:

- I. Meaning of the yeast as a model organism in analysis of eukaryotic genomes
- II. General description of the *S. cerevisiae* genome
- III. Distribution of GC pairs in yeast chromosomes
- IV. Classification of open reading frames
- V. Paradox of ORFANs
- VI. Description of other genetic elements in the yeast genome
- VII. Duplications and their role in evolution of the yeast genome

Drożdże *S. cerevisiae* są bardzo dobrym modelowym organizmem i dogodnym obiektem do badań w zakresie mechanizmów genetycznej kontroli metabolizmu eukaryotów [5, 6]. Poznanie sekwencji genomu drożdży stworzyło możliwości ich wykorzystania w badaniach innych genomów, w tym człowieka. Genom drożdży jest ponad 200 razy mniejszy od genomu ludzkiego i jest gęsto upakowany. Ze względu na konserwatywność ewolucyjną struktur i funkcji komórkowych, wiedza o tym gatunku umożliwi wyjaśnienie wielu procesów zachodzących u wyższych eukaryotów. Dla 31% białek drożdży znaleziono homologii wśród białek ssaków [6]. Stwierdzono, że wiele genów drożdży wykazuje znaczne podobieństwo do ludzkich genów związanych z powstawaniem różnych chorób [7-10], m.in. nowotworowych i neurologicznych.

Drożdże są organizmami jednokomórkowymi, ale pod względem złożoności budowy komórki nie różnią się od komórek wyższych organizmów. Ponadto charakteryzują się krótkim czasem generacji oraz łatwo rosną na różnych podłożach o ściśle zdefiniowanym składzie, co umożliwia uzyskanie dużej liczby osobników i łatwą kontrolę eksperymentu. Główną zaletą drożdży jest łatwość stosowania w badaniach nad nimi zarówno metod genetyki klasycznej, jak i molekularnej. Dlatego drożdże należą do

Dr, Instytut Mikrobiologii, Zakład Genetyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: pamac@angband.micromb.uni.wroc.pl

najlepiej scharakteryzowanych pod względem genetycznym organizmów. Stosunkowo wcześniej opracowano mapy fizyczne i genetyczne chromosomów drożdżowych.

II. Ogólna charakterystyka genomu *S. cerevisiae*

Jeżeli za definicję genomu przyjmujemy całkowitą informację genetyczną zapisaną w kwasach nukleinowych, to do genomu drożdżowego należy zaliczyć:

- genom jądrowy złożony z 16 chromosomów (o wielkości około 13 mln pz) [2-4, 13]. Najmniejszym jest chromosom I (230 tys. pz), a największym – chromosom XII (2 352 tys. pz, po uwzględnieniu sekwencji powtórzonych) — Tab. 1.
- genom mitochondrialny (o wielkości 86 tys. pz) zsekwencjonowany w fragmentach przez de Zamaroczy i Bernardi [11] i w całości przez Foury i współpr. [12]. Jest on dwuniciową kolistą cząsteczką DNA, występuje średnio w 50 kopiach (8-130), koduje aparat translacyjny oraz 15 % białek mitochondrialnych. Ponadto u wielu szczepów zidentyfikowano:
 - plazmid 2 μ (o wielkości 6.3 tys. pz) zsekwencjonowany w 1980 r., jest dwuniciową kolistą cząsteczką DNA o długości 2 μ m, występuje w jądrze komórkowym w 50-100 kopiach;

- różne wirusowe dwuniciowe RNA (o wielkości 1.8 do 4.6 tys. pz), występują w cytoplazmie od 10 do 170 kopii, niektóre kodują toksynę „killer”;
- kolisty jednociowy RNA (20S) kodujący RNA-zależną polimerazę RNA.

Wciąż uaktualniane wyniki analiz zgromadzone w bazach danych dostępnych przez Internet. Ważniejsze z nich przedstawiono w Tab. 2.

Wg bazy danych MIPS [14] wielkość zsekwencjonowanego chromosomalnego DNA wynosi: 12 069 tys. pz, wyłączając sekwencje powtórzone. Genom drożdżowy zawiera ponadto kilka regionów posiadających wielokrotnie powtórzone sekwencje, które nie zostały zsekwencjonowane w całości, a w bazach danych reprezentowane są przez co najmniej dwie kopie. Całkowita wielkość niezsekwencjonowanych regionów wynosi 1 323 tys. pz i obejmuje:

- 140 kopii rDNA (z chromosomu XII), każdy po 9 tys. pz,
- 2 kopie ENA2 (z chromosomu IV), każdy po 4 tys. pz,
- 13 kopii CUP1 (z chromosomu VIII), każdy po 2 tys. pz,
- po 2 kopie elementu Y' (z chromosomu IV i XII), każdy po 7 tys. pz,
- < 1 tys. pz sekwencji telomerowej z chromosomu VI.

W sumie całkowita wielkość jądrowego genomu drożdżowego wynosi 13 392 tys. pz.

Tabela 1

Wielkości chromosomów genomu drożdżowego

Chromosom	Długość [tys. pz]	Cytowanie
I	230	[40]
II	813	[8]
III	315	[1]
IV	1 532	[66]
V	577	[41]
VI	270	[64]
VII	1 091	[10]
VIII	563	[39]
IX	440	[57]
X	745	[29]
XI	666	[7]
XII	1 078	[72]
XIII	924	[56]
XIV	784	[31]
XV	1 091	[32]
XVI	948	[73]

Tabela 2

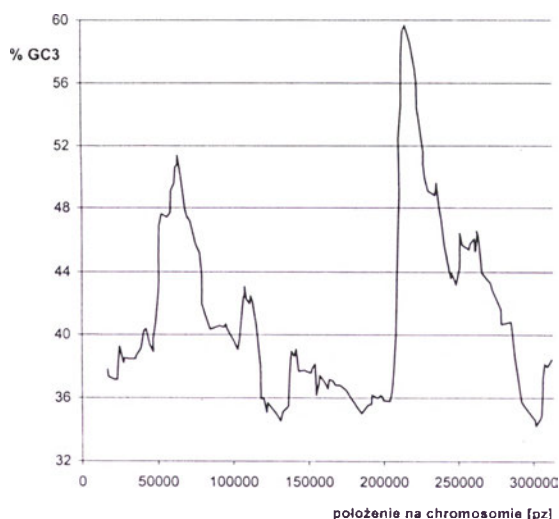
Bazy danych związane z genomem drożdżowym, dostępne przez Internet

Baza danych	Adres internetowy
MIPS — Munich Information Center for Protein Sequences	http://www.mips.biochem.mpg.de
SGD — Saccharomyces Genome Database	http://genome-www.stanford.edu
YPD — Yeast Proteome Database	http://www.proteome.com
GenBank, National Center for Biological Information (NCBI)	http://ncbi.nlm.nih.gov

III. Rozkład par GC w chromosomach drożdżowych

Średnia zawartość par GC w genomie wynosi 39%. Analizy sekwencji DNA chromosomów ujawniły występowanie mniej lub bardziej wyraźnej regionalnej zmienności w składzie par GC, szczególnie w trzeciej pozycji w kodonie (Ryc. 1), pole-

różna częstość rekombinacji w tych obszarach [23]. Rekombinacja jest procesem wymagającym naprawy DNA i może prowadzić do wzbogacania naprawianych regionów w pary GC [24]. Rekombinacja zachodzi najczęściej w obszarach międzygenowych, ale porekombinacyjna naprawa DNA może oddziaływać na skład GC w przyległych sekwencjach kodujących. W przypadku chromosomu III drożdży odkryto, że obszary bogate w GC (w środku ramieni chromosomu) pokrywają się z regionami o wysokiej częstości rekombinacji, a obszary bogate w AT (okolice centromeru i telomerów) z obszarami o niskim poziomie rekombinacji [25, 26]. Najwyraźniejszą regionalną zmienność i regularność w rozkładzie par GC zaobserwowano w pierwszych zsekwencjonowanych chromosomach: III i XI [1, 7, 15]. Jednakże taka organizacja nie jest regułą. Została ona potwierdzona jeszcze tylko dla II i VIII chromosomu [27]. Ponadto w chromosomie III i XI znaleziono korelacje między zawartością GC w trzecich pozycjach w kodonie a lokalną gęstością genów podobnie jak w chromosomach kręgowców [18, 19]. Zjawisko to nie jest jednak uniwersalne dla wszystkich chromosomów drożdżowych. B r a d n a m i współpr. [17] badając ponownie dystrybucję par GC w chromosomach drożdżowych nie potwierdzili (z wyjątkiem chromosomu III) okresowości w składzie GC w trzecich pozycjach kodonów (GC3) i korelacji między upakowaniem genów i składem GC3. Ich wyniki wskazują jednak, że zmienność w składzie GC3 nie jest całkowicie przypadkowa. Geny o podobnym składzie GC3 są zgrupowane w chromosomach, co można tłumaczyć krótkozasięgowymi korelacjami w składzie GC3 sąsiadujących genów. Wyjątkowość chromosomu III, wykazującego najwyraźniejsze trendy w składzie GC, może być związana z tym, że rekombinacje na tym chromosomie ograniczone są tylko do sekwencji determinujących typ płciowy (koniugacyjny) drożdży [17].



Ryc. 1. Procentowy udział par GC wzdłuż chromosomu III w trzecich pozycjach kodonów otwartych ramek odczytu.

gającej na występowaniu obszarów bogatych i ubogich w pary GC [2, 15-17]. Przypomina to organizację chromosomów wyższych eukariotów, stanowiących mozaikę regionów o różnym udziale par GC, zwanych izochorami [18, 19]. Izochora jest długim odcinkiem DNA (około 300 tys. pz) o stosunkowo jednolitym składzie zasad. Taka organizacja chromosomów może być związana z różną presją mutacyjną na obszarach replikowanych w różnym czasie cyklu komórkowego [20] lub ze zmniejszoną skutecznością napraw DNA w różnych regionach chromosomu [21, 22]. Innym wytłumaczeniem występowania takiej organizacji chromosomów jest

IV. Klasyfikacja otwartych ramek odczytu

Jedną z najbardziej zaskakujących i różniących cech jądrowego genomu drożdżowego, w porównaniu z organizmami wielokomórkowymi, jest mała ilość przestrzeni międzygenowych. Znaczną część (72%) sekwencji zajmują otwarte ramki odczytu, będące potencjalnymi sekwencjami kodującymi białko. ORF jest sekwencją DNA rozpoczynającą się kodonem start translacji (najczęściej ATG) i kończącą się jednym z trzech kodonów stop translacji (najczęściej TAA, TAG, TGA). Średnio co 2 tys. pz w genomie drożdży znajduje się ORF dłuższy lub równy 100 kodonom [2, 16].

Otwarte ramki odczytu ułożone są na chromosomach nierównomiernie. W większości chromosomów istnieją długie regiony (kilkadziesiąt tys. pz) bogate w sekwencje kodujące, rozdzielone zwykle krótszymi regionami o mniejszej gęstości kodowania. Na ogół regiony położone przy centromerach i telomerach charakteryzują się mniejszą liczbą genów.

W genomie *S. cerevisiae* zidentyfikowano ponad 6000 otwartych ramek odczytu [2, 16]. Wg bazy MIPS wszystkich zidentyfikowanych potencjalnych genów jest 6361, z tego 28 znajduje się w genomie mitochondrialnym. W projekcie genomu drożdżowego przyjęto analizować i uwzględniać otwarte ramki odczytu dłuższe niż 100 kodonów [1, 7] w celu uniknięcia dużej liczby przypadkowych i niekodujących krótkich ramek, bowiem prawdopodobieństwo pojawienia się przypadkowych sekwencji kodujących, dłuższych niż 300 pz, jest bardzo małe [28]. Jednakże w genomie drożdżowym istnieją kodujące otwarte ramki odczytu, krótsze niż 100 kodonów [29-32]. Wg bazy MIPS jest ich 178. Identyfikuje się je eksperymentalnie, na podstawie odpowiadających transkryptów [33], poszukując homologii do znanych genów lub przez analizy komputerowe [34-37]. Analizy te wykorzystują kryterium długości i homologii oraz regularności i reguły w składzie aminokwasowym i kodonowym (np. współczynnik CAI). Przed zastosowaniem tych programów do rozpoznawania sekwencji kodujących, „uczy się” je najpierw odróżniania zbioru znanych genów od wygenerowanych komputerowo sekwencji niekodujących. Program GenMark wykorzystano do identyfikacji regionów kodujących w chromosomie VI [34]. Fondrat i Kalogeropoulos [38] zastosowali do rozpoznawania funkcjonalnych genów na chromosomie III metodę opartą na identyfikowaniu w obszarze promotora sekwencji regulacyjnych, oddziaływujących z aktywatorami. Z analizy generalnie wykluczano

krótkie otwarte ramki odczytu znajdujące się w obrębie innych dłuższych ramek. W przypadku, gdy ramki zachodziły na siebie fragmentami pozostawiano ramki dłuższe lub takie, które miały już określoną funkcję, wykazywały wyraźną homologię do znanych genów, albo ich współczynnik używalności kodonów był bardziej zbliżony do CAI genów drożdżowych o znanej ekspresji [1, 7, 39-41]. Przyjęto, że otwarte ramki odczytu krótsze niż 150 kodonów i posiadające CAI < 0,11 nie kodują [7].

Dominującą część genów kodujących białka w genomie drożdżowym stanowią sekwencje niepodzielone. Geny zawierające introny i eksony stanowią zaledwie 3.5% wszystkich potencjalnych genów kodujących białka (wg bazy MIPS 224 geny). Większość z nich stanowią geny kodujące białka rybosomalne [30], a introny są zwykle krótkie i zlokalizowane blisko kodonu start translacji, często go rozdzielając. Dzięki wysokiej konserwatywności miejsc rozdzielających introny i eksony w genomie drożdżowym możliwe jest stosunkowo proste komputerowe identyfikowanie intronów [42].

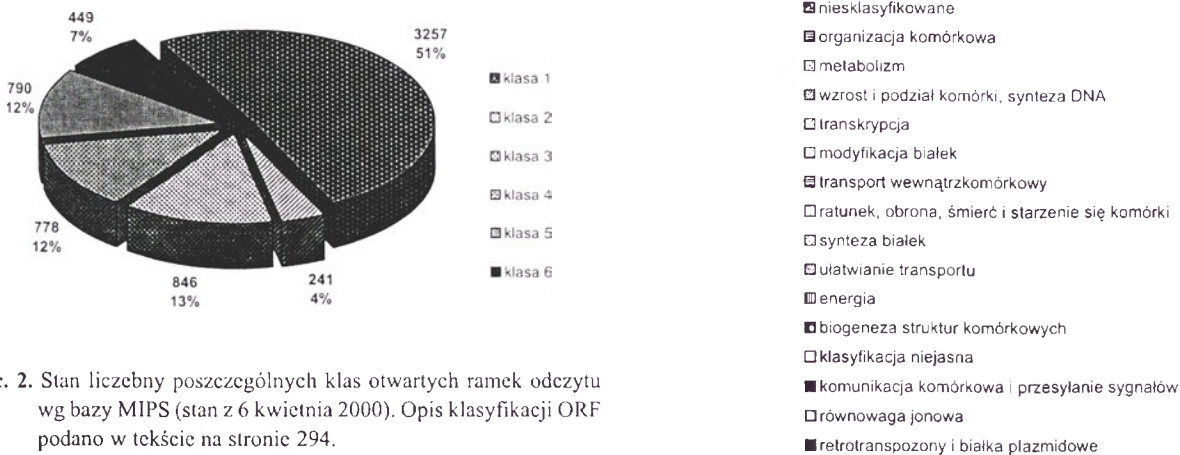
W zależności od podobieństwa ich sekwencji aminokwasowych do innych białek o znanej lub nieznannej funkcji zbiór otwartych ramek odczytu został podzielony na sześć klas wg klasyfikacji bazy MIPS [4]. Do określania podobieństwa wykorzystywano program FASTA [43], a jako miarę podobieństwa przyjęto wartość „optimised score” (ze względu na brak odpowiedników tych terminów w języku polskim pozostawiono ich oryginalną pisownię). Ponadto w klasyfikacji uwzględniono występowanie motywów funkcjonalnych w białkach i dane eksperymentalne.

Wydzielono następujące klasy:

- **klasa 1** — znane geny, sekwencje kodujące białka o znanej funkcji, dobrze scharakteryzowane genetycznie i biochemicznie;
- **klasa 2** — sekwencje o wysokim podobieństwie do genów; „score” > 1/3 „selfscore” (czyli „score” dla białka porównanego ze sobą samym);
- **klasa 3** — sekwencje o średnim („score” między 200 a 1/3 „selfscore”) lub słabym podobieństwie do genów („score” od 100 do 200);
- **klasa 4** — sekwencje o podobieństwie do nieznanymi białek;
- **klasa 5** — sekwencje nie wykazujące podobieństw do genów;
- **klasa 6** — sekwencje kwestionowane; nie wykazujące podobieństwa do innych sekwencji, sklasyfikowane na podstawie niskich wartości CAI i małej długości oraz częściowego zachodzenia na dłuższe otwarte ramki odczytu lub znane geny [7].

Stan liczebności klas przedstawiono na Ryc. 2.

ORF z klasy 6, stanowiące 7% wszystkich sekwencji najprawdopodobniej nie kodują i są przypadkowymi otwartymi ramkami odczytu [7, 16]. Przepuszczalna liczba sekwencji kodujących jest prawdopodobnie zawyżona o kilka procent [32]. Po uwzględnieniu tej poprawki, przyjmowana przez wielu autorów liczba kodujących otwartych ramek odczytu w genomie drożdżowym, oceniana jest na 5800-6000 [2-4, 16].

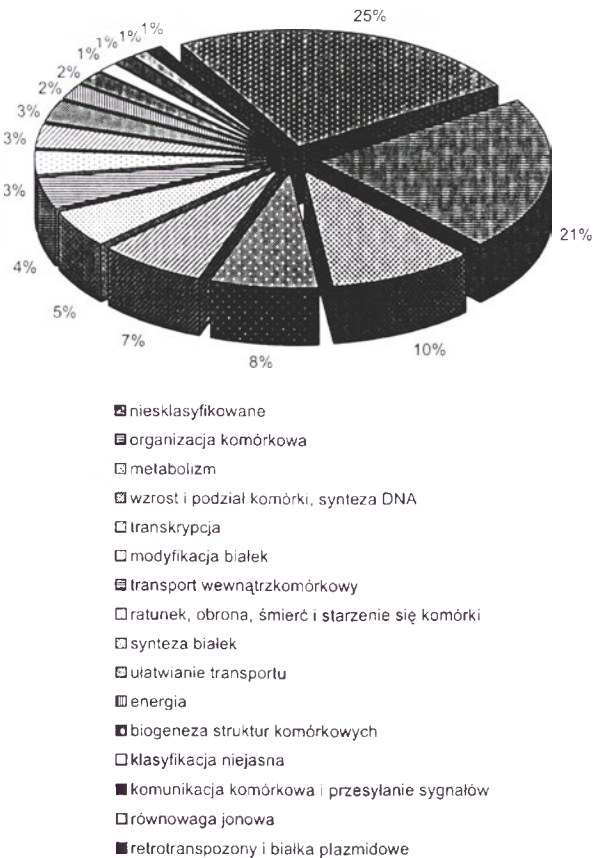


Ryc. 2. Stan liczebny poszczególnych klas otwartych ramek odczytu wg bazy MIPS (stan z 6 kwietnia 2000). Opis klasyfikacji ORF podano w tekście na stronie 294.

Ponad połowa sekwencji (klasa 1) ma funkcję określoną eksperymentalnie. Ponad 17% (sekwencje z klasy 2 i 3) wykazuje mniej lub bardziej wyraźną homologię do znanych białek. Natomiast około 25% sekwencji (z klasy 4 i 5) zwanych jest sierocymi otwartymi ramkami odczytu, czyli ORFAN, ponieważ nic nie wiadomo nawet o przybliżonej ich funkcji. Sekwencje z klasy 5 są pojedynczymi ORFAN, bo nie posiadają żadnych homologów [16]. Natomiast sekwencje z klasy 4, zwane bliźniaczymi ORFAN, są otwartymi ramkami odczytu sierocymi w parach lub rodzinach, ponieważ posiadają homologi, ale również o nieznannej funkcji, będące wobec tego też sierocymi otwartymi ramkami odczytu [16].

Produkty wielu otwartych ramek odczytu przypisano do kategorii funkcjonalnych, określających przynajmniej w przybliżeniu ich rolę w komórce [4]. Dokonano tego w oparciu o analizy komputerowe, homologię do białek o znanej funkcji, obecność specyficznych motywów, bloków i domen funkcjonalnych, przynależność do rodzin białek oraz dane eksperymentalne.

Obecnie (wg MIPS) wyróżniono 14 głównych i wiele mniejszych kategorii funkcjonalnych, a 3725 otwartych ramek odczytu przypisano do przynajmniej jednej z nich. Podział na główne kategorie funkcjonalne przedstawiono na Ryc. 3. Dla 25% ORF nie udało się przypisać funkcji.



Ryc. 3. Podział otwartych ramek odczytu na główne kategorie funkcjonalne wg bazy MIPS (stan z 6 kwietnia 2000).

V. Paradoks sierocych otwartych ramek odczytu

Wraz ze wzrostem liczby nowo odkrywanych genów i rozwojem projektów sekwencjonowania genomów frakcja sierocych otwartych ramek odczytu, sekwencji bez znanej funkcji lub homologii do innych genów powinna maleć, natomiast obserwuje się jej wzrost [16, 44]. Zjawisko to określono tzw. tajemnicą (paradoksem) ORFAN. Stanowią one około 30% wszystkich ORF nie tylko w genomie drożdżowym, ale również w innych genomach. Na pozór wydaje się, że występowanie ORFAN wynika ze zbyt małej liczby sekwencji obecnych w bazach danych lub zbyt mało czułych i efektywnych algorytmów oraz programów komputerowych poszukujących homologii. Jednakże po ponownym przeszukaniu baz w celu znalezienia homologów, sieroce otwarte ramki odczytu w wielu genomach nadal się wykrywa [45]. O z i e r - K a l o g e r o p o u l o s i w s p ó ł p r . [46] znaleźli homologi dla zaledwie 85 ORFAN *S. cerevisiae* wśród niekompletnego zbioru otwartych ramek odczytu blisko spokrewnionego gatunku *Kluyveromyces lactis* i sugerują, że wiele spośród ORFAN po-

zostanie bez homologów nawet po całkowitym zsekwencjonowaniu *K. lactis*.

Z powodu braku istotnych homologii do innych sekwencji, wielu autorów skłania się do poglądu, że ORFAN są przedstawicielami nowych nieznanymi nadrodzin białek lub szybko ewoluujących genów [16, 45]. Jedną z tych grup miałyby być geny specyficzne dla drożdży [46]. Jednakże niemal każdy ORFAN, nie tylko drożdżowy, jest specyficzny (z wyjątkiem ORFAN w parach lub w rodzinach) i każdy z nich musiałby być przedstawicielem nowej nadrodziny białek. Liczba tych nadrodzin powinna być wielokrotnie większa niż do tej pory przyjmowano i, co więcej, nadrodziny te powinny być bardzo zróżnicowane między sobą i odległe ewolucyjnie od znanych [45]. Dlatego sądzi się, że ORFAN mogą być pozostałościami po nie funkcjonujących już genach albo pseudogenami lub przypadkowymi, błędnie zidentyfikowanymi otwartymi ramkami odczytu nie ulegającymi ekspresji [2, 7, 45]. Występowanie przypadkowych ORF i nie mających homologów w genomie drożdżowym zasygnalizowali Terrier i Kalogeropoulos [36], Andrade i wspólnie [37] oraz Das i wspólnie [47]. Są to przede wszystkim najkrótsze otwarte ramki odczytu w zbiorze ramek dłuższych niż 100 kodonów [48]. Jednakże nawet po ich odrzuceniu pozostają ORFAN wśród długich ORF [45]. Inne wytłumaczenie tajemnicy ORFAN przedstawili Cebrot i wspólnie [49, 50]. Paradoks ORFAN zostaje łatwo rozwiązany przy założeniu, że szacowana liczba kodujących ORF jest mniejsza od powszechnie przyjmowanej (5800-6000) i wynosi około 4800 [51], a około 1000 ORFAN (niesłusznie uważanych za kodujące) po prostu nie koduje i zostało wygenerowanych przez sekwencje kodujące [48]. Wyjaśnienie to bierze pod uwagę fakt, że kod genetyczny i sekwencje kodujące posiadają pewne właściwości zwiększające prawdopodobieństwo pojawienia się w nici antysensownej długich niekodujących ORF [52, 53]. Znaczna część ORFAN była wcześniej takimi zachodzącymi otwartymi ramkami odczytu, które pozostały po duplikacjach regionów chromosomów i wyeliminowaniu przez mutacje właściwych ramek odczytów generujących je genów. Potwierdzeniem tego są znalezione istotne homologie wielu ORFAN czytanych w antysensie do znanych białek [48]. Hipoteza ta jest również zgodna z dowodami na częste duplikacje i rearanżacje w genomie drożdżowym [54].

Przy tym założeniu, niezależnie od przyjętej definicji ORFAN, ich liczba jest dużo mniejsza (o kilkanaście procent) niż zakładają to inni autorzy [1, 16, 44].

VI. Charakterystyka innych elementów genetycznych w genomie drożdżowym

W genomie drożdżowym zidentyfikowano ponadto geny kodujące RNA i inne elementy genetyczne, jak:

- 299 genów kodujących tRNA, z tego 24 geny w genomie mitochondrialnym;
- 80 genów kodujących mały jądrowy RNA (snRNA), który w połączeniu z białkami pośredniczy i reguluje procesowanie RNA;
- 140 genów na chromosomie XII kodujących rybosomalny RNA (rRNA);
- 104 elementy Ty — retrotranspozony, ruchome elementy genetyczne, organizacją i funkcją przypominające zwierzęce retrowirusy;
- długie powtórzenia terminalne (LTRs — *long terminal repeats*) w 368 kopiach: flankujące z obu stron istniejące transpozony (Ty-LTRs). Występują one pojedynczo (solo-LTRs) lub niekompletnie i są śladami po wcześniejszych transpozycjach i wbudowanych transpozonach;
- 31 elementów subtelomerowych X, będącymi prawdopodobnie pozostałościami sekwencji LTR z nowej klasy transpozonów Ty5;
- 21 elementów subtelomerowych Y', odpowiadających długim rozproszonym sekwencjom powtarzającym się (LINE) w genomach ssaków [55]; elementy te były prawdopodobnie dawniej transpozonami i zawierają sekwencje, które kiedyś kodowały helikazę RNA [55];
- 32 powtórzenia telomerowe (C₁₋₃A);
- 16 centromerów zawierających konserwatywne motywy;
- 750 autonomicznie replikujących się sekwencji (ARS — *autonomously replicating sequence*);
- pseudogeny; większość z nich zlokalizowana jest w regionach subtelomerowych [40, 56, 57]; wykazują one homologie do znanych genów i posiadają wewnętrzny kodon stop lub przesunięcie ramki odczytu, mogą być pozostałościami po licznych duplikacjach, które miały miejsce w genomie. Mogą one też być wynikiem błędów sekwencjonowania.

VII. Duplikacje i ich rola w ewolucji genomu drożdżowego

Jedną z interesujących cech genomu drożdży jest obecność stosunkowo dużej liczby ORF występujących w identycznych lub bardzo podobnych kopiach w różnych chromosomach. W genomie znaleziono wiele dużych zduplikowanych regionów chro-

mosomów [4, 31, 39, 54, 58-60] zwanych CHRs — *Cluster Homology Regions* [3].

Do dobrze znanych regionów o wysokim podobieństwie należą końce chromosomów. Na wielu chromosomach w regionach subtelomerowych występują często prawie identyczne duże bloki sekwencji (o wielkości kilkadziesiąt tys. pz) zawierające kilka otwartych ramek odczytu, co świadczy o niedawnej i prawie nieprzerwanej wymianie odcinków między chromosomami w tych regionach [55]. Od dawna wiadano o rodzinach wielogenowych (geny SUC, MAL i MEL) występujących przede wszystkim na końcach chromosomów w wielu kopiach niekoniecznie ulegających ekspresji [61-63]. Wysunięto przypuszczenie, że akumulacja nadmiarowych sekwencji zachodziła głównie na małych chromosomach (np. chromosomie I i VI) w celu zwiększenia rozmiarów i poprawienia właściwego rozdziału i stabilności chromosomów podczas podziału mitotycznego i mejotycznego [40, 64, 65].

Wiele zduplikowanych obszarów występuje w regionach przycentromerowych i w częściach środkowych ramion różnych chromosomów [29, 31, 32, 39, 56, 58, 66]. Znalezione 55 takich regionów, w których zidentyfikowano 376 par homologicznych genów [54]. Prawdopodobnie istnieje jeszcze więcej, mniejszych zduplikowanych regionów [67]. Szacuje się, że pary genów, które powstały drogą duplikacji stanowią 16% wszystkich genów drożdżowych [68]. Wiele homologicznych regionów posiada geny ułożone w tym samym porządku i tym samym kierunku transkrypcji. Średnia wielkość zduplikowanego regionu wynosi 55 tys. pz i zawiera średnio 6.9 zduplikowanych par genów. Zaskakujące jest to, że 50 (z 55) bloków posiada taką samą (konserwatywną) orientację w stosunku do centromeru [54].

Zduplikowane regiony mogły powstać przez wiele kolejnych, niezależnych duplikacji, albo jednocześnie przez pojedynczą duplikację całego genomu [54]. Ohno [69] zwrócił uwagę na dużą rolę duplikacji całego genomu jako mechanizmu ewolucyjnego. W oparciu o ewolucyjne badania białek histonowych zaproponowano teorię poliploidalnego pochodzenia genomu drożdżowego [70].

W tym przypadku dalszymi etapami ewolucji genomu, która doprowadziła do powstania mozaiki zduplikowanych bloków, byłyby wzajemne translokacje pomiędzy chromosomami oraz utrata prawie 85% zduplikowanych, zbytecznych genów [54]. Zachowane zostały prawdopodobnie geny o wysokim poziomie ekspresji i nowej funkcji dla organizmu [68]. Genom drożdżowy byłby wobec tej teorii zdegenerowanym tetraploidem. Duplikacja genomu

drożdży nastąpiła najprawdopodobniej po dywergencji rodzaju *Saccharomyces* i *Kluyveromyces* około 100 mln lat temu. Mogła ona umożliwić adaptację do życia w warunkach beztlenowych i być związana z intensywnym rozwojem roślin okrytonasiennych wytwarzających owoce, stanowiących pożywkę dla drożdży [54]. Duplikacja genów odgrywa ważną rolę w ewolucji i umożliwia ewolucyjną modyfikację jednej z kopii genu bez niszczenia funkcji drugiej.

Kolejnym etapem analizy genomu drożdżowego jest identyfikowanie funkcji znalezionych potencjalnych otwartych ramek odczytu zarówno metodami komputerowymi, jak i eksperymentalnymi. W tym celu stworzono program EUROFAN (European Functional Analysis Network) [71], którego celem jest systematyczna analiza funkcji i odkrywanie nowych genów.

Podziękowania

Praca była finansowana przez grant KBN nr 6PO4A 025-18. Serdecznie dziękuję panu Stanisławowi Cembratowi za cenne rady udzielone podczas pisania niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 11 maja 2000 r.

Zaakceptowano do druku 15 października 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Oliver SG, van der Aart QJM, Agostoni-Carbone ML, Aigle M, Alberghina L, Alexandraki D, Antoine G, Anwar R, Ballesta JPG, Benit P i współr. (1992) *Nature* 357: 38-46.
2. Goffeau A, Barreil BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M i współr. (1996) *Science* 274: 546-567.
3. Goffeau A, Aert R, Agostoni-Carbone ML, Ahmed A, Aigle M, Alberghina L, Albermann K, Albers M, Aldea M, Alexandraki D i współr. (1997) *Nature* 387: 5-105.
4. Mewes HW, Albermann K, Bähr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maierl A, Oliver SG, Pfeiffer F, Zollner A (1997) *Nature* 387: 7-8.
5. Rytka J, Palamarczyk G (1993) *Post Biochem* 39: 152-155.
6. Botstein D, Chervitz SA, Cherry JM (1997) *Science* 277: 1259-1260.
7. Dujon B, Alexandraki D, Andre B, Ansorge W, Baladron V, Ballesta JPG, Banrevi A, Bolle PA, Bolotin-Fukuhara M, Bossier P i współr. (1994) *Nature* 369: 371-378.
8. Feldmann H, Aigle M, Aljinovic G, Andre B, Baclet MC, Barthe C, Baur A, Becam AM, Biteau N, Boles E i współr. (1994) *EMBO J* 13: 5795-5809.
9. Bassett DE Jr, Boguski MS, Hieter P (1996) *Nature* 379: 589-590.
10. Tettelin H, Agostoni Carbone ML, Albermann A, Albers M, Arroyo J, Backes U, Barreiros T,

- Bertani I, Bjourson AJ, Brückner M i współpr. (1997) *Nature* **387**: 81-84.
11. De Zamaroczy M, Bernardi G (1986) *Gene* **47**: 155-177.
 12. Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) *FEBS Letters* **440**: 325-331.
 13. Zagulski M, Herbert CJ, Rytka J (1998) *Acta Biochim Pol* **45**: 627-643.
 14. Mewes HW, Frishman D, Gruber C, Geier B, Haase D, Kaps A, Lemcke K, Mannhaupt G, Pfeiffer F, Schuller C, Stocker S, Weil B (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 37-40.
 15. Sharp PM, Lloyd AT (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 179-183.
 16. Dujon B (1996) *Trends Genet* **12**: 263-270.
 17. Bradnam KR, Seoighe C, Sharp PM, Wolfe KH (1999) *Mol Biol Evol* **16**: 666-675.
 18. Bernardi G (1993a) *Gene* **135**: 57-66.
 19. Bernardi G (1993b) *Mol Biol Evol* **10**: 186-204.
 20. Wolfe KH, Sharp PM, Li WH (1989) *Nature* **337**: 283-285.
 21. Filipinski J (1988) *J Theor Biol* **134**: 159-164.
 22. Boulikas T (1992) *J Mol Evol* **35**: 156-180.
 23. Eyre-Walker A (1993) *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **252**: 237-243.
 24. Brown TC, Jiricny J (1988) *Cell* **54**: 705-711.
 25. Zenvirth D, Arbel T, Sherman A, Goldway M, Klein S, Simchen G (1992) *EMBO J* **11**: 3441-3447.
 26. Baudat F, Nicolas A (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5213-5218.
 27. Sharp PM, Averof M, Lloyd AT, Matassi G, Peden F (1995) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **349**: 241-247.
 28. Sharp PM, Cowe E (1991) *Yeast* **7**: 657-678.
 29. Galibert P, Alexandraki D, Baur A, Boles E, Chalwatzis N, Chuat JC, Coster F, Cziepluch C, De Haan M, Domdey H i współpr. (1996) *EMBO J* **15**: 2031-2049.
 30. Planta RJ, Goncalves PM, Mager WH (1996) *Biochem Cell Biol* **73**: 825-834.
 31. Philippssen P, Kleine K, Pöhlmann R, Dusterhöft A, Hamberg K, Hegemann JH, Obermaler B, Urrestarazu LA, Acrt R, Albermann K i współpr. (1997) *Nature* **387**: 93-98.
 32. Dujon B, Albermann K, Aldea M, Alexandraki D, Ansorge W, Arino J, Benes V, Bohn C, Bolotin-Fukuhara M, Bordonne R i współpr. (1997) *Nature* **387**: 98-102.
 33. Olivas WM, Muhlrud D, Parker R (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 4619-4625.
 34. Hagiwara H, Naitou M, Shibata T, Hanaoka F, Eki T, Murakami Y (1995) *DNA Res* **2**: 247-253.
 35. Barry C, Fichant G, Kalogeropoulos A, Quentin Y (1996) *Yeast* **12**: 1163-1178.
 36. Termier M, Kalogeropoulos A (1996) *Yeast* **12**: 369-384.
 37. Andrade MA, Daruvar A, Casari G, Schneider R, Termier M, Sander C (1997) *Yeast* **13**: 1363-1374.
 38. Fondrat C, Kalogeropoulos A (1994) *Curr Genet* **25**: 396-406.
 39. Johnston M, Andrews S, Brinkman R, Cooper J, Ding H, Dover J, Du Z, Favello A, Fulton L, Gattung S i współpr. (1994) *Science* **265**: 2077-2082.
 40. Bussey H, Kaback DB, Zhong W, Vo DT, Clark MW, Fortin N, Hall J, Ouellette BF, Keng T, Barton AB i współpr. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3809-3813.
 41. Dietrich FS, Mulligan J, Hennessy K, Yelton MA, Allen E, Araujo R, Aviles E, Berno A, Brennan T, Carpenter J i współpr. (1997) *Nature* **387**: 78-81.
 42. Kalogeropoulos A (1995) *Yeast* **11**: 555-565.
 43. Pearson WR, Lipman DJ (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2444-2448.
 44. Casari G, de Druvar A, Sander C, Shneider R (1996) *Trends Genet* **12**: 244-255.
 45. Fischer D, Eisenberg D (1999) *Bioinformatics* **15**: 759-762.
 46. Ozier-Kalogeropoulos O, Malpertuy A, Boyer J, Tekai F, Dujon B (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 5511-5524.
 47. Das S, Yu L, Galtatzes C, Rogers R, Freeman J, Bienkowska J, Adams RM, Smith TF (1997) *Nature* **385**: 29-30.
 48. Mackiewicz P, Kowalczyk M, Gierlik A, Dudek MR, Cebrat S (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 3503-3509.
 49. Cebrat S, Dudek MR, Mackiewicz P (1997) *J Appl Genet* **38**: 365-372.
 50. Cebrat S, Dudek MR, Mackiewicz P (1998) *Theory in BioSciences* **117**: 78-89.
 51. Kowalczyk M, Mackiewicz P, Gierlik A, Dudek MR., Cebrat S (1999) *Yeast* **15**: 1031-1034.
 52. Cebrat S, Dudek MR (1996) *Trends Genet* **12**: 12.
 53. Cebrat S, Mackiewicz P, Dudek MR (1998) *Biosystems* **42**: 165-176.
 54. Wolfe KH, Shields DC (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708-713.
 55. Louis EJ (1995) *Yeast* **11**: 1553-1573.
 56. Bowman S, Churcher C, Badcock K, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Dedman K, Devlin K, Gentles S, Hamlin N i współpr. (1997) *Nature* **387**: 90-93.
 57. Churcher C, Bowman S, Badcock K, Bankier A, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Devlin K, Gentles S, Hamlin N i współpr. (1997) *Nature* **387**: 84-87.
 58. Lalo D, Stettler S, Mariotte S, Słonimski PP, Thuriaux CR (1993) *Acad Sci Paris* **316**: 367-373.
 59. Feuermann M, de Montigny J, Potier S, Souciet JL (1997) *Yeast* **13**: 861-869.
 60. Seoighe C, Wolfe KH (1999) *Gene* **238**: 253-261.
 61. Carlson M, Celenza JL, Eng FJ (1985) *Mol Cell Biol* **5**: 410-419.
 62. Charron MJ, Read E, Haut SR, Michels SA (1989) *Genetics* **122**: 307-316.
 63. Naumov GI, Naumova ES, Louis EJ (1995) *Yeast* **11**: 481-483.
 64. Murakami Y, Naitou M, Hagiwara H, Shibata T, Ozawa M, Sasanuma S, Sasanuma M, Tsuchiya Y, Soeda E, Yokoyama K i współpr. (1995) *Nature Genet* **10**: 261-268.
 65. Oliver SG (1995) *Nature Genet* **10**: 253-254.
 66. Jacq C, Alt-Mörbe J, Andre B, Arnold W, Bahr A, Ballesta JPG, Barges M, Baron L, Becker A, Biteau N i współpr. (1997) *Nature* **387**: 75-78.
 67. Seoighe C, Wolfe KH (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4447-4452.
 68. Seoighe C, Wolfe KH (1999) *Curr Opin Microbiol* **2**: 548-554.
 69. Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. George Allen and Unwin, London.
 70. Smith MM (1987) *J Mol Evol* **24**: 252-259.
 71. Oliver SG (1996) *Trends Genet* **12**: 241-242.
 72. Johnston M, Hillier L, Riles L, Albermann K, Andre B, Ansorge W, Benes V, Brückner M, Declius H, Dubois E i współpr. (1997) *Nature* **387**: 87-90.
 73. Bussey H, Storms RK, Ahmed A, Albermann K, Allen A, Ansorge W, Araujo R, Aparicio A, Barrell B, Badcock K i współpr. (1997) *Nature* **387**: 103-105.

Wzajemna regulacja translacji mitochondrialnej i translacji cytoplazmatycznej u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Interrelationship between the mitochondrial and cytosolic translation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

AGATA KONOPIŃSKA¹, MAGDALENA BOGUTA²

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Składniki cytoplazmatycznego aparatu translacji związane z oddychaniem komórkowym
 - II-1. Czynniki terminacji translacji eRF1 i eRF3
 - II-2. Czynniki inicjacji translacji eIF-4A
 - II-3. Białko rybosomalne S18
 - II-4. Białko Qsr1
- III. Białka związane z biogenezą mitochondriów, a zarazem z ekspresją genów jądrowych
 - III-1. Białko Nam7/Upf1
 - III-2. Białko Nam8
 - III-3. Wybrane białka rybosomów mitochondrialnych
- IV. Białka biorące bezpośredni udział w translacji mitochondrialnej i cytoplazmatycznej
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Components of cytosolic translational apparatus involved in respiration
 - II-1. Translation release factors eRF1 and eRF3
 - II-2. Translation initiation factor eIF-4A
 - II-3. Ribosomal protein S18
 - II-4. Ribosomal protein Qsr1
- III. Proteins involved in mitochondrial biogenesis and expression of nuclear genes
 - III-1. Nam7/Upf1 protein
 - III-2. Nam8 protein
 - III-3. Some mitochondrial ribosomal protein
- IV. Proteins involved directly in both the mitochondrial and cytosolic translation
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: białka mrp — białka rybosomów mitochondrialnych; cyt-mRNA — cytoplazmatyczny mRNA; Nam7p, Cox3p — białko kodowane przez gen *NAM7*, *COX3* itd.; mit-mRNA — mitochondrialny mRNA; mtDNA — mitochondrialny DNA; ORF — otwarta ramka odczytu; pre-mRNA — prekursorowy (nieodojrzały) mRNA; 5' (lub 3') UTR — region mRNA niepodlegający translacji; pz — para zasad w DNA; cs — chładowrażliwość; ts — termowrażliwość.

I. Wstęp

Mitochondria nazywane są organellami autonomicznymi, ponieważ mają własny genom i własny aparat ekspresji genów. Jednak prawie wszystkie białka uczestniczące w ekspresji genomu mitochondrialnego są kodowane przez genom jądrowy. Jak dotąd zidentyfikowano ok. 80 genów jądrowych biorących bezpośredni udział w translacji mitochon-

drialnej (na podstawie danych z komputerowej bazy MIPS). Produkty tych genów to: białka rybosomów mitochondrialnych (mrp), mitochondrialne syntetazy aminoacylo-tRNA oraz czynniki translacyjne (Ryc. 1). Wśród tych ostatnich znajdują się specyficzne dla inicjacji translacji w mitochondriach aktywatory, wiążące się z 5' UTR mit-mRNA, rybosomami i wewnętrzną błoną mitochondrialną i odpowiedzialne prawdopodobnie za specjalizację translacji mitochondrialnej w kierunku syntezy silnie hydrofobowych białek błonowych [1, 2]. Wiadomo jednak, że jądrowych genów kodujących składniki mitochondrialnej maszyny translacyjnej jest znacznie więcej niż 80. Ilość samych białek mrp szacuje się obecnie na ponad 100 [3].

W mitochondriach przebiega wiele procesów metabolicznych, lecz genom mitochondrialny koduje wyłącznie kilka białek wchodzących w skład kompleksów odpowiedzialnych za oddychanie i oksydacyjną fosforylację. Stąd skutkiem upośledzonej ekspresji genów mitochondrialnych, włączając zaburzenia w mitochondrialnej translacji, jest defekt odde-

¹Dr, ²doc. dr hab. Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02 106 Warszawa.

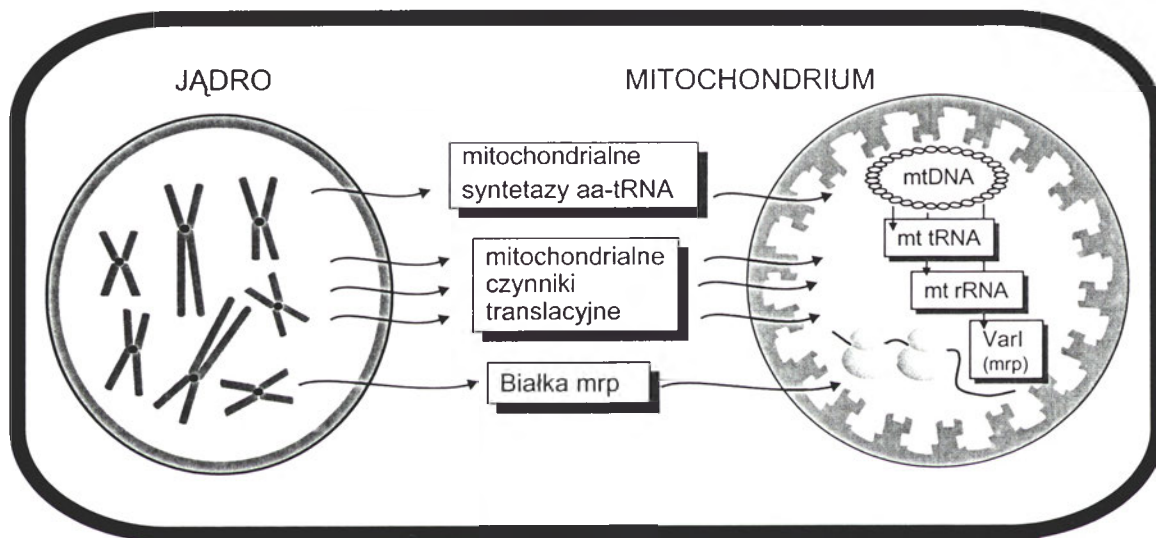
chowy. Utrzymanie w komórce stanu kompetencji oddechowej wymaga, poza sprawnym działaniem systemu ekspresji genomu mitochondrialnego, jeszcze wielu innych aktywności, jak import białek do mitochondriów, składanie błonowych kompleksów oddechowych czy specyficzna proteoliza.

Związek między ekspresją genów jądrowych a translacją w mitochondriach ujawnił się w badaniach nad pewnymi klasami mutantów drożdżowych, które

mit⁻ oraz około 200 różnych genów *PET* (na podstawie danych z komputerowej bazy danych MIPS). Zarówno klonowanie supresorów mutacji *mit⁻*, jak i poszukiwanie dzikich genów *PET* przez komplementację mutacji *pet*, prowadzi do identyfikacji genów regulujących (pośrednio lub bezpośrednio) biogenezę mitochondriów.

Komunikacja pomiędzy mitochondriami a jądrem komórkowym jest przedmiotem zainteresowania

Geny translacji mitochondrialnej



Ryc. 1. Udział genomu jądrowego i mitochondrialnego w kodowaniu białek zaangażowanych w system translacji mitochondrialnej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrialne syntetazy tRNA, czynniki translacyjne i białka rybosomalne (prócz jednego) są kodowane w DNA chromosomalnym, syntetyzowane w cytoplazmie i transportowane do mitochondriów. Komplet tRNA, rRNA oraz jedno białko rybosomalne Var1 są kodowane przez DNA mitochondrialny

utraciły zdolność do pozyskiwania energii przez oddychanie. Mutanty takie nie potrafią wykorzystywać niefermentowalnych związków węgla: glicerolu, etanolu, mleczanów, octanów, a ich fenotyp polega na braku wzrostu na podłożach zawierających takie związki jako jedyne źródło węgla i energii, przy czym zdolność do wzrostu na pożywkach z fermentowalnymi źródłami węgla zostaje zachowana. W opisanych niżej badaniach wykorzystano przede wszystkim dwie szczególne klasy mutantów oddechowych: *mit⁻* i *pet*. Mutacje *mit⁻* są zmianami punktowymi lub niewielkimi delecjami w genach kodowanych przez mtDNA. W mutantach *pet* zmienione są natomiast geny *PET* kodowane w DNA chromosomalnym, które odpowiadają za funkcjonowanie mitochondrialnego systemu oddechowego. Obecnie znanych jest 37 grup komplementacji dla mutacji

biologów od ponad trzydziestu lat. Jednym z aspektów tego zagadnienia jest wzajemna regulacja translacji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej. Fizjologiczne znaczenie takiej wzajemnej regulacji wynika z potrzeby przystosowania metabolizmu komórki do warunków środowiska. Aktywność translacji mitochondrialnej determinuje tworzenie zasobów energetycznych komórki w warunkach, gdy nie są dostępne substraty katabolizowane przez fermentację. Szeroko rozumiany metabolizm komórki musi dostosować się do podaży energii.

W niniejszym opracowaniu omówiono wszystkie znane autorkom wyniki uzyskane w badaniach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, które świadczą o istnieniu wzajemnych powiązań między systemami translacji w cytoplazmie i w mitochondriach.

II. Składniki cytoplazmatycznego aparatu translacji związane z oddychaniem komórkowym

Istnieje koncepcja objaśniająca negatywny wpływ aktywnego procesu oddychania na wierność translacji cytoplazmatycznej. Opiera się ona na obserwacjach, że pewne klasy supresorów mutacji *nonsense* w genach jądrowych (np. supresorowe tRNA lub niektóre allele *sup35* i *sup45* — patrz niżej) działają bar-

stanowią niektóre geny kodujące syntetazy aminocylo-tRNA oraz pewne geny odpowiadające za biosyntezę tRNA, opisane w rozdziale IV. W tym rozdziale natomiast przedstawione są mutacje w genach kodujących białka aparatu translacji cytoplazmatycznej, a jednocześnie interferujące z translacją mitochondrialną. W każdym z omawianych przypadków autorzy prac doświadczalnych rozważali możliwość transportu produktów badanych genów do mitochondriów, gdzie teoretycznie mogłyby one od-

Tabela 1

Geny określające powiązania między ekspresją genów jądrowych a biogenezą mitochondriów

Nazwa genu	Produkt genu	Funkcja mitochondrialna	Funkcja w ekspresji genów jądrowych
<i>SUP45</i>	eRF1	pośrednia (mutanty <i>sup45</i> mają fenotyp Gly-)	czynnik terminacji translacji cytoplazmatycznej
<i>SUP35</i>	eRF3	pośrednia (mutanty <i>sup35</i> mają fenotyp Gly-)	czynnik terminacji translacji cytoplazmatycznej
<i>TIF1</i>	eIF-4A	pośrednia (nadprodukcja eIF-4A powoduje supresję mutacji w mtDNA)	czynnik inicjacji translacji cytoplazmatycznej
<i>RPS18</i>	S18	pośrednia (mutacja <i>rps18a-1</i> powoduje supresję mutacji w mtDNA)	białko rybosomów cytoplazmatycznych
<i>QSR1</i>	Qsr1p	pośredni: (zależność fenotypu mutacji <i>qsr1-1</i> od funkcjonalnego kompleksu bc1)	białko rybosomalne, składanie rybosomów cytoplazmatycznych
<i>NAM7</i>	Nam7/Upf1	wycinanie intronów w mit-mRNA	degradacja cyt-mRNA (szlak NMD)
<i>NAM8</i>	Nam8p	wycinanie intronów w mit-mRNA	wycinanie intronów w cyt-mRNA
<i>NAM9</i>	Nam9p	białko mitochondrialnych rybosomów	pośrednia (zależność fenotypu mutacji <i>nam9-1</i> od prionu [Psi+])

działają efektywnie w niskich temperaturach lub wtedy, gdy dostępne są tylko substraty niefermentowalne [4]. Takie warunki można określać mianem głodu energetycznego (ang. *energy starvation*) i istnieje koncepcja, że mogą one wymuszać zmniejszenie dokładności odczytywania kodonów przez cytosolową maszynę translacyjną [4]. Sens tego hipotetycznego zjawiska tkwi w rezygnacji z kontroli poprawności parowania kodonów z antykodonami, która — jak wykazano u bakterii — wymaga dodatkowych nakładów energii [5]. Takiej hipotetycznej, mniej dokładnej translacji nadano nazwę „translacji S.O.S.” i przypisano teoretyczną rolę w oszczędzaniu przez komórkę związków wysokoenergetycznych [4].

Aparaty translacji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej różnią się między sobą strukturą i uważa się za mało prawdopodobne, by te same białka wchodziły jednocześnie w ich skład [2]. Zasadniczo składniki aparatu translacji cytoplazmatycznej kodowane są przez inny zestaw genów jądrowych niż składniki tworzące aparat translacji mitochondrialnej. Wyjątek

działać bezpośrednio z aparatem translacyjnym. Jednak jak dotąd takie koncepcje nie znalazły potwierdzenia doświadczalnego.

II-1. Czynniki terminacji translacji eRF1 i eRF3

Drożdżowe geny *SUP35* i *SUP45* kodują białka eRF3 i eRF1, będące składnikami kompleksu terminacji translacji cytoplazmatycznej [6]. Oba geny są komórce niezbędne do życia. W sumie w tych dwóch genach otrzymano 118 recesywnych mutacji *sup35* i *sup45*, które były omnipotentnymi supresorami mutacji *nonsense* [7]. 84 z nich powodowały w różnym stopniu zaburzenia we wzroście na niefermentowalnych źródłach węgla: 53 całkowicie utraciło zdolność wzrostu, 8 mutantów miało fenotyp *ts*, 7 fenotyp *cs*, a 16 rosło tylko w podwyższonej temperaturze. Niektóre z mutacji *sup35* i *sup45* były przeciekające (ang. *leaky*), tzn. charakteryzowały się bardzo powolnym wzrostem na substratach niefermentowalnych. Mutacje *sup35* i *sup45* nie prowadzą do eliminacji mtDNA, zachodzącej w przypadku zaburzeń

translacji mitochondrialnej, co sugerowało, że białka Sup35p i Sup45p nie są składnikami mitochondrialnej maszyny translacyjnej [7].

Istnieją jednak dane, sugerujące funkcjonalny związek genów *SUP35* i *SUP45* z translacją mitochondrialną. W widmach cytochromowych mutantów *sup35* i *sup45*, wykazujących defekty wzrostu na niefermentowalnych źródłach węgla, obserwowano znaczny spadek ilości cytochromów *aa₃* i *b* (których składniki syntetyzowane są w mitochondriach), podczas gdy ilość syntetyzowanych w cytosolu cytochromów *c* i *c₁* nie zmieniała się [7]. Analiza kilku rewertantów *sup45* (w których na skutek mutacji wtórnej nastąpił powrót do normalnego wykorzystania glicerolu jako źródła węgla) pokazała, że jednocześnie zachodzi w nich osłabienie supresji nonsens [8]. Ponadto paromomycyna, antybiotyk interferujący z translacją mitochondrialną, ma wpływ na wzrost szczepów *sup35* i *sup45* na podłożach testowych zawierających glicerol lub etanol jako źródło węgla. Sugeruje to, że mutacje *sup35* i *sup45* wywołują w rybosomach mitochondrialnych pewne zmiany.

Interpretacje wyników komplikuje fakt, że paromomycyna działa również na translację cytoplazmatyczną, obniżając dokładność odczytywania kodonów w mRNA, a szczepy wrażliwe na ten antybiotyk zazwyczaj wykazują defekty genetyczne obniżające wierność translacji [9-11]. Działanie paromomycyny na rybosomy mitochondrialne może być zatem bezpośrednie (np. przez dodatkowe obniżenie wierności translacji mitochondrialnej) lub pośrednie (np. poprzez zsyntetyzowane z błędami produkty translacji cytoplazmatycznej).

Istnieją też inne dane, które mogą sugerować wzajemne oddziaływanie translacji cytoplazmatycznej z translacją mitochondrialną za pośrednictwem produktów genów *SUP35* i *SUP45*. Dziedziczący się niemendłowski czynnik [Ψ^+] został zidentyfikowany jako zagregowana, prionowa forma białka Sup35p [13]. W szczepach [Ψ^+] (lecz nie [Ψ^-]) zaobserwowano wzrost częstości powstawania mutacji *rho⁻* w obecności paromomycyny [12]. Być może więc w komórkach, w których produkt genu *SUP35* występuje w postaci prionu [Ψ^+], paromomycyna zaburza translację mitochondrialną w takim stopniu, że następuje destabilizacja mtDNA. Natomiast w nieobecności [Ψ^+] działanie paromomycyny na aparat translacji mitochondrialnej jest słabsze i nie ma wpływu na mtDNA. Przytoczone dane wskazują na ścisły związek funkcji białek Sup35 i Sup45 pełnionej w procesie metabolizowania niefermentowalnych źródeł węgla (translacji mitochondrialnej) z

funkcją pełnioną przez nie w translacji cytoplazmatycznej.

Nie wiadomo, w jaki sposób czynniki terminacji translacji cytoplazmatycznej uczestniczą w regulacji translacji mitochondrialnej. Analiza teoretyczna sekwencji genu *SUP35* wskazała trzy potencjalne starty translacji. Między drugim a trzecim z nich można wyróżnić około 40-aminokwasowy segment o cechach typowej sekwencji odpowiadającej za import do mitochondriów [14]. Nie stwierdzono jednak obecności białka Sup35 w mitochondriach [15].

Ostatnio w ramach poszukiwania genów zaangażowanych w terminację translacji cytoplazmatycznej otrzymano mutację *crd12*, która kompensuje opisane wyżej defekty wzrostu mutantów *sup35* i *sup45* na podłożu glicerolowym i etanolowym [16]. Efekt ten jest recesywny. Mutacja *crd12* sama w sobie powoduje brak wzrostu na podłożach zawierających niefermentowalne źródła węgla. Ten fenotyp jest również recesywny i znika w szczepach [Ψ^+]. Mutację *crd12* zlokalizowano w genie *ATP17*, kodującym podjednostkę mitochondrialnej ATPazy. Według interpretacji autorów stwierdzone oddziaływanie genetyczne mitochondrialnej ATPazy z czynnikami terminacji translacji cytoplazmatycznej łączy się z procesem ko-translacyjnego importu białek do mitochondriów [16]. Ciekawe jest, że kombinacja dwóch mutacji prowadzących do braku wzrostu w warunkach wymuszających pozyskiwanie energii z rozkładu niefermentowalnych źródeł węgla odtwarza ten wzrost. Być może istnieje jakiś czynnik regulatorowy, „czujnik”, którego stężenie w komórce (lub jej przedziale) jest kluczowe dla włączania/wyłączenia katabolizmu niefermentowalnych źródeł węgla. Zarówno zbytne zwiększenie, jak i zmniejszenie jego stężenia wykluczałoby działanie wspomnianych szlaków katabolicznych. Mutacje *crd12* i *sup35* (lub *sup45*) mogłyby przeciwnie regulować pulę takiego „czujnika”, co tłumaczyłoby obserwowane zależności fenotypowe.

Pomimo że mutacje w genie *SUP35* dają taki sam fenotyp jak mutacje w *SUP45*, inny jest fenotyp komórek, w których zachodzi nadekspresja tych genów [4]. Związku nadekspresji *SUP35* z oddychaniem komórkowym nie opisano. Stwierdzono natomiast, że w około 20% transformantów, niosących gen *SUP45* na plazmidzie wielokopijnym, zachodzi słaba supresja mutacji *nonsense* UAA (*ochre*) w genie *LYS9*, która ujawnia się tylko wtedy, gdy w podłożu znajduje się etanol jako źródło węgla [4]. Zależności takiej nie obserwowano w przypadku supresji innych mutacji *nonsense*. Zatem tylko wtedy, kiedy komórka drożdżowa oddycha, zwiększenie stężenia eRF1 w cytopla-

zmie obniża (nieznacznie i wybiórczo) wierność translacji.

II-2. Czynniki inicjacji translacji eIF-4A

Poszukując genów, których nadekspresja powodowałaby supresję mutacji *missens* w mitochondrialnym genie *COX3*, sklonowano gen *TIF1* [17]. W genomie *S. cerevisiae* występują geny *TIF1* i *TIF2*, kodujące ten sam czynnik inicjacji translacji cytoplazmatycznej eIF-4A (sekwencje białek kodowanych przez *TIF1* i *TIF2* są identyczne). Przynajmniej jeden z tych dwóch genów musi być aktywny, by komórka była zdolna do życia. Zarówno *TIF1*, jak i *TIF2* są słabymi supresorami tej samej mutacji *mit⁻* w genie *COX3* tylko wówczas, gdy występują w komórce w dużej liczbie kopii [17]. Jest to kolejny dowód, że cytoplazmatyczny czynnik translacyjny wpływa na odczytywanie kodonów w mitochondriach. Autorzy upatrują tu jednak rolę czynnika pośredniego. Powołują się na fakt, iż ssaczy eIF-4A jest zasocjowany z mRNA i uczestniczy w wiązaniu mRNA do kompleksu preinicjacyjnego 43S (na który składa się mała podjednostka rybosomu 40S, metionyl-tRNA i grupa czynników inicjacyjnych). Rola eIF-4A polega na rozplataniu struktury mRNA i ekspozycji jego końca 5'. Jeżeli w normalnych warunkach nisko ekspresyjny eIF-4A jest czynnikiem ograniczającym szybkość inicjacji translacji, teoretycznie różne klasy mRNA mogą konkurować w pierwszym rzędzie o wiązanie z eIF-4A, zaś potem — z kompleksem 43S. Zatem nie wszystkie klasy mRNA będą podlegały translacji tak samo efektywnie. Nadekspresja eIF-4A może ułatwić inicjację translacji z transkryptów dotychczas słabiej wiązanych przez rybosomy, np. kodujących białka mitochondrialne bezpośrednio odpowiedzialne za supresję mutacji *mit⁻* w genie *COX3*. Foley i Fox [18] dyskutowali działanie tego samego typu mechanizmu pośredniej supresji (patrz niżej).

II-3. Białko rybosomalne S18

Dwa drożdżowe geny *RPS18A* i *RPS18B*, które dają identyczne produkty, lecz ulegają ekspresji z różną wydajnością, kodują białko małej podjednostki rybosomów cytoplazmatycznych drożdży S18. S18 jest homologiem białka rybosomalnego S17 z *E. coli*, biorącego udział w składaniu małej podjednostki rybosomów i kontrolującego wierności translacji. Mutanta *rps18a-1* wyselekcjonowano jako supresora defektu wzrostu mutantów *cox3-1* i *cox2-10* na niefermentowalnych źródłach węgla. *cox3-1* i *cox2-10*

są mutacjami typu zmiany sensu w kodonach startowych genów mitochondrialnych *COX3* i *COX2* [18]. Genowo niespecyficzny charakter supresji wskazuje na oddziaływanie mutacji *rps18a-1* na translację mitochondrialną. Wrażliwość mutantu *rps18a-1* na paromomycynę sugeruje, że mutacja *rps18a-1* obniża wierność translacji. Nie jest jednak jasne, czy mechanizm supresji mutacji mitochondrialnych polega na zmniejszeniu wierności lub innych zmianach w translacji cytoplazmatycznej, czy też na bezpośrednim wpływie *rps18a-1* na rybosomy mitochondrialne.

Postawiono dwie alternatywne hipotezy na temat mechanizmu funkcjonowania białka rybosomalnego S18 w translacji mitochondrialnej. Pierwsza z nich opiera się na analizie sekwencji promotora *RPS18A* i zakłada bezpośredni udział S18 w translacji mitochondrialnej. Około 600 pz przed pierwszym eksonem *RPS18A* znajduje się ciąg 81 aminokwasów o cechach sekwencji kierującej do mitochondriów. Tuż za nim znaleziono niemal typową sekwencję miejsca składania od strony 5' intronu. Gdyby zachodziło alternatywne składanie, w jego wyniku sygnał lokalizacji mitochondrialnej łączyłby się z eksonem drugim *RPS18A*, generując mitochondrialną formę S18. Mimo wielu wysiłków, nie udowodniono jednak tej hipotezy. Metodą immunodetekcji nie wykryto również białka S18 w mitochondriach [18].

Hipoteza druga tłumaczy wpływ S18 na translację mitochondrialną efektami pośrednimi. Szczepy niosące mutację *rps18a-1* na podłożach z glukozą mają fenotyp *cs* [18]. Fenotyp *cs* często wynika z zaburzeń w składaniu multimerycznych kompleksów [19]. Rzeczywiście, w szczepach *rps18a-1* zmniejsza się ilość podjednostek rybosomów 40S, co jest efektem spadku stężenia białka S18 [18]. Zmniejszenie ilości aktywnych podjednostek 40S, wywołane niedoborem S18, wymusza konkurencję między poszczególnymi klasami mRNA o wiązanie z rybosomami cytoplazmatycznymi, wpływając na wydajność inicjacji translacji. Zakłóca to wzajemne zbalansowanie tempa syntezy kodowanych w jądrze składników mitochondrialnego aparatu translacji. Poprzez zaburzenie stechiometrii między tymi składnikami translacja mitochondrialna staje się mniej dokładna [18].

Nie ma jednak prostego wytłumaczenia mechanizmu supresji, tym bardziej, że niskie stężenie Cox3 w mutancie *cox3-1*, spowodowany mało wydajną inicjacją translacji z nietypowego kodonu startowego, nie ulega podwyższeniu w szczepie supresorowym. Z drugiej strony, *rps18a-1* jest supresorem specyficznym wobec alleli *COX3* i *COX2*, mających kodon

inicjatorowy zmieniony w AUA, natomiast nie suprymuje delekcji w 5' UTR mRNA *COX3* [18]. Być może w grę wchodzi więc zmiany w ekspresji innych genów mitochondrialnych, wywołane wtórnie przez niedobór białka S18.

II-4. Białko rybosomalne Qsr1

Innym ciekawym genem drożdżowym jest *QSR1*. Białko Qsr1p jest stechiometrycznym składnikiem rybosomalnej podjednostki 60S i wykrywane jest w rybosomach, które są związane z powierzchnią mitochondriów [20]. Białko to jest niezbędne do życia komórce i jego rola polega na udziale w łączeniu podjednostek rybosomalnych 60S i 40S [21]. Mutacja *qsr1-1* staje się letalna, jeżeli z genomu usunie się gen *QCR6*, kodujący mitochondrialne białko wchodzące w skład kompleksu cytochromowego bc_1 . Postuluje się, iż w oddziaływaniu białek Qsr1p i Qcr6p pośredniczy zewnętrzna błona mitochondrialna [20]. Białko Qsr1p, kontaktując się fizycznie z mitochondriami, mogłoby zatem być jednym z „posłańców” na drodze komunikacji między mitochondriami a aparatem cytoplazmatycznej translacji.

III. Białka związane z biogenezą mitochondriów, a zarazem z ekspresją genów jądrowych

Poszukiwanie supresorów mutacji *mit* doprowadziło do zidentyfikowania sześciu genów jądrowych, nazwanych *NAM* (od ang. *Nuclear Accomodation of Mitochondria*) i związanych z ekspresją informacji genetycznej zawartej w mtDNA. Dwóm z nich, *NAM7* i *NAM8*, oprócz roli w mitochondrialnej ekspresji genów przypisano również różne funkcje pozamitochondrialne, w tym związane z translacją cytoplazmatyczną. Efekty mutacji w *NAM7* i *NAM8* są plejotropowe, co sugeruje ich szeroką rolę w regulacji procesów życiowych komórki [22, 23]. Dla kolejnego genu, *NAM9*, opisano specyficzną interakcję z prionem [Psi^-], uwikłanym w translację cytoplazmatyczną [24].

III-1. Białko Nam7/Upf1

Gen *NAM7* wyizolowano jako wielokopijny supresor mutacji w intronach mitochondrialnych, które blokowały składanie pre-mRNA w mitochondriach. Szczep pozbawiony ORF *NAM7* wykazywał fenotyp *cs* na podłożu zawierającym mleczan [23], co sugerowało jego związek z biogenezą mitochondriów. Jak wynika z późniejszych badań, produkt genu

NAM7 jest tożsamy z białkiem Upf1, helikazą RNA, zaangażowaną w szlak NMD (ang. *nonsense mediated decay*). Szlak NMD funkcjonuje w cytoplazmie i jest odpowiedzialny za szybką degradację pewnych klas mRNA, przede wszystkim mających w ORF mutację stop [25-28]. Całkowita inaktywacja genu *NAM7/UPF1* lub mutacje *upf1* dają plejotropowe efekty fenotypowe, m.in. skrócenie telomerów i defekt w regulacji genów leżących blisko telomerów [26] lub zniesienie blokady cyklu komórkowego w mutancie *ctf13-30*, w którym zaburzone jest oddziaływanie centromeru z kinetochorem [28]. Prawdopodobnie wynika to z roli Nam7p/Upf1p jako regulatora trwałości wielu różnych transkryptów.

W doświadczeniach z drożdżowym systemem dwuhybrydowym wykazano fizyczne oddziaływanie Nam7p/Upf1p z innymi białkami Upf [29]. Pokazano także, że białko Nam7p/Upf1p, podobnie jak inne białka Upf, wiąże się z polisomami lub pojedynczymi rybosomami w zależności od warunków wzrostu komórek [30]. Wydaje się, że trójskładnikowy kompleks Upf1p-Upf2p-Upf3p oddziałuje z cząsteczkami mRNA związanymi na aktywnych rybosomach (polisomach), regulując ich trwałość. Białko Nam7p/Upf1p może jednak łączyć się z polisomami niezależnie od Upf2 i Upf3 [30], co sugeruje jego dodatkową funkcję w regulacji translacji.

Wykazano, że niezależnie od wpływu na trwałość niektórych mRNA, mutacje w *NAM7/UPF1* mogą wpływać w inny sposób na ekspresję genów, na przykład wzmacniają supresję kodonów nonsens [31]. Mogą też zwiększać wydajność programowanej zmiany ramki odczytu mRNA (ang. *programmed frameshifting*), będącej rzadkim mechanizmem regulowania wydajności ekspresji genów [32]. Allele *NAM7/UPF1* zmutowane w domenie helikazy inaktywują funkcję produktu tego genu w degradacji mRNA, nie wpływając na zdolność supresji kodonów nonsens [33], co pokazuje, że różne funkcje Nam7p/Upf1p mogą być niezależne. Z najnowszych prac wynika, że białko Nam7p/Upf1p wiąże się *in vitro* z eRF1 i eRF3 (czynnikami terminacji translacji kodowanymi przez geny *SUP45* i *SUP35*) oraz jest składnikiem prionowego agregatu Sup35p w szczepach [Psi^+] [34]. Ilustruje to związek szlaku NMD z terminacją translacji.

W jaki sposób białko Nam7p/Upf1p oddziałuje z mitochondriami? Jaka jest jego rola w składaniu mitochondrialnych pre-mRNA? Na razie nieznane są odpowiedzi na te pytania. Danych na temat związku *NAM7/UPF1* z biogenezą mitochondriów może dostarczyć analiza transkrypcji tego genu. Na chromosomie leży on bardzo blisko genu *MBR3*, który wspo-

magą *NAM7/UPF1* w supresji defektu w składaniu mitochondrialnych pre-mRNA, pomimo że sam nie wykazuje takiej aktywności [35]. Choć transkrypcja obu tych genów jest zupełnie inaczej regulowana (np. *MBR3* podlega represji katabolicznej, a *NAM7/UPF1* nie) i dają one dwa odrębne transkrypty, w szczepach pozbawionych białka Hap1p, ważnego aktywatora transkrypcji genów zaangażowanych w oddychanie, powstaje także mRNA bicystronowy [36]. Nasuwa to przypuszczenie, że geny *NAM7/UPF1* i *MBR3* przynajmniej w pewnych warunkach pełnią w komórce wspólną rolę. *MBR3* jest wielokopijnym supresorem mutacji *hap1*, a jego inaktywacja prowadzi do spowolnienia wzrostu w obniżonej temperaturze na podłożu mleczanowym [37], co przypomina fenotyp szczepu pozbawionego *Nam7p/Upf1p*. Istnieje koncepcja, że *NAM7/UPF1* i *MBR3* były niegdyś jednym genem związanym z biogenezą mitochondriów, który w procesie ewolucji molekularnej rozdzielił się na dwa — nadal związane z tą samą funkcją komórki, ale wyspecjalizowane [35]. Obraz ten komplikuje jednak fakt, iż genowi *NAM7/UPF1* przypisano różnorodne funkcje pozamitochondrialne.

III-2. Białko Nam8

Gen *NAM8*, podobnie jak *NAM7*, także został sklonowany jako wielokopijny supresor mutacji w intronach mitochondrialnych [22]. O ile gen ten jest zbędny dla wzrostu wegetatywnego komórki i stabilności mtDNA, a także dla składania mitochondrialnego [38], staje się niezbędny podczas mejozy [39]. Ostatnio dowiedziono, że białko Nam8p, wraz z U1 RNA, wchodzi w skład kompleksu odpowiedzialnego za selekcję miejsc wycinania intronów w jądrowych pre-mRNA [40, 41]. Produkt genu *NAM8* staje się niezbędny w sytuacji, gdy osłabione jest rozpoznawanie miejsca cięcia 5' (ang. 5' splice site) przez wieloskładnikowy kompleks wycinający introny (ang. spliceosom), co sugeruje rolę Nam8p w kontrolowaniu dokładności wycinania sekwencji intronowych [41]. Przyczyną słabego rozpoznawania może być odbiegający od typowego kontekst miejsca cięcia 5'. Taka sytuacja dotyczy m.in. pre-mRNA *MRE2* — genu niezbędnego w trakcie mejozy, tłumacząc rolę *NAM8* w tym procesie. *NAM8* jest także niezbędny w składaniu także wtedy, gdy mRNA nie ma czapki [41].

Tak więc z jednej strony białko Nam8p może pełnić ważną rolę w determinowaniu efektywności składania jądrowych pre-mRNA, choć zasadniczo nie jest w nim niezbędne. Z drugiej zaś, może mieć

wpływ na składanie mitochondrialnych pre-mRNA w mitochondriach. Ta analogia sugeruje funkcjonowanie Nam8p w jądrze oraz w mitochondriach na tym samym etapie ekspresji genów. Nam8p nie posiada charakterystycznej N-końcowej sekwencji kierującej do mitochondriów. Niemniej jednak cały polipeptyd Nam8p zawiera dużo reszt zasadowych, seryn i treonin, które są charakterystyczne dla mitochondrialnych presekwencji — nie można więc wykluczyć istnienia wewnętrznej sekwencji kierującej do mitochondriów [38]. W przypadku podjednostki Va oksydazy cytochromowej nadekspresja białka kompensuje brak sygnału lokalizacji mitochondrialnej [42]. Teoretycznie podstawą domniemanego importu do mitochondriów białka Nam8p mogłoby być to samo zjawisko [38].

Można również sądzić, że oddziaływanie *NAM8* na mitochondria zachodzi na drodze pośredniej — przez zwiększenie ekspresji jakiegoś genu zawierającego intron. O tym, na które z pre-mRNA będzie oddziaływał produkt genu *NAM8* (i w jakim stopniu), mogłyby decydować sekwencje mRNA, leżące za miejscem cięcia od strony 5' intronu. Wykazano bowiem, że produkt genu *NAM8* jest niezbędny przy wycinaniu intronów, gdy miejsce cięcia od strony 5' intronu jest słabo rozpoznawane, na przykład z powodu nietypowego kontekstu [41]. Konsekwencją działania Nam8p na te pre-mRNA mogłaby być stymulacja syntezy kodowanych przez nie białek. Wpływ zmian stężenia niektórych białek aparatu translacji cytoplazmatycznej (w tym białka rybosomalnego S18) na mutacje *mit⁻* opisano w paragrafie IIc. Jest na przykład możliwe, iż Nam8p działa preferencyjnie na pre-mRNA białek rybosomalnych, które zawierają introny.

III-3. Wybrane białka rybosomów mitochondrialnych

Jeszcze inny jądrowy gen, *NAM9*, koduje białko rybosomów mitochondrialnych, w którym zidentyfikowano domenę o dużej homologii do białek rybosomalnych z rodziny S4 [24, 43]. Mutacja *nam9-1* typu zmiany sensu w domenie S4 genu *NAM9* powoduje defekty wzrostu na podłożach zawierających niefermentowalne źródła węgla [43, 44]. Prawdopodobną przyczyną tych defektów jest spadek wierności translacji mitochondrialnej, prowadzący do syntezy niefunkcyjnych białek zaangażowanych w oddychanie. Ostatnio udokumentowano, że defekt oddechowy związany z mutacją *nam9-1* występuje wyłącznie w szczepach [Ψ^+] [24]. Zidentyfikowano 10 genów, których nadekspresja powoduje supresję

fenotypu mutacji *nam9-1* na podłożu glicerolowym [45]. Wiele z nich koduje białka funkcjonujące w translacji cytoplazmatycznej lub mające z nią bliski związek funkcjonalny. Są to geny *PABI*, *SSB1* i *SSB2* oraz *SBP1*. Produkty silnie homologicznych genów *SSB1* i *SSB2*, należące do grupy białek hsp70, pozostają związane z powierzchnią rybosomów cytoplazmatycznych i kotranslacyjnie kontrolują fałdowanie powstających na rybosomie polipeptydów. *PABI* koduje białko wiążące się z traktami poli(A)⁺ mRNA, zaangażowane m.in. w regulację inicjacji translacji cytoplazmatycznej. *SBP1* koduje białko, które nie bierze bezpośredniego udziału w translacji, ale jest związane z dojrzewaniem rRNA i biogenezą rybosomów cytoplazmatycznych, szczególnie w warunkach wzrostu komórek na pożywce glicerolowej. Białko Sbp1p może być więc jednym z łączników pomiędzy metabolizmem glicerolu (i w domyśle: oddychaniem) a cytoplazmatycznym aparatem translacji. Jest prawdopodobne, że produkty sklonowanych genów supresorowych oddziałują z prionem [Psi⁺], przez co w sposób pośredni wpływają na efekt mutacji *nam9-1* [45]. Jest to kolejny przykład na regulacyjne powiązanie pomiędzy translacją mitochondrialną i cytoplazmatyczną.

Istnieją przesłanki na temat funkcji cytoplazmatyczno-jądrowych innych białek rybosomów mitochondrialnych. Geny *MRP-L4*, *MRP-L8* i *MRP-S9*, kodujące białka rybosomów mitochondrialnych (YmL4, YmL8, Mrp-S9) mają tę unikalną cechę, że ich inaktywacja jest nie tylko letalna dla wzrostu na podłożach zawierających niefermentowalne źródła węgla, ale także spowalnia wzrost na podłożach zawierających źródła węgla fermentowalne [3, 46, 47]. W komórkach niosących zinaktywowany gen *MRP-S9* w warunkach derepresji glukozowej nie wykrywa się pewnych enzymów glukoneogenezy [46]. Komórki te w fazie logarytmicznej wzrostu hodowli na podłożu glukozowym przybierają nienaturalnie duże rozmiary i mają zmienione wakuole. Fazie stacjonarnej nie towarzyszy powiększenie samych komórek, lecz wakuole nadal pozostają zmienione [46]. Dane te przemawiają za pełnieniem przez białko Mrp-S9 funkcji pozamitochondrialnych.

Możliwość syntezy niemitochondrialnej formy YmL4, opierająca się na istnieniu mechanizmu opisanego np. dla niektórych mitochondrialnych syntetaz aminoacylo-tRNA (patrz rozdział IV), została raczej wykluczona. G r a c k i wsp. [47] sugerowali natomiast na podstawie analizy sekwencji białka YmL4 obecność domeny bogatej w prolinę (charakterystycznej dla aktywatora transkrypcji CTF/NF-1), miejsc fosforylacji i sygnału importu do jądra. Po-

dobna kombinacja motywów występuje w sekwencji rybosomalnego białka S3 *D. melanogaster* [47]. Białko S3 jest znane jako bifunkcjonalne — oprócz funkcji w rybosomach wykazuje również aktywność endonukleazy związanej z reperacją DNA. Istnieje koncepcja, że YmL4 jest zaangażowane w przekazywanie sygnału z mitochondriów do jądra komórkowego [47].

IV. Białka biorące bezpośredni udział w translacji mitochondrialnej i cytoplazmatycznej.

Zasadniczo aparaty translacji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej są kodowane przez odrębne zespoły genów. Jednak istnieją takie geny, których produkty uczestniczą jednocześnie w translacji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej, pełniąc tę samą funkcję. Należą do nich geny kodujące niektóre syntetazy aminoacylo-tRNA oraz enzymy obróbki posttranskrypcyjnej i modyfikacji tRNA [48]. Przykładami są tu: syntetazy His-tRNA (gen *HTS1*) i Val-tRNA (gen *VAS1*), niezbędna do życia nukleotydylotransferaza Cca1p, dodająca na końcach 3' tRNA trójnukleotydu CCA, izopentenylotransferaza tRNA kodowana przez gen *MOD5*, oraz produkt genu *TRM1*, kodującego specyficzną metylotransferazę tRNA.

W genach *HTS1* i *VAS1* oraz *TRM1* występują dwa kodony AUG, będące potencjalnymi startami translacji. Ekspresja tych genów regulowana jest przez alternatywną inicjację transkrypcji. W wyniku transkrypcji powstają dwie klasy mRNA: dłuższe, rozpoczynające się przed pierwszym kodonem AUG, kodujące mitochondrialną formę białka, oraz krótsze, rozpoczynające się pomiędzy alternatywnymi startami translacji i kodujące formę niemitochondrialną tego samego białka [48-50]. W regulacji ekspresji *MOD5* oprócz mechanizmu transkrypcyjnego, który wydaje się mieć mniejsze znaczenie, funkcjonuje także mechanizm translacyjny: o wyborze miejsca inicjacji translacji decyduje kontekst kodonu start. Pierwszy kodon AUG znajduje się w otoczeniu sekwencji nie odpowiadających klasycznemu elementowi inicjacji translacji, toteż jest używany rzadziej. Natomiast kontekst drugiego kodonu AUG jest doskonałym elementem inicjacyjnym [51].

Przypadek genu *CCA1* jest bardziej skomplikowany. W ramce odczytu *CCA1* występują aż trzy kodony startowe, a regulacja syntezy poszczególnych form białka Cca1p łączy w sobie elementy alternatywnej inicjacji transkrypcji i translacji [52].

Mechanizmy regulujące syntezę form białka: dłuższej i krótszej w istocie decydują o jego lokaliza-

cji subkomórkowej. Mogą się one znacznie różnić między sobą i być jednym ze sposobów wzajemnej regulacji translacji mitochondrialnej i cytoplazmatycznej.

W eksperymentach *in vivo* pokazano, że w pewnych warunkach forma mitochondrialna i cytoplazmatyczna tego samego białka mogą się nawzajem zastępować. Szczepy z delecjami w obrębie lidera mitochondrialnego w syntetazie His-tRNA wykazują fenotyp Pet⁻, tzn. m.in. nie mają zdolności wzrostu na podłożach zawierających niefermentowalne źródła węgla. Nadekspresja cytosolowej formy tego białka wymusza jego lokalizację mitochondrialną i powoduje rewersję do fenotypu Pet⁺. Z kolei forma mitochondrialna, ulegająca zwielokrotnionej ekspresji z plazmidu wielokopijnego, może zastąpić formę cytosolową — być może efekt ten jest spowodowany wysyceniem maszynierii importu mitochondrialnego dłuższą formą syntetazy i zatrzymywaniem jej w cytoplazmie [50]. Regulowana ekspresja genu *HTS1* mogłaby zatem zmieniać pulę mitochondrialnej syntetazy i wpływać na translację mitochondrialną, modulując poprzez jej produkty aktywność respiracyjną komórki.

V. Podsumowanie

Zagadnienie wzajemnej regulacji translacji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej nie jest poznane dostatecznie dobrze, żeby robić uogólnienia dotyczące jego mechanizmów. Poza „wspólnymi” dla translacji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej enzymami aminoacylującymi lub modyfikującymi tRNA, do tej pory u drożdży *S. cerevisiae* zidentyfikowano zaledwie kilka jądrowych genów zaangażowanych jednocześnie w regulację działania cytoplazmatycznego aparatu translacji i biogenezę mitochondriów. Wszystkie uzyskane do tej pory wyniki zostały zebrane w niniejszej pracy.

Wyjaśnienie szczegółowej roli omawianych powyżej białek w mitochondrialnej ekspresji genów wymaga jeszcze wielu badań. Tymczasem uwaga badaczy koncentruje się raczej wokół funkcji tych genów w procesach pozamitochondrialnych. Wciąż znanych jest także za mało przykładów powiązań regulacyjnych między mitochondriami a jądrem komórkowym. Być może w dzisiejszej dobie, kiedy genom drożdżowy jest już zsekwencjonowany, a dzięki istnieniu sieci informatycznych dane na temat funkcji poszczególnych genów są łatwo dostępne, uda się wychwycić szczegóły, które doprowadzą do sformułowania zunifikowanej teorii przepływu informa-

cji o stanie fizjologicznym komórki pomiędzy mitochondriami a cytoplazmą i jądrem komórkowym.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu grantowego KBN nr 6PO4B02915

Artykuł otrzymano 13 stycznia 2000 r.
Zaakceptowano do druku 31 sierpnia 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Grivell L A (1995) *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **30**: 121-164
2. Fox T D (1996) in *Translational Control*, Cold Spring Harbour Laboratory Press
3. Graack H R, Wittmann-Liebold B (1998) *Biochem J* **329**: 433-448
4. Chernoff Y O, Inge-Vechtomov S G, Derkach I L, Ptyushkina M V, Tarunina O V, Dagkesamanskaya A R, Ter-Avanesyan M D (1992) *Yeast* **8**: 489-499
5. Ruusala T, Andersson D, Ehrenberg M, Kurland C G (1984) *EMBO J* **3**: 2575-2580
6. Zhouravleva G, Frolova L, LeGoff X, Le Guellec R, Inge-Vechtomov S G, Kisselev L, Philippe M (1995) *EMBO J* **14**: 4065-4075
7. Ter-Avanesyan M D, Zimmermann J, Inge-Vechtomov S G, Sudarikov A B, Smirnov V N, Surguchov A P (1982) *Mol Gen Genet* **185**: 319-323
8. Mironova L N, Samsonova M G, Zhouravleva G A, Kulikov V N, Soom M J (1995) *Curr Genet* **27**: 195-200
9. Palmer E, Wilhelm J M, Sherman F (1979) *Nature* **277**: 148-150
10. Singh A, Ursic D, Davies J (1979) *Nature* **277**: 146-148
11. Eustice D C, Wakem L P, Wilhelm J M, Sherman F (1986) *J Mol Biol* **188**: 207-214
12. Dujardin G, Lund P, Slonimski P P (1984) *Curr Genet* **9**: 21-30
13. Pauskhin S V, Kushnirov V V, Smirnov V N, Ter-Avanesyan M D (1996) *EMBO J* **15**: 3127-3134
14. Kushnirov V V, Ter-Avanesyan M D, Telckov M V, Surguchov A P, Smirnov V N, Inge-Vechtomov S G (1988) *Gene* **66**: 45-54
15. Kushnirov V V (1990) Praca doktorska, Instytut Kardiologii, Moskwa.
16. Shumov N N, Volkov K V, Mironova L N (2000) *Genetika* **36**: 644-650
17. Linder P, Slonimski P P (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2286-2290
18. Folley L S, Fox T D (1994) *Genetics* **137**: 369-379
19. Hampsey M (1997) *Yeast* **13**: 1099-1133
20. Dick F A, Karamanou S, Trumpower B L (1997) *J Biol Chem* **272**: 13372-13379
21. Eisinger D P, Dick F A, Trumpower B L (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 5136-5145
22. Asher E B, Groudinsky O, Dujardin G, Altamura N, Kermorgant M, Slonimski P P (1989) *Mol Gen Genet* **215**: 517-528
23. Altamura N, Groudinsky O, Dujardin G, Slonimski P P (1992) *J Mol Biol* **224**: 575-587
24. Hacıńska A, Boguta M, Krzewska J, Rospert S (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 7220-7229
25. Leeds P, Peltz S W, Jacobson A, Culbertson M R (1991) *Genes Dev* **5**: 2303-2314
26. Jacobson A, Peltz S W (1996) *Annu Rev Biochem* **65**: 693-739

27. Lew J E, Enomoto S, Berman J (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 6121-6130
28. Barnes C A (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 2433-2441
29. He F, Brown A H, Jacobson A (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 1580-1595
30. Atkin A L, Altamura N, Leeds P, Culbertson M R (1995) *Mol Biol Cell* **6**: 611-625
31. Leeds P, Wood J M, Jacobson A, Culbertson M R (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 2165-2177
32. Cui Y, Dinman J D, Peltz S W (1996) *EMBO J* **15**: 5726-5736
33. Weng Y, Czaplinski K, Peltz S W (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 5491-5506
34. Czaplinski, Ruiz-Echevarria M J, Paushkin S V, Han X, Weng Y, Perlick H A, Dietz H C, Ter-Avanesyan M & Peltz S W (1999) *Genes Dev* **12**: 1665-1677
35. Altamura N, Dujardin G, Groudinsky O, Słonimski P P (1994) *Mol Gen Genet* **242**: 49-56
36. Altamura N, Pinto B, Castaldo R, Verdier J (1997) *FEBS Letters* **409**: 96-100
37. Daignan-Fornier B, Cam C N, Reisdorf P, Lemcignan P, Bolotin-Fukuhara M (1994) *Mol Gen Genet* **243**: 575-583
38. Ekwall K, Kermorgant M, Dujardin G, Groudinsky O, Słonimski P P (1992) *Mol Gen Genet* **233**: 136-144
39. Nakagawa T, Ogawa H (1997) *Genes Cells* **2**: 65-79
40. Gottschalk A, Tang J, Puig O, Salgado J, Neubauer G, Colot HV, Mann M, Seraphin B, Rosbash M, Luhrmann R, Fabrizio P (1998) *RNA* **4**: 374-393
41. Puig O, Gottschalk A, Fabrizio P, Seraphin B (1999) *Genes Dev* **13**: 569-580
42. Dircks L K, Poyton R O (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 4984-4986
43. Boguta M, Dmochowska A, Borsuk P, Wróbel K, Gargouri A, Łazowska J, Słonimski P P, Szcześniak B, Kruszcwska A (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 402-412
44. Dmochowska A, Konopińska A, Krzymowska M, Szcześniak B, Boguta M (1995) *Gene* **162**: 81-85
45. Konopińska A (1999) *Praca doktorska wykonana w Zakładzie Genetyki IBB PAN, Warszawa.*
46. Kötter P, Entian K D (1995) *Curr Genet* **28**: 26-31
47. Graack H R, Grohmann L, Kitakawa M, Goldschmidt-Reisin S (1995) *Gene* **152**: 107-112
48. Martin N C, Hopper A K (1994) *Biochimie* **76**: 1161-1167
49. Chatton B, Walter P, Ebel J P, Lacroute F, Fasiolo F (1988) *J Biol Chem* **263**: 52-57
50. Chiu M I, Mason T L, Fink G R (1992) *Genetics* **132**: 987-1001
51. Slusher L B, Gillman E C, Martin N C, Hopper A K (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9789-9793
52. Chen J Y, Joyce P B M, Wolfe C L, Steffen M C, Martin N C (1992) *J Biol Chem* **267**: 14879-14883

Zaburzenia kontroli fazy G1 cyklu komórkowego podczas onkogenezy

Disorder of G1 phase control of cell cycle during oncogenesis

RAFAŁ CZAJKOWSKI¹, TOMASZ DREWA²,
DOROTA OLSZEWSKA², ALINA WOŹNIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Regulacja fazy G1 cyklu komórkowego
- III. Białka fazy G1 w procesie onkogenezy
 - III-1. Droga regulacyjna cyklu komórkowego z udziałem białek p19(ARF)-mdm2-p53
 - III-2. Droga regulacyjna cyklu komórkowego z udziałem białek p16(INK4a)-cyklina D1-cdk4-pRb
- IV. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Regulation of G1 phase of cell cycle
- III. Proteins of G1 phase in oncogenesis
 - III-1. p19(ARF)-mdm2-p53 cell cycle regulatory pathway
 - III-2. p16(INK4a)-cyclin D1-cdk4-pRb cell cycle regulatory pathway
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: CAK — kinazy aktywujące cdk, cdk — kinazy cyklinozależne, CK1 — inhibitory kinaz cyklinozależnych, EBV — wirus Epstein-Barr, ERK — kinazy regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi, E2F-DP — heterodimerowy czynnik transkrypcyjny, HDAC — deacetylaza histonowa, HPV — wirus brodawczaka ludzkiego, HTLV — wirus ludzkiej białaczki T-komórkowej, LOH — utrata heterozygotyczności, PCNA — jądrowy antygen proliferujących komórek, pRb — białko supresorowe Rb, SAS — sekwencja zwielokrotniona w mięsaku, TGF- β 1 — transformujący czynnik wzrostowy β 1.

I. Wstęp

Większość komórek dorosłego organizmu wielokomórkowego ulega regularnym podziałom. Wśród nich największą aktywnością proliferacyjną charakteryzują się komórki szpiku kostnego oraz komórki nabłonków. Wielokrotnie powtarzające się cykle komórkowe są szczegółowo kontrolowane przez czynniki zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowe, a od ich dokładności zależy prawidłowy przebieg proliferacji oraz homeostaza organizmu.

Najczęstszymi przyczynami zaburzeń kontroli cyklu komórkowego są amplifikacje genów, translokacje genów, mutacje punktowe, delecje homozygotyczne, utrata heterozygotyczności całych fragmentów chromosomu (LOH), zmiany w metylacji promotora oraz insercje wirusowe [1, 2]. Zaburzenia kontroli mogą zdarzyć się w każdej fazie cyklu komórkowego, jednakże najczęściej występują w fazie G1 [3].

Komórki, które „uwolniły się” spod kontroli proliferacji, ulegają szybkim podziałom. Liczba komórek z uszkodzonym aparatem genetycznym intensywnie rośnie, a szybko przebiegający cykl komórkowy sprzyja powstawaniu nowych mutacji. Uszkodzenia aparatu genetycznego, przyczyniające się do obniżenia lub podwyższenia poziomu odpowiednich czynników regulujących cykl komórkowy, jak również czynniki patologiczne uniemożliwiające prawidłowe funkcjonowanie punktów kontrolnych powodują zachwianie homeostazy komórki. Zaburzenia homeostazy zaś są przyczyną patologii prowadzącą m.in. do transformacji nowotworowej. Faza G1 cyklu komórkowego podlega kontroli sprawowanej przez wiele białek supresorowych oraz protoonkogenów. Większość z nich wchodzi w skład dróg regulacyjnych p19(ARF)-mdm2-p53 oraz p16(INK4a)-cyklina D1-cdk4-pRb. Upośledzone funkcjo-

¹Lek. med., ²dr n. med., Katedra i Zakład Biologii, Akademia Medyczna im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz, tel. (052) 341 2893, fax. (052) 341 5933

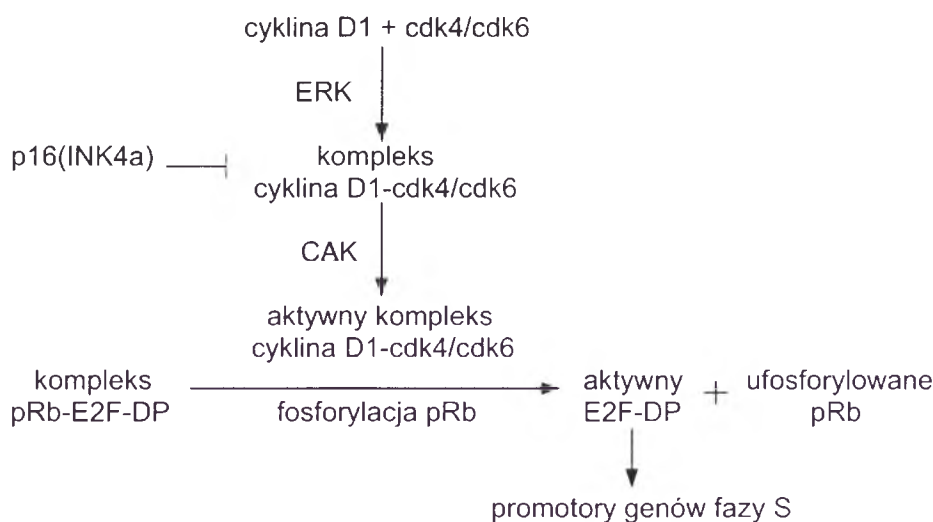
nowanie białek regulatorowych jest istotnym elementem w patogenezie chorób nowotworowych.

Rozwój nowotworu złośliwego zależy także od innych czynników, do których zaliczyć można programowaną śmierć komórki (apoptoza), interakcje międzykomórkowe oraz układ komórka-macierz. Prawdopodobnie patologia cyklu komórkowego odgrywa główną rolę w inicjacji i progresji nowotworu, a przez wielu autorów choroba nowotworowa jest uważana za chorobę zaburzonego cyklu komórkowego [3, 4].

II. Regulacja fazy G1 cyklu komórkowego

Regulacja cyklu komórkowego zachodzi przy udziale cyklinozależnych kinaz serynowo-treoninowych, cyklin stanowiących ich podjednostki regulatorowe oraz endogennych inhibitorów kinaz. Z biochemicznego punktu widzenia podstawową zasadą

presji genu kodującego cyklinę D1. Cyklina D1 jest podjednostką regulatorową kinaz cdk4/cdk6 [1, 6]. Proces tworzenia kompleksów cyklina D1-cdk4/cdk6 przebiega pod kontrolą kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ERK) (Ryc. 1). Powstałe kompleksy przenikają do jądra komórkowego, gdzie zostają uaktywnione przez kinazy CAK [7]. Kinazy cdk4/cdk6 fosforylują białko supresorowe pRb, które odłącza się od heterodimerowego czynnika transkrypcyjnego E2F-DP. Aktywny kompleks E2F-DP inicjuje ekspresję licznych genów odpowiedzialnych za przejście komórki z fazy G1 w fazę S cyklu komórkowego [2, 7]. Jednym z genów indukowanych przez czynnik transkrypcyjny E2F-DP jest gen kodujący cyklinę E. Kompleks cyklina E-cdk2, aktywny w późnej fazie G1, odpowiada m.in. za hiperfosforylację białka supresorowego pRb [1, 3, 7]. Interakcje zachodzące między białkiem pRb, czynnikiem transkrypcyjnym E2F-DP oraz cy-



Ryc. 1. Droga regulacyjna cyklu komórkowego z udziałem białek p16(INK4a)-cyklina D1-cdk4-pRb. Kinazy ERK — kontrolują proces tworzenia kompleksów cyklina D1-cdk4/cdk6. Kinazy CAK — aktywują kompleksy cyklina D1-cdk4/cdk6. Znak → oznacza przejście do następnego etapu drogi regulacyjnej, znak ⊥ oznacza hamowanie procesu łączenia cyklin D1 z kinazami cdk4/cdk6. Szczegółowy opis w tekście.

regulacji cyklu komórkowego jest uruchamianie kaskadowych reakcji fosforylacji i defosforylacji odpowiednich białek [5]. W fazie G1 wymienione wyżej reakcje podlegają kontroli sprawowanej przez drogi regulacyjne, w których uczestniczą białka supresorowe pRb oraz p53 [3]. Droga regulacyjna cyklu komórkowego przebiegająca z udziałem pRb obejmuje liczne białka posiadające właściwości promotorów lub inhibitorów cyklu komórkowego. Do białek posiadających właściwości promotorów zalicza się cykliny D (D1-D3) oraz kinazy cdk4/cdk6. Inhibitorami cyklu komórkowego są natomiast białka p16(INK4a), p15(INK4b), p18(INK4c) oraz białko supresorowe pRb [4].

Stymulacja mitogenna uruchamia kaskadę procesów biochemicznych prowadzącą do nasilenia eks-

klina E są przykładem mechanizmu dodatniego sprzężenia zwrotnego umożliwiającego przejście komórki przez tzw. punkt restrykcyjny G1/S [4, 7].

Droga regulacyjna cyklu komórkowego przebiegająca przy udziale białka pRb odpowiada również za zatrzymanie cyklu w fazie G1. W procesie tym uczestniczą białka p16(INK4a), p15(INK4b) oraz p18(INK4c), które swoiście hamują podjednostki katalityczne kinaz cdk4/cdk6 [4, 6]. Białka INK4 wiążą się z kinazami cdk4/cdk6 tworząc kompleksy. Kompleksy te hamują połączenie cyklin typu D z kinazami cdk4/cdk6 i tym samym hamują ich aktywację, co powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego [4, 7, 8].

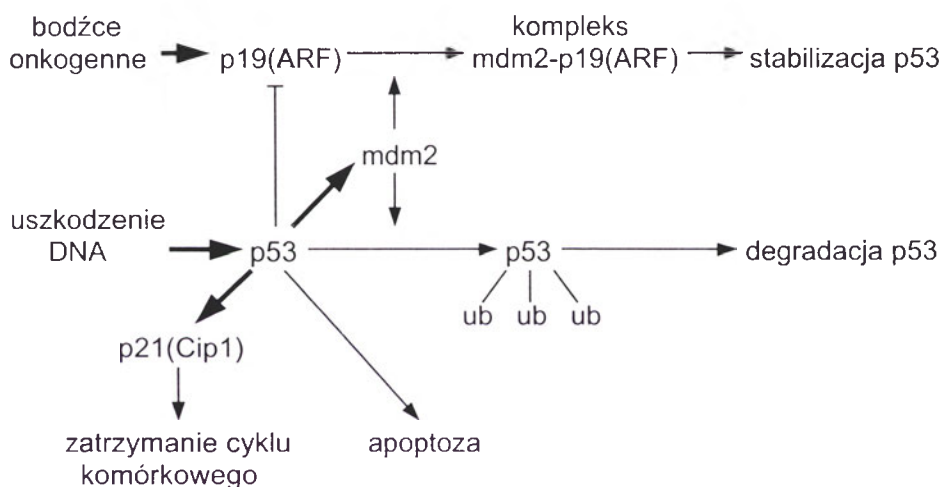
Inhibitorami kinaz zależnych od cyklin są również tzw. białka Cip/Kip — p21(Cip1), p27(Kip1), p57(Kip2) [6, 7]. Udział białek Cip/Kip w regulacji

cyklu komórkowego oraz w procesie onkogenezy został opisany w punktach III-1 i III-2.

Istotną rolę w kontroli cyklu komórkowego odgrywa białko supresorowe p53. Podstawową funkcją tego białka jest utrzymanie stabilności genomu narażonego na działanie czynników uszkodzających, np.: promieniowanie UV [9]. Uszkodzenie materiału genetycznego indukuje białko p53, które z kolei nasila ekspresję genu *Cip1*. Białko p21(Cip1) łączy się w nieaktywne kompleksy z dimerem cykliny E-cdk2, co w efekcie prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 [4, 7]. W przypadku nieefektywnej naprawy uszkodzonego DNA, białko p53 indukuje proces apoptozy, chroniąc w ten sposób komórkę przed kumulacją mutacji i transformacją nowotworową [9]. W warunkach fizjologicznych aktywność

III. Białka fazy G1 w procesie onkogenezy

Rozpatrując molekularne podstawy onkogenezy coraz częściej skupiamy się nad przebiegiem wieloelementowych dróg regulujących cykl komórkowy, kosztem zainteresowania poszczególnymi genami, czy też ich produktami białkowymi [4]. Wieloelementowe drogi regulacyjne działają jako jednostki funkcjonalne, które są dużo łatwiejszym celem dla mutagenów aniżeli pojedyncze geny [4]. Pojedyncza zmiana w obrębie jednego genu prawdopodobnie nie jest w stanie doprowadzić do transformacji nowotworowej. Zgodnie z hipotezą Knudsona, do rozwoju nowotworu potrzebny jest cały tor mutacyjny, czyli kolejno następujące po sobie mutacje w obrębie protoonkogenów lub/i antyonkogenów [11].



Ryc. 2. Droga regulacyjna cyklu komórkowego z udziałem białek p19(ARF)-mdm2- p53. W centrum schematu umieszczono białko mdm2 dla podkreślenia jego roli w regulacji funkcji białka supresorowego p53. Znak -- oznacza przejście do następnego etapu drogi regulacyjnej, znak -> oznacza nasilenie ekspresji genu kodującego dane białko, znak -- oznacza osłabienie ekspresji genu kodującego dane białko, skrót ub oznacza ubikwitynę. Szczegółowy opis w tekście.

białka p53 podlega precyzyjnej kontroli (Ryc. 2). Rolę regulatora funkcji białka p53 spełnia białko mdm2. Oddziaływanie między tymi białkami zachodzi na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [9]. Białko p53 nasila ekspresję genu *mdm2*, natomiast białko mdm2 tworzy z białkiem p53 heterodimer. Powstały heterodimer powoduje, iż białko p53 traci zdolność indukcji genów, a białko mdm2 działając jako ligaza ubikwitynowa, odpowiada za degradację proteolityczną białka p53 w proteasomie [9, 10]. Aktywność enzymatyczna białka mdm2 podlega kontroli sprawowanej przez białko p19(ARF). Interakcja między tymi białkami zależy od końca karboksylowego cząsteczki mdm2 oraz od końca aminowego białka p19(ARF). Kompleks białek mdm2-p19(ARF) pozbawiony jest aktywności ligazy ubikwitynowej przez co stabilizuje białko supresorowe p53 [10]. Białko p53 natomiast kontroluje ekspresję genu *INK4d* na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego [9, 10].

Faza G1 cyklu komórkowego może podlegać regulacji sprawowanej przez wiele antyonkogenów i protoonkogenów. Dlatego zaburzenia kontroli cyklu komórkowego prowadzące do rozwoju choroby nowotworowej najczęściej ujawniają się w fazie G1 oraz w punkcie restrykcyjnym G1/S [4]. W tabelach 1 i 2 podano przykłady mutacji/modyfikacji genów kodujących poszczególne białka regulujące cykl komórkowy i znajdowane w wielu różnych nowotworach.

III-1. Droga regulacyjna cyklu komórkowego z udziałem białek p19(ARF)-mdm2-p53

Gen *p53* jest najczęściej uszkodzonym genem w komórkach nowotworowych, a jego patologię stwierdzono w ponad połowie nowotworów występujących u człowieka [3]. Najczęściej spotykanymi mutacjami w obrębie genu *p53* są mutacje punktowe oraz delecje odcinka DNA od eksonu 5 do 8, który

decyduje o aktywności biologicznej białka p53 [12, 13]. Bardzo często mutacje punktowe dotyczą reszt aminokwasowych bezpośrednio oddziałujących z DNA, np. Arg-248 i Arg-273 [13, 14]. Zmutowane białko p53 charakteryzuje się wydłużonym okresem półtrwania (z 6-12 minut do około 12 godzin) oraz zdolnością tworzenia nieaktywnych kompleksów z prawidłowym białkiem p53 [11]. Podobne kompleksy z białkiem p53 tworzą również niektóre białka kodowane przez wirusy onkogenne (antygen T wirusa SV40, onkoproteina E1B adenowirusa oraz białko E6 wirusa HPV) [15]. Brak aktywnego białka p53 uniemożliwia zatrzymanie cyklu komórkowego oraz hamuje proces apoptozy indukowany przez czynniki genotoksyczne [10].

W komórkach, które „uwolniły się” spod kontroli drogi regulacyjnej opartej na działaniu p53 dochodzi

również na drodze niezależnej od białka p53, w związku z czym jego udział w onkogenezie wydaje się być bardziej złożony [16]. Prawdopodobnie, upośledzenie funkcji białka mdm2 może być również spowodowane przez mutacje zmiany *sensu* oraz mutacje typu *nonsense* w obrębie regionu palca cynkowego cząsteczki mdm2 [17].

Jednym z genów regulujących cykl komórkowy jest gen *Cip1* kodujący białko p21(Cip1). Ponieważ białko p21(Cip1) jest jednym z inhibitorów kinaz (CKI), należałoby oczekiwać, że wraz z obniżeniem poziomu inhibitora wzrośnie zdolność proliferacyjna komórki. Teza ta została potwierdzona jednak w przypadku nielicznych tylko nowotworów. Większość nowotworów charakteryzuje się natomiast nasiloną ekspresją genu *Cip1* (Tabela 1). Heterogenna ekspresja genu *Cip1* w ludzkich nowotworach

Tabela 1

Przykłady antyonkogenów fazy G1 cyklu komórkowego i ich udział w transformacji nowotworowej

Białko regulatorowe	Mutacja/modyfikacja genu	Nowotwory	Piśmiennictwo
p53	mutacje punktowe, delecje	ponad połowa nowotworów występujących u człowieka	[3, 12, 13]
pRb	mutacje punktowe, hipermetylacja promotora	siatkówczak złośliwy, drobnokomórkowy rak płuca, kostniakomięsak, rakowiak	[3, 23]
p15(INK4b)	delecje homozygotyczne hipermetylacja promotora	czerniak złośliwy, rak trzustki, rak szyjki macicy, kostniakomięsak, niedrobnokomórkowy rak płuca, nowotwory układu chłonnego, glejaki rak koleczystokomórkowy, chłoniak Burkitta, ostra białaczka szpikowa, ostra białaczka limfatyczna	[36; 48-53] [54-56]
p16(INK4a)	delecje homozygotyczne mutacje punktowe hipermetylacja promotora	glejaki, międzybłoniak, rak nosogardła, ostra białaczka limfatyczna, rak jajnika, rak pęcherza moczowego, mięsak, chłoniak mózgu rak dróg żółciowych, rak przelyku, czerniak złośliwy, rak trzustki ostra białaczka szpikowa, szpiczak mnogi, rak przelyku, rak szyjki macicy, niedrobnokomórkowy rak płuca	[3, 57] [3, 8, 58, 59] [60-64]
p19(ARF)	delecje eksonu 1β	linie komórkowe czerniaka (SK-MEL-5, A2058)	[29]
p21(Cip1)	nadekspresja genu osłabiona ekspresja genu	rak wątrobowokomórkowy, rak koleczystokomórkowy, niedrobnokomórkowy rak płuca rak żołądka, rak jelita grubego, rak jajnika, rak przelyku, niedrobnokomórkowy rak płuca	[18, 65, 66] [67-70]

m.in. do częstych mutacji spontanicznych, amplifikacji genów oraz aneuploidii. Taka niestabilność genomu znacznie podnosi prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej [10].

Ostatnie badania wykazały, że amplifikacja genu *mdm2* pociąga za sobą konsekwencje podobne do tych powodowanych przez mutacje genu *p53*. Nadekspresja genu *mdm2* doprowadza do zahamowania aktywności transkrypcyjnej białka p53 oraz nasila jego degradację na drodze ubikwitynowo-proteasomowej [13]. Na podstawie badań przeprowadzonych na myszach udowodniono, że białko mdm2 działa

związana jest prawdopodobnie ze złożoną rolą białka p21(Cip1) jaką odgrywa w regulacji cyklu komórkowego. Białko p21(Cip1) w zależności od stężenia może działać jako czynnik promujący lub hamujący cykl komórkowy. Właściwości promujące cykl komórkowy ujawniają się w przypadku niskiego poziomu białka p21(Cip1). Związane jest to z ułatwionym powstawaniem kompleksu cykliny D-cdk4/cdk6, stabilizacją kompleksu oraz przyspieszonym jego transportem do jądra komórkowego [4].

Znacznie trudniej wytłumaczyć wpływ nasilonej ekspresji genu *Cip1* na proces nowotworzenia. Do

zahamowania aktywności kompleksu cyklina D-cdk4/cdk6 dochodzi w przypadku przyłączenia więcej niż jednej cząsteczki białka p21(Cip1) do tego kompleksu [12]. W przypadku jednoczesnej nadekspresji genu kodującego cyklinę D1 oraz genu kodującego białko p21(Cip1) może dojść do względnego obniżenia poziomu inhibitora i ujawnienia jego aktywności katalitycznej, promującej cykl komórkowy [18].

Innym wytłumaczeniem zmiennej aktywności białka p21(Cip1) mogą być mutacje, które prowadzą do osłabienia właściwości inhibicyjnych białka p21(Cip1) z zachowaniem jego zdolności promujących cykl komórkowy [4, 19].

Niedawno odkryto nowy mechanizm dotyczący inaktywacji białka p21(Cip1) przez onkoproteiny wirusowe. Onkoproteina E7 wirusa HPV-16 upośledza hamowanie cyklu komórkowego indukowane uszkodzeniem DNA nawet przy wysokim poziomie białka p21(Cip1). Onkoproteina E7 wiąże się z karboksylowym końcem cząsteczki białka p21(Cip1), odpowiedzialnym za interakcje z kinazami cdk oraz z antygenem jądrowym PCNA. W związku z tym, wirus HPV-16 pozbawia białko p21(Cip1) możliwości inaktywacji kinaz cdk oraz zahamowania replikacji zależnej od PCNA [15, 20].

Jednym z białek drogi regulacyjnej cyklu komórkowego, w której uczestniczy p53 jest białko p19(ARF). Białko p19(ARF) występuje w komórkach mysich, a jego odpowiednikiem w komórkach ludzkich jest białko p14(ARF) [10]. Gen kodujący białko p19(ARF) występuje w krótkim ramieniu chromosomu 9 i razem z genami kodującymi białka p16(INK4a) oraz p15(INK4b) zajmuje *locus INK4A/ARF* [21]. Ponieważ białko p19(ARF) jest elementem drogi w której uczestniczy p53, a białko p16(INK4a) składnikiem drogi przebiegającej z udziałem pRb, *locus INK4A/ARF* jest jednym z miejsc, których uszkodzenie może doprowadzić do jednoczesnego upośledzenia funkcji obu dróg regulacyjnych [22]. Na podstawie analizy wielu różnych nowotworów stwierdzono, że uszkodzenie *locus INK4A/ARF* zachodzi z podobną częstością co uszkodzenie genu kodującego białko supresorowe p53. Szczególnie częste są zmiany typu delecji homozygotycznych, utraty heterozygotyczności całych fragmentów chromosomu, mutacje punktowe oraz zmiany w metylacji promotora (Tabela 1) [22-25]. Wykazano, że mutacje punktowe genu kodującego białko p16(INK4a) są trzy razy częstsze od mutacji występujących w genie kodującym białko p19(ARF) [22]. W większości przypadków, mutacje dotyczące *locus INK4A/ARF* nie upośledzają funkcji białka

p19(ARF), co wiąże się prawdopodobnie z częstym występowaniem mutacji w obrębie eksonu 2, podczas gdy za aktywność białka p19(ARF) odpowiada rzadko mutujący ekson 1 β [22, 26, 27]. Inaktywacja białka p16(INK4a) może odbywać się również na drodze interakcji z białkami wirusowymi. Jednym z takich białek jest cząsteczka Tax produkowana przez wirusy HTLV-1 wywołujące, tzw. białaczkę T-komórkową dorosłych. Białko Tax po przyłączeniu się do białka p16(INK4a) pozbawia go właściwości inhibitora kinaz cdk4/cdk6 doprowadzając do progresji cyklu komórkowego [28].

Dotychczas nie określono jednoznacznie roli białka p19(ARF) w procesie onkogenezy. Mutacje genu kodującego białko p19(ARF) wykazano w różnych guzach pierwotnych oraz liniach komórkowych, jednakże towarzyszyły one z reguły innym zaburzeniom w zakresie genu *INK4a* lub genu *p53* [22]. Wątpliwości dotyczące udziału białka p19(ARF) w onkogenezie zostały częściowo rozwiane dzięki badaniom linii komórkowych czerniaka (SK-MEL-5, A2058), w których znaleziono delecje dotyczące jedynie eksonu 1 β . Komórki tych linii syntetyzowały prawidłowe białka p16(INK4a) oraz p15(INK4b) w związku z czym wydaje się, że białko p19(ARF) może brać nieznany dotąd udział w procesie nowotworzenia [29]. Potwierdzeniem tej tezy może być fakt świadczący o tym, że myszy pozbawione eksonu 1 β chorowały częściej na nowotwory, pomimo prawidłowej ekspresji genu *INK4a* [26].

III-2. Droga regulacyjna cyklu komórkowego z udziałem białek p16(INK4a)-cyklina D1-cdk4-pRb

Droga regulacyjna cyklu komórkowego, w której uczestniczą białka pRb i p16(INK4a) obejmuje wiele antyonkogenów i protoonkogenów. Wśród białek supresorowych biorących udział w regulacji przebiegu tej drogi można wymienić białka p15(INK4b), p27(Kip1), p57(Kip2) oraz samo białko pRb. Grupę protoonkogenów reprezentują m.in. cykliny D, kinazy cdk4/cdk6 oraz cyklina E (Tabela 2). Uszkodzenie drogi regulacyjnej przebiegającej z udziałem białka pRb jest bardzo częste w nowotworach człowieka. Zarówno zwiększona aktywność protoonkogenów jak i utrata funkcji białek supresorowych może prowadzić do transformacji nowotworowej [3].

Najczęściej spotykanymi mutacjami w obrębie genu *CCND1*, kodującego cyklinę D1 są amplifikacje, translokacje oraz inwersje [1, 23]. Przykładem nowotworu w którym stwierdzono obecność mutacji typu inwersji jest gruczolak przytarczyc. Gen

CCND1 oraz gen *PTH*, kodujący hormon przytarczyc (parathormon), występują w chromosomie 11. W wyniku inwersji *inv(11)(p15;q13)* gen *PTH* zostaje umiejscowiony w pobliżu regionu promotorowego genu kodującego cyklinę D1. Wynikiem takiej mutacji jest nasilenie ekspresji genu *CCND1* i wzrost poziomu cykliny D1 w komórkach przytarczyc [1, 30]. W chłoniakach wywodzących się z komórek B za zwiększoną syntezę cykliny D1 odpowiedzialna jest translokacja *t(11;14)(q13;q32)*. W wyniku translokacji gen *CCND1* zostaje przeniesiony w okolice regulatorowe genu kodującego łańcuch ciężki

komieśsaków dodatkowych mechanizmów, niezależnych od inaktywacji białka pRb [33]. Mutacje zmiany sensu (*Arg24Cys*) w obrębie genu *CDK4* odkryto w wielu czerniakach złośliwych występujących rodzinnie. Zmiana ta prowadzi do uszkodzenia domeny wiążącej białko p16(*INK4a*) uniemożliwiając tym samym inaktywację kinazy *cdk4* w komórce nowotworowej [34, 35].

Białkami supresorowymi drogi regulacyjnej cyklu komórkowego z udziałem pRb są m. in. białka p16(*INK4a*), p15(*INK4b*), p27(*Kip1*) oraz p57(*Kip2*). Zmiany w obrębie genów kodujących

Tabela 2

Przykłady protoonkogenów fazy G1 cyklu komórkowego i ich udział w transformacji nowotworowej

Białko regulatorowe	Mutacja/modyfikacja genu	Nowotwory	Piśmiennictwo
cyklina D1	amplifikacja genu inwersja: <i>inv(11)(p15;q13)</i> translokacja: <i>t(11;14)(q13;q32)</i>	drobnokomórkowy i niedrobnokomórkowy rak płuca, rak pęcherza moczowego, rak kolczystokomórkowy, rak sutka, rak wątrobowokomórkowy, nowotwory układu pokarmowego, szpiczak mnogi gruczolak przytarczyc chłoniaki wywodzące się z komórek B, przewlekła białaczka limfatyczna, białaczka plazmocytoza	[1, 3; 71-74; 75] [1, 30] [30]
cyklina D2	nadekspresja genu insercje wirusowe (<i>HTLV-1, EBV</i>)	nowotwory jelita grubego, nowotwory jądra, rak żołądka białaczka T-komórkowa dorosłych, chłoniak Burkitta	[1, 76, 77] [78, 79]
Cyklina D3	nadekspresja genu	rak sutka, chłoniaki	[80]
cyklina E	amplifikacja genu	rak sutka, rak jelita grubego, rak żołądka	[1, 77]
<i>cdk4</i>	amplifikacja genu mutacje punktowe	kostniakomięsak, glejaki, rak sutka czerniak złośliwy	[32; 81-83] [35]
<i>mdm2</i>	amplifikacja genu	kostniakomięsak, glejakomięsak, rak przelyku, rak żołądka	[84-87]

immunoglobuliny. Taka sama mutacja została opisana w komórkach nowotworowych pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną oraz białaczkę plazmocytozą [30].

Protoonkogenami drogi regulacyjnej cyklu komórkowego z udziałem białka pRb są również kinazy *cdk4/cdk6*. Gen *CDK4* występuje w chromosomie 12q13, w obrębie którego znajdują się również inne geny, np. *mdm2* i geny *SAS*. Amplifikacje oraz mutacje genów *CDK4* i *CDK6* są stosunkowo częste w ludzkich nowotworach [23]. Nadekspresję genów *CDK4* oraz *mdm2* wykazano w przypadkach wielu mięsaków [31, 32]. Amplifikacja genu *CDK4* występuje głównie w kostniakomięsakach, a amplifikacja genu *mdm2* w mięsakiach tkanek miękkich. Nadekspresję genu *CDK4* stwierdzono również w komórkach niezawierających aktywnego białka pRb. Przemawia to za występowaniem w patogenezie kostnia-

białka *INK4* wykazano w nowotworach wielu typów. A to w przeciwieństwie do rzadko mutujących genów kodujących białka *Kip* sporadycznie występujących w guzach [3]. Najczęstszymi zmianami w obrębie genu *INK4b* są delecje homozygotyczne oraz hipermetylacja promotora [23]. Delecje homozygotyczne są z reguły tak duże, że obejmują również gen *INK4a* kodujący białko p16. Trudno więc określić znaczenie białka p15(*INK4a*) w transformacji nowotworowej [3, 22]. Białko 15(*INK4b*), podobnie jak białko p16(*INK4a*), odgrywa istotną rolę w patogenezie białaczki T-komórkowej dorosłych związanej z infekcją wirusem *HTLV-1*. Wirusowe białko Tax, po przyłączeniu do cząsteczki p15(*INK4b*), prowadzi do jej inaktywacji. Chroni to tym samym zainfekowane komórki T przed zatrzymaniem cyklu komórkowego indukowanym przez *TGF-β1* [28].

W nowotworach człowieka bardzo rzadko występują zmutowane geny kodujące białka p27(Kip1) oraz p57(Kip2) [12, 36]. Tylko nieliczne nowotwory wykazują zmiany struktury i funkcji białek Kip. Nieprawidłowa funkcja białek Kip najczęściej wynika z mutacji punktowych genów *Kip1* i *Kip2*, nasilonego obrotu białka p27(Kip1), jego inaktywacji przez onkoproteiny wirusowe (białko E1A adenowirusa i białko E7 wirusa HPV-16) oraz cyklinę K herpeswirusa HHV8. Wirus ten uważany jest za czynnik etiologiczny wielu chorób limfoproliferacyjnych oraz mięsaka Kaposiego [15, 23, 37]. Inaktywacja białka p27(Kip1) przez onkoproteiny wirusowe zachodzi na drodze bezpośredniej interakcji typu białko-białko [15]. Cyklina K natomiast łączy się z kinazą cdk6, która fosforyluje cząsteczkę p27(Kip1) w pozycji Thr-187 i nasila jej degradację [37].

Dużo większe znaczenie prognostyczne w chorobach nowotworowych przypisuje się białku p27(Kip1). W większości przypadków nowotwory charakteryzujące się obniżonym poziomem białka p27(Kip1) cechuje niski stopień zróżnicowania nowotworu [12]. Zależność taką wykazano w komórkach raka sutka, raka okrężnicy, raka żołądka oraz niedrobnokomórkowego raka płuca [38-41]. Wysoki poziom białka p27(Kip1) również może wskazywać na znaczną złośliwość nowotworu jak to ma miejsce w nowotworach szyjki macicy [42].

Zróżnicowane poziomy białka p27(Kip1) w nowotworach poszczególnych typów, przy jednoczesnym braku mutacji w obrębie kodującego to białko genu, sugerują udział mechanizmów potranskrypcyjnych i potranslacyjnych. Niedawno wysunięto nową hipotezę, według której inaktywacja białka p27(Kip1) jako inhibitora cyklin cdk, wynika z procesu sekwestracji zachodzącego w cytoplazmie komórki [43].

Ukazało się bardzo dużo prac wskazujących jednoznacznie na ogromną rolę białka pRb w procesie transformacji nowotworowej. Najczęściej spotykanymi zmianami dotyczącymi tego białka są mutacje inaktywujące, zmiany w metylacji promotora oraz zahamowanie aktywności białka pRb poprzez interakcje z onkoproteinami wirusowymi (antygen T wirusa SV40, onkoproteina E1B-55K adenowirusa oraz białko E6 wirusa HPV) [23, 15]. W procesie onkogenezy istotną rolę odgrywają również czynniki upośredzające łączenie białka pRb z deacetylazą histonową (HDAC). Zaburzenie interakcji pRb-HDAC może być spowodowane mutacjami punktowymi genu *Rb* w obrębie domeny wiążącej HDAC oraz onkoproteiną E7 wirusa HPV, która utrudnia łączenie pRb z HDAC [2]. W wyniku tych zmian następuje

uwolnienie czynnika E2F od represji transkrypcyjnej sprawowanej przez kompleks pRb-HDAC co przyspiesza przejście komórki do fazy S cyklu komórkowego [2, 15].

Uszkodzenie poszczególnych elementów drogi regulacyjnej opartej na działaniu białka pRb ma różne znaczenie w nowotworach poszczególnych typów. Utrata aktywności białka p16(INK4) stosunkowo często występuje w czerniakach i rakach trzustki, podczas gdy nadekspresja cykliny D1 dotyczy wielu chłoniaków, a brak aktywnego białka pRb stwierdza się bardzo często w raku drobnokomórkowym płuca [23]. Uszkodzenie białka pRb całkowicie eliminuje ten ważny punkt kontrolny, podczas gdy zmiany we wcześniejszych elementach tej drogi, np.: p16(INK4a), cykliny D1, cdk4/cdk6, mogą jedynie współuczestniczyć w procesie onkogenezy [44]. W wielu nowotworach zmiany dotyczą jednocześnie obu dróg regulacyjnych fazy G1, które współdziałają w transformacji nowotworowej upośredzając różne funkcje sprawowane w komórce. Klasycznym przykładem mogą być onkoproteiny wirusowe, które jednocześnie upośredzają funkcję białka pRb (przyspieszenie fazy G1 cyklu komórkowego) oraz neutralizują białko p53 (ochrona zmutowanej komórki przed apoptozą) [10].

IV. Uwagi końcowe

Proces onkogenezy najczęściej związany jest z uszkodzeniem fazy G1 cyklu komórkowego. Zrozumienie molekularnych mechanizmów regulujących tę fazę może mieć istotne znaczenie w poznaniu choroby nowotworowej oraz jej terapii. Dotyczy to szczególnie terapii genowej, w której przy pomocy odpowiednich wektorów wprowadza się do komórki nowotworowej prawidłowe geny (np. geny kodujące białka p16(INK4a), p21(Cip1), p53 oraz pRb) [45]. Oznaczanie stężeń białek regulujących fazę G1 ma również inne implikacje kliniczne. Na podstawie tych danych można często wnioskować o stopniu złośliwości nowotworu oraz o szansach przeżycia pacjenta [38-40]. Oznaczanie poziomu białek fazy G1 ma duże znaczenie w diagnostyce niektórych chorób nowotworowych, jak to ma miejsce w przypadku raka wątrobowokomórkowego [46]. Co więcej, w przypadku niektórych nowotworów można także prognozować skuteczność ewentualnego leczenia [47]. Dalsze badania nad regulatorami fazy G1 cyklu komórkowego przyczynią się prawdopodobnie do poprawienia wyników terapii oraz wykrywania w populacji osób szczególnie narażonych na choroby nowotworowe.

Piśmiennictwo

1. Grzelakowska-Sztabert B (1996) *Post Biochem* **42**: 99-107
2. Brehm A, Miska E, Reid J, Bannister A, Kouzarides T (1999) *Br J Cancer* **80**: 38-41
3. Sherr CJ (1996) *Science* **274**: 1672-1677
4. Bartek J, Lukas J, Bartkova J (1999) *J Pathol* **187**: 95-99
5. Grzelakowska-Sztabert B (1993) *Post Biochem* **39**: 16-25
6. Grzelakowska-Sztabert B (1995) *Post Biochem* **41**: 80-93
7. Sherr CJ, Roberts JM (1999) *Genes Dev* **13**: 1501-1512
8. Drewa G, Powierska-Czarny J (1998) *Post Hig Med Dośw* **4**: 367-380
9. Oren M, Rotter V (1999) *Cell Mol Life Sci* **55**: 9-11
10. Sherr CJ (1998) *Genes Dev* **12**: 2984-2991
11. Harłodzińska-Szmyrka A (1995) *Post Biochem* **41**: 7-15
12. Hussain SP, Harris CC (1998) *Cancer Res* **58**: 4023-4037
13. Schlichtholz B (1994) *Post Biochem* **40**: 211-221
14. Wiman KG (1997) *Exp Cell Res* **237**: 14-18
15. Funk JO, Galloway DA (1998) *TIBS* **23**: 337-341
16. Jones SN, Hancock AR, Vogel H, Donchower LA, Bradley A (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15608-15612
17. Schlott T, Reimer S, Jahns A, Ohlenbusch A, Ruschenburg I, Nagel H, Droese M (1997) *J Pathol* **182**: 54-61
18. Ng IOL, Lam KY, Ng M, Regezi JA (1999) *Oral Oncol* **35**: 63-69
19. Welcker M, Lukas J, Strauss M, Bartek J (1998) *Cancer Res* **58**: 5053-5056
20. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA (1997) *Genes Dev* **11**: 2090-2100
21. Lindstrom MS, Klangby U, Inoue R, Pisa P, Wiman KG, Asker CE (2000) *Exp Cell Res* **256**: 400-410
22. Sharpless NE, DePinho RA (1999) *Curr Opin Gen Dev* **9**: 22-30
23. Bartek J, Bartkova J, Lukas J (1997) *Exp Cell Res* **237**: 1-6
24. Yarbrough WG, Buckmire RA, Bessho M, Liu ET (1999) *J Natl Cancer Inst* **91**: 1569-1574
25. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa J-PJ, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB (1995) *Cancer Res* **55**: 4525-4530
26. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ (1997) *Cell* **91**: 649-659
27. Quelle DE, Cheng M, Ashmun RA, Sherr CJ (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 669-673
28. Suzuki T, Narita T, Uchida-Toita M, Yoshida M (1999) *Virology* **259**: 384-391
29. Kumar R, Sauroja I, Punnonen K, Jansen C, Hemminki K (1998) *Genes Chromosomes Cancer* **23**: 273-277
30. Motokura T, Arnold A (1993) *Biochim Biophys Acta* **1155**: 63-78
31. Yao J, Pollock RE, Lang A, Tan M, Pisters PW, Goodrich D, El-Naggar A, Yu D (1998) *Clin Cancer Res* **4**: 1065-1070
32. Wei G, Lonardo F, Ueda T, Kim T, Huvos AG, Healey JH, Ladanyi M (1999) *Int J Cancer* **80**: 199-204
33. Kanoe H, Nakayama T, Murakami H, Hosaka T, Yamamoto H, Nakashima Y, Tsuboyama T, Nakamura T, Sasaki MS, Toguchida J (1998) *Anticancer Res* **18**: 2317-2321
34. Platz A, Hansson J, Ringborg U (1998) *Int J Cancer* **78**: 13-15
35. Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, Alsnér J, Kirkin AF, Zeuthen J, Bartek J (1996) *Cancer Res* **56**: 5475-5483
36. Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castresana JS, Rubio M-P, Pastorfide GC, Boyer LA, Kao WH, Bulyk ML, Barnhill RL, Hayward NK, Housman DE, Fountain JW (1996) *Cancer Res* **56**: 5023-5032
37. Mann DJ, Child ES, Swanton C, Laman H, Jones N (1999) *EMBO J* **18**: 654-633
38. Chu JS, Huang CS, Chang KJ (1999) *Cancer Letters* **141**: 123-130
39. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M (1997) *Nat Med* **3**: 231-234
40. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Tanaka S, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T (1997) *Nat Med* **3**: 593
41. Catzavelos C, Tsao MS, DeBoer G, Bhattacharya N, Shepherd FA, Slingerland JM (1999) *Cancer Res* **59**: 684-688
42. Dellas A, Schultheiss E, Leivas MR, Moch H, Torhorst J (1998) *Anticancer Res* **18**: 3991-3996
43. Sgambato A, Ratto C, Faraglia B, Merico M, Ardito R, Schinzari G, Romano G, Cittadini AR (1999) *Mol Carcinog* **26**: 172-179
44. Lukas J, Aagaard L, Strauss M, Bartek J (1995) *Cancer Res* **55**: 4818-4823
45. Strauss BE, Costanzi-Strauss E (1999) *Braz J Med Biol Res* **32**: 905-914
46. Schlott T, Ahrens K, Ruschenburg I, Reimer S, Hartmann H, Droese M (1999) *Br J Cancer* **80**: 73-78
47. Marks DI, Kurz BW, Link MP, Ng E, Shuster JJ, Lauer SJ, Carroll D, Brodsky I, Haines DS (1997) *J Clin Oncol* **15**: 1158-1162
48. Villanueva A, Garcia C, Paules AB, Vicente M, Megias M, Reyes G, de-Villalonga P, Agell N, Lluís F, Bachs O, Capella G (1998) *Oncogene* **17**: 1969-1978
49. Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, Haba T, Yoshino K, Wada H, Kurachi H, Sasaki M, Wakasa K, Inoue M, Buzard G, Murata Y (1999) *Br J Cancer* **80**: 458-467
50. Kawamata N, Miller CW, Koeffler HP (1995) *Mol Carcinog* **14**: 263-268
51. Hangaishi A, Ogawa S, Imamura N, Miyawaki S, Miura Y, Uike N, Shimazaki C, Emi N, Takeyama K, Hirosawa S, Kamada N, Kobayashi Y, Takemoto Y, Kitani T, Toyama K, Ohtake S, Yazaki Y, Ueda R, Hirai H (1996) *Blood* **87**: 4949-4958
52. Miller CW, Aslo A, Campbell MJ, Kawamata N, Lampkin BC, Koeffler HP (1996) *Cancer Genet Cytogenet* **86**: 136-142
53. Simon M, Koster G, Menon AG, Schramm J (1999) *Acta Neuropathol Berl* **98**: 444-452
54. Zhao Y, Zhang S, Fu B, Xiao C (1999) *Cancer Genet Cytogenet* **112**: 26-33
55. Klangby U, Okan I, Magnusson KP, Wendland M, Lind P, Wiman KG (1998) *Blood* **91**: 1680-1687
56. Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC (2000) *Blood* **95**: 1942-1949
57. Kumanishi T, Zhang S, Ichikawa T, Endo S, Washiyama K (1996) *Jpn J Cancer Res* **87**: 691-695
58. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC (1994) *Nat Genet* **8**: 15-21
59. Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG (1997) *Cancer Res* **57**: 3126-3130
60. Guo SX, Taki T, Ohnishi H, Piao HY, Tabuchi K, Bessho F, Hanada R, Yanagisawa M, Hayashi Y (2000) *Leuk Res* **24**: 39-46

61. Ng MH, Chung YF, Lo KW, Wickham NW, Lee JC, Huang DP (1997) *Blood* **89**: 2500-2506
62. Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, Yang CS (1999) *Clin Cancer Res* **5**: 2704-2713
63. Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Nobori T, Yu AL, Yu J, Batova A, Lai KW, Chang AM (1999) *Cancer Lett* **136**: 231-235
64. Vonlanthen S, Heighway J, Tschan MP, Borner MM, Altermatt HJ, Kappeler A, Tobler A, Fey MF, Thatcher N, Yarbrough WG, Betticher DC (1998) *Oncogene* **17**: 2779-2785
65. Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Merlo G, Angeletti CA, Dalla-Palma P, Bevilacqua G (1996) *Oncogene* **12**: 1319-1324
66. Qin LF, Ng IOL, Fan ST, Ng M (1998) *Int J Cancer* **79**: 424-428
67. El-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, Kinzler KW (1995) *Cancer Res* **55**: 2910-2929
68. Lukas J, Groshen S, Saffari B, Niu N, Reles A, Wen WH, Felix J, Jones LA, Hall FL, Press MF (1997) *Am J Pathol* **150**: 167-175
69. Seta T, Imazeki F, Yokosuka O, Saisho H, Suzuki T, Koide Y, Isono K (1998) *Dig Dis Sci* **43**: 279-289
70. Vonlanthen S, Heigway J, Kappler A, Altermatt HJ, Borner MM, Betticher DC (2000) *Int J Oncol* **16**: 951-957
71. Nagai MA (1999) *Braz J Med Biol Res* **32**: 897-904
72. Barnes DM, Gillett CE (1998) *Breast Cancer Res Treat* **52**: 91-105
73. Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Gaeta P, La-Rocca R, Merlo G, Chella A, Angeletti CA, Dalla Palma P, Bevilacqua G (1998) *Int J Cancer* **75**: 187-192
74. Hui AM, Makuuchi M, Li X (1998) *Hepatogastroenterology* **45**: 1635-1642
75. Hocchtlen-Vollmar W, Menzel G, Bartl R, Lamerz R, Wick M, Seidel D (2000) *Br J Haematol* **109**: 30-38
76. Bartkova J, Rajpert-de Meyts E, Skakkeback NE, Bartek J (1999) *J Pathol* **187**: 573-581
77. Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi H, Okayasu I (2000) *Am J Pathol* **156**: 585-594
78. Santiago F, Clark E, Chong S, Molina C, Mozafari F, Mahieux R, Fujii M, Azimi N, Kashanchi F (1999) *J Virol* **73**: 9917-9927
79. Spender LC, Cannell EJ, Hollyoake M, Wensing B, Gawn JM, Brimmell M, Packham G, Farrell PJ (1999) *J Virol* **73**: 4678-4688
80. Bartkova J, Zemanova M, Bartek J (1996) *Int J Cancer* **65**: 323-327
81. He J, Olson JJ, James CD (1995) *Cancer Res* **55**: 4833-4836
82. An HX, Beckmann MW, Reifenberger G, Bender HG, Niederacher D (1999) *Am J Pathol* **154**: 113-118
83. Lam PY, DiTomaso E, Ng HK, Pang JC, Roussel MF, Hjelm NM (2000) *Br J Neurosurg* **14**: 28-32
84. Yokoyama R, Schneider-Stock R, Radig K, Wex T, Roessner A (1998) *Pathol Res Pract* **194**: 615-621
85. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H (1997) *J Neuropathol Exp Neurol* **56**: 180-185
86. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 3453-3459
87. Gunther T, Schneider-Stock R, Hackel C, Kasper HU, Pross M, Hackelsberger A, Lippert H, Roessner A (2000) *Mod Pathol* **13**: 621-626

Glutation: niezwykle funkcje pospolitego tripeptydu

Glutathione: unusual functions of the common tripeptide

KATARZYNA WINIARSKA

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Synteza i degradacja glutationu
- III. Glutation jako przeciwutleniacz i regulator wewnątrzkomórkowego stanu redoks
- IV. Koniugaty glutationowe
- V. Rola glutationu w procesie apoptozy
- VI. Glutation a stany patologiczne
- VII. Zastosowanie glutationu w terapii
- VIII. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Glutathione synthesis and degradation
- III. Glutathione as antioxidant and intracellular redox status regulator
- IV. Glutathione conjugates
- V. The role of glutathione in apoptosis
- VI. Glutathione and pathology
- VII. Glutathione therapy
- VIII. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: AIF – czynnik inicjujący apoptozę, DHA – dehydroaskorbinian, GCS – syntetaza γ -glutamylcysteiny, GEE – monoetylowy ester glutationowy, GSH – zredukowany glutation, GSSG – utleniony glutation, LTA₄ – leukotrien A₄, LTC₄ – leukotrien C₄, LTE₄ – leukotrien E₄, NAC – N-acetylocysteina, OTZ – kwas 2-oksotiazolidyno-4-karboxyloowy, PGA₁ – prostaglandyna A₁, PGA₂ – prostaglandyna A₂, 9-deoksy- Δ^9 , Δ^{12} -PGD₂ – 9-deoksy- Δ^9 , Δ^{12} -prostaglandyna D₂

I. Wstęp

Od odkrycia glutationu (γ -glutamylcysteinyloglicyny; Ryc.1) upłynęło wprawdzie ponad sto lat, jednakże biologiczna rola tego związku wciąż kryje w sobie wiele zagadek. O szczególnym znaczeniu glutationu świadczy już sama powszechność jego występowania. W komórkach ssaków tripeptyd ten jest podstawowym niebiałkowym związkiem tiolowym. Jego wewnątrzkomórkowe stężenie waha się w zakresie od 0,5 do 10 mM w zależności od rodzaju tkanki [1]. Najwyższą zawartością glutationu charakteryzują się komórki wątroby i nerki. Niemal 90% wewnątrzkomórkowego glutationu stanowi pula cytosolowa, około 10% - mitochondrialna [2]. Ponadto obecność niewielkich ilości tego związku stwierdzono na terenie jądra komórkowego [3] i retikulum en-

doplazmatycznego [4]. Glutation występuje także w płynach ustrojowych takich jak osocze krwi i żółć. Zewnątrzkomórkowe stężenie glutationu jest jednak 3-4 rzędy wielkości niższe od wewnątrzkomórkowego [5].

W warunkach fizjologicznych ponad 98% wewnątrzkomórkowego glutationu stanowi zredukowana forma tiolowa (GSH). Pozostała część to przede wszystkim utleniona forma dwusiarczkowa (GSSG) oraz mieszane dwusiarczki (głównie GS-S-białko). Jedynie śladowe ilości glutationu są obecne w postaci tioeterów i innych koniugatów [5,6].

II. Synteza i degradacja glutationu

Zagadnienia dotyczące metabolizmu glutationu były już kilka lat temu poruszane na łamach *Postępów Biochemii* przez Bartosza [7].

Wszystkie komórki ssaków mogą wytwarzać glutation z prekursorowych aminokwasów, jednak głównym miejscem jego syntezy w organizmie jest wątroba [8], na terenie której odbywa się produkcja cysteiny z wykorzystaniem metioniny jako źródła siarki [9].

Synteza glutationu zachodzi w cytosolu i obejmuje dwie kolejne reakcje enzymatyczne, z których każda wymaga udziału energii w postaci ATP:

- (1) L-glutaminian + L-cysteina + ATP \rightarrow
 γ -glutamylcysteina + ADP + P_i
- (2) γ -glutamylcysteina + L-glicyna + ATP \rightarrow
GSH + ADP + P_i

Mgr, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. I. Miecznikowa 1, 02-089 Warszawa, tel/fax (022) 554 3208, e-mail: K.Winiarska@biol.uw.edu.pl

Proces wytwarzania glutationu jest regulowany na etapie pierwszej reakcji (1) katalizowanej przez specyficzną względem reszty glutamylowej syntetazę γ -glutamylcysteiny (GCS). Enzym ten jest hamowany na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez GSH ($K_i=2,3$ mM) [10]. W warunkach fizjologicznych decydujące znaczenie dla aktywności GCS ma jednak przede wszystkim dostępność cysteiny [8, 11]. Aktywność GCS jest ponadto regulowana na poziomie transkrypcyjnym przez stres oksydacyjny [12-16], cytokiny: TNF- α i interleukinę 1 β [17-19], przeciw-

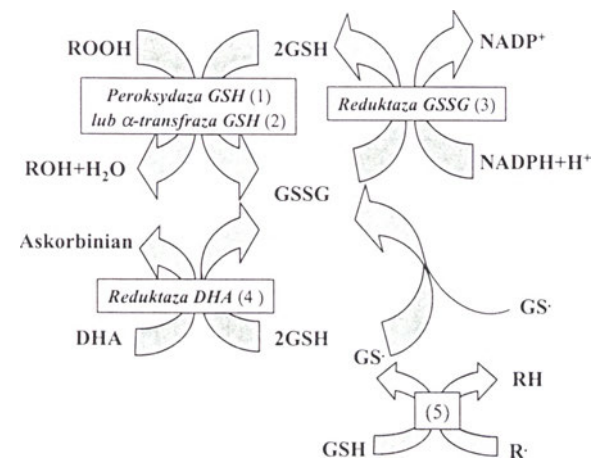
charakteryzują się kanaliki nerkowe [26, 27], które wydają się być ostatecznym miejscem katabolizmu glutationu w organizmie.

III. Glutation jako przeciwutleniacz i regulator wewnątrzkomórkowego stanu redoks

Wszystkie aerobowe organizmy są potencjalnie narażone na stres oksydacyjny jako konsekwencję tlenowego metabolizmu. Wzrost stężenia związków takich jak O $_2^-$ lub H $_2$ O $_2$ może prowadzić do nieodwracalnego utlenienia grup SH w białkach i do peroksydacji lipidów, a w następstwie — do trwałego uszkodzenia komórki. Dzięki zdolności do redukcji nadtlenków oraz utrzymywania odpowiedniego stanu zredukowania grup SH w białkach GSH stanowi pierwszą linię obrony komórki przed następstwami stresu oksydacyjnego.

Mechanizm działania glutationu jako swoistego wewnątrzkomórkowego buforu grup SH, zapobiegającego trwałemu utlenieniu reszt cysteiny w białkach, został szczegółowo omówiony na łamach *Postępów Biochemii* przez Lenartowicz i wsp. [28]. Wewnątrzkomórkowa równowaga tiol-dwusiarczek wydaje się mieć istotne znaczenie regulacyjne dla przebiegu wielu procesów metabolicznych. W Tabeli 1 zestawiono przykłady enzymów, których aktywność jest odwracalnie regulowana w wyniku zmian stopnia zredukowania grup SH. Modyfikacja aktywności enzymów może przejawiać się zmianą wartości V_{max} lub K_m , ale także zmianą wrażliwości na różnego rodzaju aktywatory i inhibitory. Większość opisanych w Tabeli 1 efektów uzyskiwano w obecności fizjologicznych stężeń GSSG, co sugeruje, że mogą one mieć znaczenie *in vivo*.

Stopień zredukowania grup tiolowych wpływa również na aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych. W wielu jednak przypadkach wyniki doświadczeń, których obiektem były nienaruszone komórki, okazują się całkowicie odmienne od danych dotyczących oczyszczonych białek. Przykładem może być czynnik transkrypcyjny AP1, tworzony przez kompleks białek z rodziny Jun i Fos [36]. Obserwowano wzmożone wiązanie oczyszczonego AP1 z DNA po przesunięciu równowagi redoks w stronę warunków redukujących [37], natomiast z badań na hodowli komórkowej wynika, że do aktywacji AP1 wymagane są warunki utleniające [38-40]. Podobnie, oczyszczony czynnik transkrypcyjny NF κ B łatwiej wiąże się z DNA w obecności antyoksydantów, z GSH i jego prekursorami włącznie [41, 42], ale w nienaruszonych komórkach aktywacja tego czynnika transkrypcyjnego następuje, gdy równowa-



Ryc. 1. Glutation (γ -glutamylcysteinylglicyna)

utleniacze [20, 21] oraz hormony: insulinę i glukokortykoidy [22, 23]. Stwierdzono również, że aktywność tego enzymu zmienia się zależnie od fazy cyklu komórkowego [24, 25]. Drugi, nie podlegający regulacji, etap syntezy glutationu (2) katalizuje syntetaza glutationowa.

Dzięki temu, że wiązanie peptydowe między cysteiną a glutaminianem jest tworzone przy udziale γ -karboksylowej grupy glutaminianu, cząsteczka glutationu wykazuje oporność na działanie wewnątrzkomórkowych peptydaz [11]. Jedynym enzymem zdolnym do hydrolizy tego wiązania jest występująca po zewnętrznej stronie błony komórkowej γ -glutamylotranspeptydaza [8, 11]. Degradacja glutationu, podobnie jak jego synteza, przebiega w dwóch etapach:

- (1) GSH + aminokwas \rightarrow L-glutamyl-aminokwas + L-cysteinylglicyna
- (2) L-cysteinylglicyna \rightarrow L-cysteina + L-glicyna

Uczestniczące w degradacji glutationu enzymy: γ -glutamylotranspeptydaza (1) i dipeptydazy (2) są białkami błonowymi zlokalizowanymi głównie po stronie apikalnej komórek nabłonkowych [11]. Szczególnie wysoką aktywnością tych enzymów

ga redoks zostanie przesunięta w stronę warunków silnie utleniających [39, 43-45]. Co więcej, doświadczalne uzupełnienie wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu za pomocą inkubacji z prekursorami cysteiny znosi wywołaną przez stres oksydacyjny aktywację NFκB [45]. Także w domenie wiążącej się

może być również wynikiem bezpośredniej reakcji GSH z rodnikiem hydroksylowym (5) [51]. Jeżeli, w warunkach silnego stresu oksydacyjnego, redukcja GSSG przestaje być dostatecznie efektywna, wówczas komórka broni się przed przesunięciem równowagi redoks usuwając GSSG, co oczywiście prowadzi do obniżenia całkowitej zawartości glutationu w komórce [52].

Tabela 1

Enzymy modyfikowane na drodze wymiany tiol-dwusiarczek

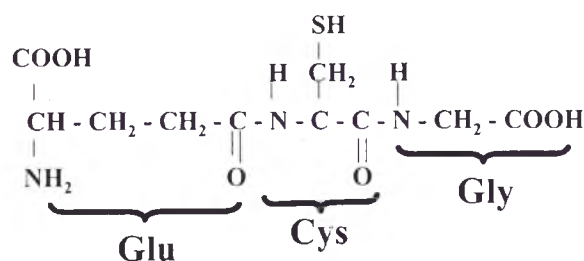
Enzymy	Piśmiennictwo
<i>Inaktywowane przez GSSG:</i>	
Syntaza glikogenu	[29]
Fosfofruktokinaza-1	[30]
Kinaza pirogronianowa	[31]
Syntetaza kwasów tłuszczowych	[32]
Cyklaza guanylowa	[33]
<i>Aktywowane przez GSSG:</i>	
Fruktozo-1,6-bis-fosfataza	[34]
Glukoza-6-fosfataza	[34]
Dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa	[34]
Kolagenaza	[35]

z DNA białka p53, znanego jako supresor procesów nowotworzenia [46], występują wysoce konserwowane reszty cysteiny [47], co pozwala przypuszczać, że stopień ich zredukowania może regulować aktywność tego czynnika transkrypcyjnego. I w tym przypadku uzyskano jednak sprzeczne wyniki w doświadczeniach prowadzonych na hodowlach komórkowych i na izolowanym białku [48].

Udział GSH w detoksykacji H₂O₂, nadtlenków organicznych i wolnych rodników obrazuje Ryc. 2. Redukcja H₂O₂ i organicznych nadtlenków odbywa się głównie w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową (1), selenoproteinę obecną zarówno w mitochondriach jak i w cytosolu [49]. Szczególnie ważną rolę odgrywa peroksydaza glutationowa w mitochondriach, w których nie występuje katalaza, inny enzym zdolny do detoksykacji H₂O₂. S-transferazy glutationowe (2) klasy α także wykazują aktywność peroksydazową, ale jedynie w stosunku do organicznych nadtlenków [6]. Powstający podczas redukcji nadtlenków GSSG podlega redukcji przy udziale reduktazy glutationowej (3). Odtwarzanie GSH odbywa się kosztem NADPH, dowodząc ścisłego powiązania między oboma układami redoks. Układ GSH/GSSG współdziała także z parą redoks tworzoną przez askorbinian i dehydroaskorbinian. Regeneracja askorbinianu z dehydroaskorbinianu odbywa się z jednoczesnym utlenieniem GSH do GSSG (4) [50]. Utlenienie GSH do GSSG nie zawsze jednak zachodzi na drodze enzymatycznej,

IV. Koniugaty glutationowe

Nukleofilowy charakter glutationu sprawia, że związek ten szczególnie łatwo reaguje zarówno z endo- jak i egzogennymi związkami elektrofilowymi. Tworzenie koniugatów może zachodzić spontanicznie, ale zazwyczaj wymaga obecności S-transferaz glutationowych [53, 54], których szczególnie wysoką aktywność wykazują komórki wątroby. S-transferazy glutationowe występują głównie w cytosolu, choć ich obecność stwierdzono także w retikulum endoplazmatycznym. Enzymy te mają postać homolub heterodimerów o masie molekularnej podjednostek mieszczącej się w zakresie od 24 do 27,5 kDa [55]. S-transferazy glutationowe wykazują bardzo



Ryc. 2. Glutationowy cykl redoks i reakcje z nim powiązane. Utleniony glutation powstaje podczas redukcji nadtlenków (1, 2), regeneracji askorbinianu z dehydroaskorbinianu (DHA) (4) oraz w wyniku reakcji wolnorodnikowych (5). Odtwarzanie zredukowanego glutationu odbywa się kosztem NADPH (3).

wysoką specyficzność względem glutationu i znacznie niższą względem drugiego substratu [55]. Na podstawie różnic strukturalnych i immunochemicznych oraz specyficzności substratowej wyodrębniono cztery klasy S-transferaz glutationowych: α, μ, τ i π [56, 57].

Koniugaty glutationowe są z komórek usuwane do krwi lub, w przypadku hepatocytów, do żółci. Ich katabolizm przebiega przy udziale tych samych enzymów, które uczestniczą w degradacji glutationu. W pierwszym etapie przy udziale γ-glutamylotranspeptydazy zostaje usunięta reszta glutamylowa, następnie dipeptydazy hydrolizują wiązanie peptydowe między cysteiną a glicyną, uwalniając koniugat cy-

steinowy, który najczęściej podlega jeszcze N-acetylacji. Powstałe w ten sposób merkapturany są łatwo wydalane z moczem. Opisany powyżej szlak przemian metabolicznych służy detoksykacji wielu ksenobiotyków, wśród nich tak popularnego leku jak paracetamol [5].

Udział GSH w detoksykacji ksenobiotyków jest znany od dawna, ostatnio natomiast coraz większe zainteresowanie towarzyszy endogennym koniugatom glutationowym (Tabela 2). Ich biologiczna funk-

wysoka specyficzność względem obu substratów [75]. LTC₄ może być przekształcany w leukotrien D₄ (LTD₄) poprzez usunięcie reszty glutamylowej, a następnie — w leukotrien E₄ (LTE₄) w wyniku odłączenia glicyny. Leukotrieny cysteinowe uczestniczą w reakcjach zapalnych i anafilaktycznych [58,76,77]. Przypisuje się im istotną rolę w rozwoju astmy [78].

Prostaglandyny. Te pochodne kwasu arachidonowego powstają na terenie niemal wszystkich komórek ssaków [79]. Ich fizjologiczne działanie jest nie-

Tabela 2

Endogenne koniugaty glutationowe

Drugi składnik	Występowanie	Piśmiennictwo
Leukotrien A ₄	Różne tkanki	[58]
Prostaglandyna A ₂	Komórki białaczki mysiej	[59]
Prostaglandyna A ₁	Wątroba człowieka i szczura	[60]
Hepoksylina A ₃	Mózg szczura	[61]
4-hydroksynonenal		[62]
4-hydroksyheksenal		[63]
Tlenek azotu	Ludzkie neutrofile i drogi oddechowe	[64]
Dopamina	Mózg	[65]
Dopa	Komórki melanomy złośliwej	[66]
Koenczym A	Wątroba szczura	[67]
Palmitylkoenczym A	Mózg i wątroba szczura	[68]
17-β-estradiol	Mikrosomy wątroby chomika	[69]
Witamina K ₃	Śródbłonek tętnicy płucnej wołu	[70]

cja obejmuje m.in. inaktywację lub regulację aktywności potencjalnie toksycznych związków, udział w przekazywaniu sygnałów, stabilizację nietrwałych związków oraz usprawnianie transportu niektórych związków przez błony. Dzięki zdolności do chelatowania metali (Cu (I), Cu (II), Se, Zn, Cr) [71-74] glutation odgrywa istotną rolę w magazynowaniu jonów tych metali oraz ich transportowaniu przez błony biologiczne. Poniżej przedstawiono krótki przegląd wybranych endogennych koniugatów glutationowych.

Leukotrieny. Są biologicznie czynnymi związkami syntetyzowanymi z kwasu arachidonowego w odpowiedzi na rozmaite czynniki stymulujące procesy immunologiczne i zapalne. Leukotrieny mogą być wytwarzane przez białe krwinki (makrofagi, monocyty, neutrofile i eozynofile) oraz komórki płuc, śledziony, mózgu i serca [58]. Leukotrien C₄ (LTC₄) powstaje w wyniku glutationylacji leukotrienu A₄ (LTA₄). Reakcję tę katalizuje dość nietypowa S-transferaza glutationowa, jaką jest syntaza leukotrienu C₄. O niezwykłym charakterze tego enzymu decyduje nie tylko błonowa lokalizacja, ale także

zwykle wszechstronne i obejmuje m.in. regulację proliferacji komórek, reakcje zapalne, wywoływanie gorączki, regulację ciśnienia krwi oraz inicjowanie procesu krzepnięcia krwi.

Koniugaty z glutationem mogą tworzyć, potencjalnie cytotoksyczne, prostaglandyny A₁ (PGA₁) i A₂ (PGA₂) [59, 60]. Stwierdzono, że charakteryzujące się obniżonym poziomem glutationu komórki leukemii mysiej są niewrażliwe na cytotoksyczne działanie PGA₂, co mogłoby sugerować, że tworzenie koniugatów PGA₂-GSH ma decydujące znaczenie dla cytotoksycznego efektu wywieranego przez PGA₂ [59]. Tworzenie koniugatów glutationowych może także modulować antyproliferacyjną aktywność 9-deoksy-Δ⁹, Δ¹²-prostaglandyny D₂ (9-deoksy-Δ⁹, Δ¹²-PGD₂) [80].

Hydroksyalkenale. Powstają podczas utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidów błonowych. Cytotoksyczne działanie hydroksyalkenali obejmuje m.in. inhibicję syntezy DNA, RNA i białka [81]. Uważa się, że tworzenie koniugatów z GSH [62,82] jest sposobem detoksykacji hydroksyalkenali.

Tlenek azotu. Jest niezwykle gazową cząsteczką sygnałową, aktywatorem cytosolowej cykazy guanilowej [83]. W układach biologicznych tlenek azotu jest związkiem nietrwałym, od dawna więc postulowano istnienie stabilizujących go cząsteczek nośnikowych pozwalających na zachowanie jego biologicznej aktywności. Ostatnio coraz częściej uważa się, że funkcję tę mogą pełnić właśnie związki tiolowe, w tym glutation. Obecność mikromolowych stężeń S-nitrozoglutationu stwierdzono w neutrofilach i nabłonku dróg oddechowych [64, 84].

Inne znane endogenne związki tworzące koniugaty z glutationem to: dopamina [65], dopa [66], hepoksyny [61], palmitylokoenzym A [68], koenzym A [67], 17- β -estradiol [69] oraz witamina K [70].

V. Rola glutationu w procesie apoptozy

W ostatniej dekadzie jeden z głównych trendów badań nad glutationem dotyczył jego roli w inicjowaniu i przebiegu procesu apoptozy – programowanej śmierci komórki. Przesunięcie wewnątrzkomórkowego stanu redoks w stronę środowiska bardziej utleniającego jest typowe dla wielu szlaków indukcji apoptozy. Prowadząca do apoptozy zmiana stanu redoks komórki może być następstwem zwiększonego wytwarzania wolnych rodników lub osłabionego działania ochronnego wewnątrzkomórkowych przeciwutleniaczy. Dwa lata temu w *Postęпах Biochemii* ukazała się praca przeglądowa Bartosza dotycząca roli reaktywnych form tlenu w procesie apoptozy [85].

Punktem wyjścia do rozważań nad znaczeniem glutationu w apoptozie stała się obserwacja, że we wczesnych jej stadiach obniżeniu ulega wewnątrzkomórkowy poziom GSH [86-92]. Hipotezę dotyczącą udziału glutationu w regulacji procesu apoptozy potwierdza również fakt, że uzupełnianie wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu opóźnia przebieg apoptozy [88-91, 93, 94]. Przypuszcza się, że obniżony poziom GSH i towarzyszące mu nagromadzenie się wolnych rodników jest przyczyną dysfunkcji mitochondriów odgrywającej decydującą rolę w kaskadzie apoptotycznej [91, 92, 95, 96]. Zaburzenie mitochondrialnego potencjału błonowego prowadzi do otwarcia megakanałów w błonie mitochondrialnej, zmiany przepuszczalności tej błony i przemieszczenia się do cytosolu cytochromu *c* i czynnika inicjującego apoptozę (AIF). Zagadnienia te są przedmiotem artykułu Grądzkiej zamieszczonego na łamach tegorocznych *Postępów Biochemii* [97].

O istotnej roli glutationu w procesie apoptozy świadczą dane dotyczące wpływu białka Bcl-2,

głównego inhibitora apoptozy [98, 99], na wewnątrzkomórkową zawartość tego tripeptydu. Podczas ekspresji Bcl-2 obserwowano podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu GSH i zwiększenie stosunku GSH/GSSG [100-103], mimo że aktywność syntetazy γ -glutamylcysteinowej nie zmienia się [100]. Wydaje się więc, że podwyższone przez Bcl-2 wewnątrzkomórkowe stężenie GSH jest wynikiem zahamowania jego transportu na zewnątrz komórki [100]. Komórki wykazujące nadekspresję Bcl-2 ulegają apoptozie po doświadczalnym obniżeniu stężenia GSH, chociaż poziom samego Bcl-2 pozostaje niezmienny [104]. Obserwacja ta stanowi poważny argument na poparcie hipotezy, że glutation pośredniczy w antyapoptotycznym działaniu Bcl-2. Bardzo interesujący wydaje się również wpływ, jaki Bcl-2 wywiera na wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie glutationu. Stwierdzono bowiem, że ekspresji Bcl-2 towarzyszy przemieszczenie GSH do jądra komórkowego [3] powodujące zmianę stanu redoks wewnątrz jądra, która może wpływać na aktywność czynników transkrypcyjnych.

Wiedza o roli glutationu w kaskadzie apoptotycznej jest jednak jeszcze niepełna i wiele szczegółów wciąż wymaga wyjaśnienia.

VI. Glutation a stany patologiczne

W świetle przedstawionych w poprzednich rozdziałach faktów dowodzących niezwykle istotnej i wszechstronnej biologicznej roli glutationu nie wydaje się zaskakującym, że niedobory tego związku towarzyszą wielu stanom chorobowym. Jednakże nie zawsze do końca wiadomo, czy są one przyczyną, czy też raczej skutkiem określonego zaburzenia metabolicznego.

Starzenie. Upośledzona zdolność do obrony przed stresem oksydacyjnym jest uważana za molekularną podstawę procesów starzenia. Związane ze starzeniem obniżenie poziomu GSH w tkankach obserwowano u myszy [105, 106] i szczura [107, 108]. U ludzi związany z wiekiem spadek zawartości GSH stwierdzono w gałce ocznej [109]. Badania nad zależnością stężenia GSH w surowicy krwi od wieku wykazały zaś wyraźny związek między wysokim poziomem GSH a dobrym zdrowiem osób w podeszłym wieku [110]. Wydaje się jednak, że w przypadku procesów starzenia decydujące znaczenie może mieć nie tyle całkowita zawartość glutationu w surowicy, co zmiana proporcji między GSH a GSSG na korzyść formy utlenionej [111].

Choroby neurodegeneracyjne. Choroba Parkinsona charakteryzuje się degeneracją dopaminergiczną

nych neuronów substancji szarej mózgu [112]. Patogeneza tej choroby jest wieloczynnikowa. Jako podstawową przyczynę tego zespołu chorobowego uznaje się dysfunkcję mitochondriów oraz zaburzenia wewnątrzkomórkowej równowagi redoks spowodowane wzrostem stężenia wolnych rodników. Potwierdzeniem związku między postępowaniem choroby Parkinsona a stanem redoks komórki wydaje się być fakt, że w substancji szarej mózgu pacjentów zmarłych na tę chorobę obserwowano obniżony poziom GSH [113, 114]. Doświadczenia prowadzone na komórkach mysiej neuroblastomy wykazały również, że obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia GSH prowadzi do zmian apoptotycznych identycznych z obserwowanymi podczas rozwoju choroby Parkinsona [115].

Obrazem histopatologicznym choroby Alzheimer'a, stanowiącej najpowszechniejszą przyczynę zaburzeń intelektualnych w podeszłym wieku, są przede wszystkim złogi białka b-amyloidu obecne na terenie komórek nerwowych. Białko to odgrywa zasadniczą rolę w patogenezie choroby Alzheimer'a [116]. Jedną z hipotez dotyczących neurodegeneracyjnego działania β -amyloidu zakłada, że białko to może wywoływać stan stresu oksydacyjnego [117-120], więc i w tym przypadku GSH mógłby się okazać czynnikiem chroniącym przed rozwojem choroby.

Choroba alkoholowa. Patogeneza choroby alkoholowej jest słabo poznana. Pośród kilku branych pod uwagę czynników istotną rolę przypisuje się stresowi oksydacyjnemu wywoływanemu przez sam metabolizm etanolu [121]. Długotrwałe przyjmowanie etanolu powoduje wyraźne (45-60%) i selektywne zmniejszenie mitochondrialnej puli GSH w hepatocytach [122, 123]. Dzieje się tak wskutek zaburzeń transportu GSH z cytosolu do matryks mitochondrialnej. Sytuacja taka w oczywisty sposób prowadzi do narastania stresu oksydacyjnego. Obserwowano także spowodowane spożywaniem etanolu obniżenie poziomu GSH w surowicy krwi [124, 125].

Cukrzyca. Dane dotyczące związku między poziomem GSH a patogenezą cukrzycy pochodzą głównie z badań nad cukrzycą doświadczalną uzyskiwaną u zwierząt laboratoryjnych w wyniku traktowania streptozotocyną lub alloxanem [126]. Większość badaczy pozostaje zgodna, że cukrzyca towarzyszy znaczny spadek stężenia GSH w hepatocytach [127-130]. Sprzecznie (wzrost, spadek, brak zmian) przedstawiają się natomiast doniesienia dotyczące komórek trzustki i nerki [129-131]. Pomiary stężenia GSH w surowicy krwi wskazują na znaczne jego obniżenie u pacjentów cierpiących na cukrzycę [111]. Stwierdzono też zmniejszoną zawartość glutationu w

erytrocytach [132, 133]. Jedną z hipotez wiąże to zjawisko z występującym podczas cukrzycy wzrostem stężenia ciał ketonowych w surowicy krwi [134]. Zaobserwowano również, że wysokie stężenie glukozy powoduje zaburzenie glutationowego cyklu redoks w komórkach mięśniówki naczyń krwionośnych objawiające się obniżeniem wewnątrzkomórkowego stężenia GSH [135].

Infekcja wirusem HIV. Z licznych danych dotyczących korelacji między infekcją wirusem HIV a zmianami w poziomie GSH wynika, że zakażenie wirusem HIV prowadzi do znacznego (do 70%) spadku stężenia GSH i innych związków tiolowych w surowicy krwi [136-140] występującego już w bezobjawowej fazie choroby. Podobne obserwacje uzyskano u małych zakażonych małpim wirusem braku odporności (SIV) [141]. U pacjentów z zaawansowanymi objawami AIDS stwierdzono obniżenie poziomu GSH wewnątrz limfocytów [138, 142].

VII. Zastosowanie glutationu w terapii

Towarzyszące wielu stanom chorobowym niedobory glutationu (Patrz: Rozdział VI) mogą być uzupełniane farmakologicznie. Najprostszą metodą wydaje się być podawanie samego glutationu, istnieje jednak problem w postaci mało wydajnego pobierania GSH przez komórki [143]. Cysteina zaś, aminokwas ograniczający syntezę GSH, w układach biologicznych błyskawicznie utlenia się do cystyny [144]. Dobrym rozwiązaniem okazało się natomiast zastosowanie prekursorów cysteiny: N-acetylocysteiny (NAC) oraz kwasu 2-oksoetanolidyno-4-karboksylowego (OTZ). NAC może być użyteczna w terapii AIDS [145]. Obiecujące wydają się także wyniki badań dotyczących hamującego wpływu OTZ na replikację wirusa HIV zarówno w hodowlach komórkowych jak i *in vivo* [146].

Zastosowanie cysteiny i jej prekursorów ogranicza się jednak tylko do komórek, które nie utraciły zdolności do syntezy GSH. W sytuacji, gdy synteza GSH jest zaburzona, pewne rozwiązanie mogą przynieść estry glutationowe. Najczęściej stosowanym estrem jest ester monoetylowy (GEE). GEE jest transportowany do wnętrza komórek, gdzie ulega hydrolizie do etanolu i GSH, prowadząc do zwiększenia wewnątrzkomórkowej puli glutationu nawet po zablokowaniu jego syntezy [147]. Zaobserwowano, że monocyty zainfekowane wirusem HIV wykazują obniżoną replikację wirusa, jeśli pożywka zostanie wzbogacona GEE [148].

W chronicznych niedoborach glutationu nadzieje na przyszłość stwarza terapia genowa. Poznano już

większość sekwencji kodujących enzymy związane z metabolizmem glutationu, mimo to droga do zastosowania w praktyce terapii genowej zaburzeń syntezy GSH wydaje się jeszcze daleka.

VIII. Podsumowanie

Biologiczne działanie z pozoru zupełnie zwyczajnego tripeptydu, jakim jest glutation, zadziwia swą wszechstronnością. Glutation uczestniczy w regulacji wielu procesów od narodzin aż do śmierci komórki, stanowi podstawową linię obrony przed stresem oksydacyjnym, moduluje aktywność innych związków. Wydaje się jednak, że wciąż jeszcze nie wiemy o glutationie wszystkiego. Dodatkowe uzasadnienie dla dalszych badań nad biologiczną rolą tego związku stanowi potencjalna możliwość zastosowania go w leczeniu wielu chorób.

Podziękowania

Autorka składa serdeczne podziękowania Pani prof. dr hab. Jadwidze Bryle za liczne uwagi pomocne w przygotowywaniu tej pracy.

Przygotowanie artykułu było finansowane z funduszy KBN (grant nr 4P05A 12017).

Artykuł otrzymano 1 czerwca 2000 r.

Zaakceptowano do druku 21 września 2000 r.

Piśmiennictwo

- Kosower NS, Kosower EM (1978) *Int Rev Cytol* **54**: 109-160
- Meredith MJ, Reed DJ (1982) *J Biol Chem* **257**: 3747-3753
- Voehringer DW, McConkey DJ, McDonnell TJ, Brisbay S, Meyn RE (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2956-2960
- Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF (1992) *Science* **257**: 1496-1502
- Orrenius S, Moldeus P (1984) *Trends Pharmacol Sci* **5**: 432-435
- Wang W, Ballatori N (1998) *Pharmacol Rev* **50**: 335-355
- Bartosz G (1993) *Post Bioch* **39**: 32-38
- Deleve LD, Kaplowitz N (1991) *Pharmacol Ther* **52**: 287-305
- Tarver H, Schmidt CLA (1939) *J Biol Chem* **130**: 67-80
- Huang CS, Moore WR, Meister A (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2464-2468
- Meister A (1998) W: Aria IM, Jakoby W, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (red.) *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, str. 401-417
- Shi MM, Kugelmann A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 26512-26517
- Sekhar KR, Long M, Long J, Xu ZQ, Summar ML, Freeman ML (1997) *Radiation Res* **147**: 592-597
- Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, MacNee W, Smith CA (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 832-837
- Tian L, Shi MM, Forman HJ (1997) *Arch Biochem Biophys* **342**: 126-133.
- Galloway DC, Blake DG, Shepherd AG, McLellan LI (1997) *Biochem J* **328**: 99-104
- Morales A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Mari M, Colell A, Ardite E, Fernandez-Checa JC (1997) *J Biol Chem* **272**: 30371-30379
- Urata Y, Yamamoto H, Goto S, Bushima H, Akazawa S, Yamashita S, Nagataki S, Kondo T (1996) *J Biol Chem* **271**: 15146-15152
- Kuo PC, Abe KY, Schroeder RA (1996) *Am J Physiol* **271**: C851-C862
- Liu RM, Vasilou V, Zhu H, Duh JL, Tabor MW, Puge A, Nebert DW, Sainsbury M (1994) *Carcinogenesis* **15**: 2347-2352
- Borroz KI, Buetler TM, Eaton DL (1994) *Toxicol Appl Pharmacol* **126**: 150-155
- Lu SC, Ge J (1992) *Am J Physiol* **263**: C1181-C1189
- Cai J, Sun W, Lu SC (1995) *Mol Pharmacol* **48**: 212-218
- Lu SC, Ge J, Kuhlenskamp J, Kaplowitz N (1992) *J Clin Invest* **90**: 524-532
- Grant CM, MacIver FH, Dawes IW (1997) *Mol Biol Cell* **8**: 1699-1707
- Tsao B, Curthoys NP (1980) *J Biol Chem* **255**: 7708-7711
- Heinle H, Wendel A (1977) *FEBS Lett* **73**: 220-224
- Lenartowicz E, Wudarczyk J, Dębska ? (1996) *Post Bioch* **42**: 154-161
- Ernest MJ, Kim K-H (1973) *J Biol Chem* **249**: 5011-5018
- Gilbert HF (1982) *J Biol Chem* **257**: 12086-12091
- Mannervik B, Axelsson K (1980) *Biochem J* **190**: 125-130
- Ye R, Verkman AS (1989) *Biochemistry* **28**: 824-829
- Tsai S-C, Adamik R, Manganiello VC, Vaughan M (1981) *Biochem Biophys Res Commun* **100**: 637-643
- Gilbert HF (1984) *Meth Enzymol* **107**: 330-351
- Tschesche H, Macartney HW (1981) *Eur J Biochem* **120**: 183-190
- Angel P, Karin M (1991) *Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-157
- Bannister AJ, Cook A, Kouzarides T (1991) *Oncogene* **6**: 1243-1250
- Schenk H, Erdbrugger W, Droege W (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1672-1676
- Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA (1994) *Chem Biol Interact* **91**: 91-100
- Bergelson S, Pinkus R, Daniel V (1994) *Cancer Res* **45**: 36-40
- Galter D, Mihm S, Droege W (1994) *Eur J Biochem* **221**: 639-648
- Mitomo K, Nakayama K, Fujimoto K, Sun X, Seki S, Yamamoto ? (1994) *Gene* **145**: 197-203
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA (1993) *Nucleic Acids Res* **20**: 3821-3830
- Ginn-Pease ME, Whisler RL (1998) *Free Rad Biol Med* **25**: 346-361
- Ho E, Chen G, Bray TM (1999) *FASEB J* **13**: 1845-1854
- Lane DP (1994) *Br Med Bull* **50**: 582-599
- Zakut-Houri R, Bienz-Tadmor B, Givol D, Oren M (1985) *EMBO J* **4**: 1251-1255
- Sun Y, Oberley LW (1996) *Free Rad Biol Med* **21**: 335-348
- Reed DJ (1986) *Biochem Pharmacol* **35**: 7-13
- Meister A (1994) *J Biol Chem* **269**: 9397-9400
- Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC (1996) *Anal Biochem* **241**: 75-81
- Akerboom T, Sies H (1990) W: Vina J (red.) *Glutathion: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, str. 45-55
- Coles B, Ketterer B (1990) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**: 47-70
- Hinchman CA, Ballatori N (1994) *J Toxicol Environ Health* **41**: 387-409
- Danielson UH, Mannervik B (1985) *Biochem J* **231**: 263-267
- Mannervik B (1985) *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **57**: 357-417

57. Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B (1991) *Biochem J* **274**: 409-414
58. Piper PJ (1984) *Physiol Rev* **64**: 744-761
59. Parker J, Ankel H (1992) *Biochem Pharmacol* **43**: 1053-1060
60. Cagen LM, Pisano JJ, Ketley JN, Habig WH, Jakoby WB (1975) *Biochim Biophys Acta* **398**: 205-208
61. Pace-Asciak CR, Laneville O, Su WG, Corey EJ, Gurevich N, Wu P, Carlen P L (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3037-3041
62. Grune T, Siems WG, Zollner H, Esterbauer H (1994) *Cancer Res* **54**: 5231-4235
63. Winter CK, Segall HJ, Jones AD (1987) *Drug Metab Dispos* **15**: 608-612
64. Gaston B, Reilly J, Drazen MJ, Fackler J, Ramdev P, Arnelle D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ, Loscalzo J, Stamler JS (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10957-10961
65. Fronstedt B, Rosengren E, Carlsson A (1986) *Neuropharmacology* **25**: 451-454
66. Agrup G, Falck B, Rorsman H, Rosengren AM, Rosengren E (1977) *Acta Dermato-Venerol* **57**: 221-222
67. Ondarza RN, Aubanel YM (1960) *Biochim Biophys Acta* **44**: 381-383
68. Vignais PV, Zabin I (1958) *Biochim Biophys Acta* **29**: 263-269
69. Butterworth M, Lau SS, Monks TJ (1996) *Chem Res Toxicol* **9**: 793-779
70. Chang M, Shi M, Forman HJ (1992) *Am J Physiol* **262**: L637-L643
71. Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J (1989) *J Biol Chem* **264**: 5598-5605
72. Vernie LN, Collard JG, Eker AP, de Wildt A, Wilders IT (1979) *Biochem J* **180**: 213-218
73. Ciriolo MR, Desideri A, Paci M, Rotilio G (1990) *J Biol Chem* **265**: 450-461
74. Standeven AM, Wetterhahn KE (1991) *Pharmacol Toxicol* **68**: 469-476
75. Nicholson DW, Ali A, Vaillancourt JP, Calaycay Jr, Mumford RA, Zamboni RJ, Ford-Hutchinson A W (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2015-2019
76. Samuelson B (1983) *Science* **220**: 568-575
77. Hammarstorm S (1983) *Annu Rev Biochem* **52**: 355-377
78. Cloud ML, Enas GC, Kemp J, Platts-Mills T, Altman LC, Townley R, Tinkelman D, King T Jr, Middelton Sheffer AL, McFadden ER, Farlow DS (1989) *Am Rev Respir Dis* **140**: 1336-1339
79. Smith WL (1992) *Am J Physiol* **263**: F181-F191
80. Atsmon J, Freeman ML, Meredith MJ, Sweetman BJ, Roberts LJ (1990) *Cancer Res* **50**: 1879-1885
81. Esterbauer H, Schauer RJ, Zollner H (1991) *Free Radical Biol Med* **11**: 81-128
82. Petras T, Siems WG, Grune T (1995) *Free Radical Biol Med* **19**: 685-688
83. Ingarro LJ (1990) *Hypertension* **16**: 477-483
84. Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J, Abramson SB (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3680-3684
85. Bartosz G (1998) *Post Bioch* **44**: 22-31
86. Van den Dobbelen DJ, Nobel CSI, Schegel J, Cotgreave IA, Orrenius S, Slater AFG (1995) *J Biol Chem* **271**: 15420-15427
87. Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H (1997) *Hepatology* **21**: 368-378
88. Beaver JP, Waring P (1995) *Eur J Cell Biol* **68**: 47-54
89. Sandstrom PA, Mannie MD, Buttke TM (1994) *J Leukoc Biol* **55**: 221-226
90. Watson RWG, Rotstein OD, Nathens AB, Dackiw APB, Marshall JC (1996) *Surgery* **120**: 150-158
91. Nakatani T, Tawaramoto M, Opare-Kennedy D, Kojima A, Matsui-Yuasa I (2000) *Chem Biol Interact* **125**: 151-163
92. Coppola S, Ghibelli L (2000) *Biochem Soc Trans* **28**: 56-61
93. Ahlemeyer B, Kriegstein J (2000) *Neurochem Int* **36**: 1-5
94. Ho YS, Lee HM, Mou, TC, Wang YJ, Lin, JK (1997) *Mol Carcinog* **19**: 101-113
95. Raisova M., Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC (2000) *FEBS Lett* **473**: 27-32
96. Ghibelli L, Coppola S, Fanelli C, Rotilio G, Civitareale P, Scovassi AI, Ciriolo MR (1999) *FASEB J* **13**: 2031-2036
97. Grądzka I (2000) *Post Bioch* **46**: 2-16
98. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) *Science* **275**: 1132-1136
99. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) *Nature* **397**: 441-446
100. Meredith MJ, Cusick CL, Soltaninassab S, Sekhar KS, Lu S, Freeman ML (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 458-463
101. Wright SC, Wang H, Wei QS, Kinder DH, Larriek JW (1998) *Cancer Res* **58**: 5570-5576
102. Papadopoulos MC, Koumenis IL, Xu L, Giffard RG (1998) *Eur J Neurosci* **10**: 1252-1260
103. Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G, Kane DJ, Testa MP, Kayalar C, Brodesen DE (1996) *J Neurochem* **67**: 1259-1267
104. Mirkovic N, Voehringer DW, Story MD, McConkey DJ, McDonnell TJ, Meyn RE (1997) *Oncogene* **15**: 1461-1470
105. Chen TS, Richie Jr JP, Lang CA (1986) *Proc Soc Exp Biol Med* **190**: 399-402
106. Hazelton GA, Lang CA (1980) *Biochem J* **188**: 25-30
107. Lang CA, Naryshkin S, Schneider DL, Mills BJ, Lindeman R (1992) *J Lab Clin Med* **120**: 720-725
108. Langanicre S, Yu BP (1989) *Mech Ageing Dev* **48**: 221-230
109. Harding JJ (1970) *Biochem J* **117**: 957-960
110. Julius M, Lang CA, Gleiberman L, Harburg E, Di Francesco W, Schork A (1994) *J Epidemiol* **47**: 1021-1026
111. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kuritz JC, Strenberg Jr P, Reed RL, Jones DP (1997) *Free Radical Biol Med* **24**: 699-704
112. Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouat-Progent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid A (1997) *Histol Histopathol* **12**: 25-31
113. Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AHV, Marsden CD (1992) *Ann Neurol* **32**: S82-S87
114. Riederer P, Sofic E, Rauch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MBH (1989) *J Neurochem* **52**: 512-520
115. Merad-Boudia M, Nicole A, Santiard-Baron D, Saille C, Ceballos-Picot I (1998) *Biochem Pharmacol* **56**: 645-655
116. Yanker BA (1996) *Neuron* **16**: 921-932
117. Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP (1997) *J Neurochem* **68**: 255-264
118. Goodman Y, Mattson MP (1994) *Exp Neuro* **128**: 1-12
119. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Akshenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3270-3274
120. Janciauskiene S, Wright HT, Lindgren S (1999) *Neuropeptides* **33**: 510-516
121. Fernandez-Checa JC, Hirano T, Tsukamoto H, Kaplowitz N (1997) *Alcohol Health Res. World* **21**: 321-324
122. Fernandez-Checa JC, Gracia-Ruiz C, Oskhtents M, Klapowitz N (1991) *J Clin Invest* **87**: 397-405

123. Garcia-Ruiz C, Morales A, Colell A, Ballesta A, Rodés J, Klapowitz N, Fernandez-Checa JC (1994) *J Clin Invest* **94**: 193-201
124. Aifi NM, Abdel-Rhaman MS, Nassar AM (1998) *Toxicol Lett* **98**:1-12
125. Chawla RK, Lewis FW, Kutner MH, Bate DM, Roy RGB, Rudman D (1984) *Gastroenterology* **87**: 770-776
126. Wilson GL, Patton NJ, McCord JM, Mullins DW, Mossman BT (1984) *Diabetologia* **27**: 587-891
127. Thompson KH, Godin DV, Lee M (1992) *Biol Trace Elem Res* **35**: 213-224
128. Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabees TT, Stegink LD, Dickus M, Oberley L (1986) *Diabetes* **35**, 503-507
129. Wohaieb SA, Godin DV (1987) *Diabetes* **36**:1014-1018
130. Bastar I, Seckin S, Uysal M, Aykac-Toker G (1998) *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **102**: 265-272
131. Mak DHF, Ip SP, Li PS, Poon MKT, Ko KM (1996) *Mol Cell Biochem* **162**: 153-158
132. Murakami K, Kondo T, Ohtsuku Y, Fujiwara Y, Shimada M, Kawakami Y (1989) *Metabolism* **38**: 753-758
133. Forrester TE, Badaloo V, Bennett FI, Jackson AA (1990) *Eur J Clin Nutr* **44**: 847-850
134. Jain SK, McVie R (1999) *Diabetes* **48**: 1850-1856
135. Tachi Y, Okuda Y, Bannai C, Okamura N, Bannai S, Yamashita K (1997) *FEBS Lett* **421**: 19-22
136. Buhl R, Jaffe HA, Holroyd KJ, Wells FB, Mastrangeli A, Saltini C, Cantin AM, Crystal RG (1989) *Lancet* **2**: 1294-1298
137. Eck H-P, Gmunder H, Hartman M, Petzoldt D, Daniel V, Droege W (1989) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **370**: 101-108
138. Wamsley SL, Winn LM, Harrison ML, Utrecht JP, Wells PG (1997) *AIDS* **11**: 1689-1697
139. Staal FJT, Ela SW, Roederer M, Anderson MT, Herzenberg LA (1992) *Lancet* **339**, 909-912
140. Staal FJT (1998) *Eur J Clin Invest* **28**: 194-196
141. Eck HP, Stahl-Hennig C, Hunsmann G, Droege W (1991) *Lancet* **338**, 346-347
142. De Quay B, Malinverni R, Lauterburg BI (1992) *AIDS* **6**: 815-819
143. Meister A (1991) *Pharmacol Ther* **51**: 155-194
144. Anderson ME, Meister A (1987) *Methods Enzymol* **143**: 313-325
145. Roberts RJ, Aroda, VR, Ank BJ (1995) *J Infect Dis* **172**: 1492-1502
146. Barditch-Crovo P, Noe D, Skowron G, Lederman M, Kalayjian RC, Borum P, Buier R, Rowe WB, Goldberg D, Lietman P (1998) *J Clin Pharmacol* **38**: 357-363
147. Anderson ME, Levy EJ, Meister A (1994) *Methods Enzymol* **234**: 492-505
148. Kalebic T, Kinter A, Poli G, Anderson ME, Meister A, Fauci A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 986-990

Tuftsyna — endogeny immunomodulator

Tuftsine — endogenous immunomodulator

KRYSTYNA DZIERZBICKA¹, TOMASZ RAKOWSKI²,
ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Tuftsyna — endogeny tetrapeptyd
 - II-1. Tuftsyna — silny immunostymulator
 - II-2. Aktywność przeciwbakteryjna, przeciwwirusowa i przeciwnowotworowa
 - II-3. Inne właściwości tuftsyny
 - II-4. Analogi tuftsyny i ich aktywność biologiczna
- III. Synteza tuftsyny
- IV. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ABO — kwas (3S)-2-azabicyklo-[2,2,2]-oktano-3-karboksylowy; AHPA — kwas (2S,3R)-3-amino-2-hydroksy-fenilo-karboksylowy; AIDS — zespół nabytego upośledzenia odporności; Arg — L-arginina; cyT — kwas (4S,5R)-5-metylo-2-okso-oksazolino-4-karboksylowy; DCC — *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid; DPPA — azydofosforan difenylu; EEDQ — 1-etoksy-karbonylo-2-etoksy-1,2-dihydrochinolina; EMC — wirus z grupy RNA; GMDP — *N*-acetylo-glukozamino-muramylo-dipeptyd; HSV1 — wirus opryszczki (*herpes simplex*); IFA — niekompletny adiuwant Freund; IgG — immunoglobulina G; IL-1 — interleukina 1; IL-6 — interleukina 6; INF- γ — interferon γ ; Lys — L-lizyna; MDP — muramylo-dipeptyd (*N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina); mRNA — matrycowy albo informacyjny RNA; MSV — wirus mięsaka myszy (*murine sarcoma virus*); NK — naturalne komórki zabójcze (*natural killer cells*); PBMC — komórki mononuklearne krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells*); PMN — granulocyt obojętnochłonny (*polymorphonuclear leucocyte*); Pro — L-prolina; T — tuftsyna; THF γ 2 — polipeptydowy czynnik humoralny grasicy (*thymic humoral factor*); Thr — L-treonina; Thr-Lys-Pro-Arg — tuftsyna; THIS — tyreotropina (*thyrotrophin*); TNF- α — czynnik martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor α*); TRH — hormon uwalniający tyreotropinę (*hormonum absolvens thyrotrophinum*).

I. Wstęp

W ocenie wielu badaczy i praktyków w leczeniu chorych coraz większego znaczenia nabiera immu-

Contents:

- I. Introduction
- II. Tuftsine — endogenous tetrapeptide
 - II-1. Tuftsine — strong immunostimulator
 - II-2. Antibacterial, antiviral and antitumor activity
 - II-3. Other properties of tuftsine
 - II-4. Tuftsine analogs and their biological activity
- III. Synthesis of tuftsine
- IV. Conclusions

noterapia, której działanie polega na wzmacnianiu naturalnych sił obronnych organizmu za pomocą immunomodulatorów. Poszukiwania substancji mogących aktywować, jak również działać supresyjnie na układ immunologiczny doprowadziły do zidentyfikowania i przebadania szeregu związków o aktywności immunologicznej są wśród nich także peptydy. Większość obecnie znanych immuno-aktywnych peptydów wywodzi się bezpośrednio ze świata mikrobiologicznego, np. muramylo-dipeptyd (MDP, fragment bakteryjnych ścian komórkowych), czy cyklosporyna (metabolit grzybów). Odkrycie i zastosowanie cyklosporyny wywołało terapeutyczny przełom w selektywnej regulacji immunologicznej. Dużą rolę odgrywają również immunomodulujące peptydy pochodzenia zwierzęcego, np. hormony grasicy (tymozyna α , tymopoetyna II, czy tymulina) produkowane przez komórki grasicy modulujące dojrzewanie komórek T, a także tuftsyna — naturalny tetrapeptyd o wybitnych właściwościach stymulujących fagocytarną aktywność granulocytów obojętnochłonnych. Badania wykazały, że niektóre neuropeptydy (np. endorfina, enkefalina, angiotensyna, substancja P czy somatostatyna) odgrywają ważną rolę jako przekaźniki sygnałów z centralnego systemu nerwowego do systemu odpornościowego. Również peptydowe „soluble mediators” (cytokiny) takie jak: interleukiny IL-1, IL-2, IL-3 czy interferon γ odgrywają bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu systemu odpornościowego. Działanie i znaczenie prawie

¹Dr inż., ²student, ³prof. dr hab. inż., Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, tel. (058) 347 2736

każdego z tych immunoaktywatorów zasługuje na uwagę.

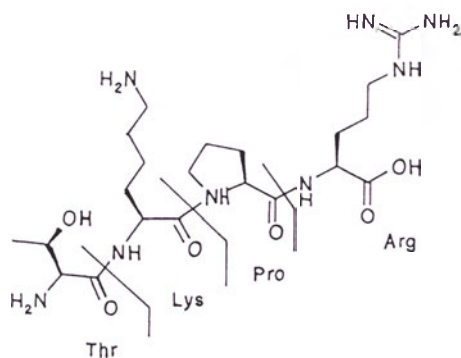
W tej publikacji skupimy się jednak tylko na jednym z najmniejszych peptydowych endogennych immunomodulatorów, jakim jest tetrapeptyd — Thr-Lys-Pro-Arg zwany tuftsyną. Zainteresowaliśmy się bliżej nim z uwagi na planowaną syntezę analogów tuftsyny modyfikowanej przez kowalencyjne połączenie z innym immunostymulatorem jakim jest muramylo-dipeptyd (MDP) — bioaktywny glikopeptyd syntetyzowany na wzór fragmentu ściany komórkowej bakterii. Z literatury wiadomo, że MDP wzmacnia działanie innych naturalnych immunostymulatorów, w tym: diestrów trehalozy, lipopolisacharydów, Lipidu A czy cytokin. Zarówno tuftsyna jak i MDP stymulują rozmaite funkcje makrofagów oraz wzmacniają niespecyficzną odporność organizmu gospodarza przeciw licznym chorobom. Zgodnie z naszym oczekiwaniem połączenia MDP z tuftsyną powinny wywoływać silniejszą stymulację układu immunologicznego niż każda z tych substancji z osobna, liczymy także na przedłużony czas ich działania. To oczekiwanie wynika z naszych dotychczasowych doświadczeń w otrzymywaniu koniugatów muramylo-dipeptydu z innymi związkami bioaktywnymi [1, 2].

W roku 1999 ukazał się wprawdzie wyczerpujący artykuł przeglądowy S i e m i o n a i wsp. pt. „Tuftsina: On the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery“ [3], uważamy jednak, że krótszy artykuł dla polskiego czytelnika może okazać się przydatny.

II. Tuftsyna — endogenne tetrapeptyd

II-1. Tuftsyna — silny immunostymulator

Tuftsyna jest tetrapeptydem (Thr-Lys-Pro-Arg, Ryc. 1), naturalnie występującym we krwi człowieka



Ryc. 1. Wzór tuftsyny (Thr-Lys-Pro-Arg)

i innych ssaków. Stymuluje ona odporność organizmu, w tym aktywuje takie jego elementy jak: mono-

cyty, makrofagi i neutrofile. Tuftsyna została po raz pierwszy wyizolowana w 1970 roku na Uniwersytecie Tufts w Bostonie (USA) przez V. A. N a j j a r ' a i K. N i s h i o k a [4]. Od tego czasu naukowcy starają się poznać bliżej jej właściwości i wyjaśnić mechanizm działania. Tuftsyna jest aktywna w organizmie wyłącznie w formie wolnego peptydu. Ten tetrapeptyd stanowi fragment łańcucha (289-292) ciężkiego Fc immunoglobuliny typu G (IgG), z którego uwalniany jest przez działanie dwóch specyficznych enzymów: endokarboksypeptydazy tuftsynowej śledziony i leukokininazy. Pierwszy z nich powoduje rozszczepienie wiązania amidowego pomiędzy Arg²⁹² a Glu²⁹³, a drugi zlokalizowany w błonach komórek fagocytujących działa na wiązanie pomiędzy Lys²⁸⁸ a Thr²⁸⁹ [3]. Uwolniony tetrapeptyd powoduje wzrost ruchliwości, pinocytozy, fagocytozy, chemotaksji i cytotoxyczości zarówno makrofagów jak i granulocytów [5, 6]. Tuftsyna modyfikuje stężenie jonów Ca²⁺ wewnątrz komórki, ma wpływ na gospodarkę tyreotropiną, reguluje poziom dopaminy, noradrenaliny, serotoniny i kwasu 5-hydroksyindoloocetowego. Może również powodować zmiany w syntezie i degradacji monoamin, acetylocholino i protein w strukturach kory i podkorza mózgu [3]. Badania prowadzone na ludziach i zwierzętach wykazały, że u osobników, którym usunięto śledzionę występuje niekorzystny dla organizmu nabyty deficyt tuftsyny. Zwierzęta i ludzie z uszkodzoną śledzioną są poważnie narażeni na ostre infekcje spowodowane brakiem tuftsyny. Wykazano związek pomiędzy spadkiem prawidłowego funkcjonowania śledziony a obniżeniem aktywności tego immunomodulatora [7, 8]. Stan niedoboru tuftsyny występuje również w przypadku anemii sierpowatej, białaczki Hidgkina i AIDS [7, 9].

Z dotychczasowych badań wynika, że AIDS znacząco wpływa na obniżenie aktywności tuftsyny. Stwierdzono, że osoby dotknięte tą chorobą mają niewystarczającą liczbę centrów uwalniających tuftsynę. Ich układ immunologiczny jest poważnie osłabiony i wykazuje skłonności do fatalnych w skutkach infekcji.

II-2. Aktywność przeciwbakteryjna, przeciw-wirusowa i przeciwnowotworowa

Tuftsyna jest związkiem o bardzo szerokim spektrum aktywności biologicznej. Stwierdzono, że oprócz immunoaktywności wykazuje ona działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe. Jedną z ważniejszych jej właściwości jest zdolność do regulowania cyklu komórek PBMC i

PMN [8, 10]. Tuftsyna poprawia komunikację pomiędzy elementami układu immunologicznego (makrofagami, limfocytami T i limfocytami B) co w rezultacie powoduje wzrost produkcji przeciwciał. Ma również wpływ na zwiększenie ruchliwości i chemotaksji komórek fagocytujących, dzięki czemu wzrasta zdolność organizmu do obrony przed różnego typu infekcjami. Tuftsyna wzmacnia cytotoksyczność naturalnych mediatorów komórkowych, a w połączeniu z przeciwciałami zwiększa wydajność prezentacji antygenów przez makrofagi na limfocyty T [6]. Ostatnie badania dowodzą, że regulacja procesów immunologicznych odbywa się już na poziomie translacji. Efekt działania połączeń tuftsyny z antygenem polega na pośredniczeniu w syntezie mRNA kodującego IL-1 makrofagów [11]. Makrofagi traktowane tuftsyną stają się bardziej aktywne w zwalczaniu infekcji bakteryjnych. Stwierdzono, że tuftsyna stymuluje wydzielanie TNF- α przez mysie otrzewnowe makrofagi a pochodne tuftsyny związane z cząsteczkami cukru zwiększają wydzielanie tego czynnika przez ludzkie monocyty. Udało się indukować wydzielanie TNF- α *in vivo* w hodowli komórek nowotworowych typu HL-60 oraz u myszy po śródotrzewnowej iniekcji tuftsyny. *Retro-inverso* analogi tuftsyny zwiększają wydzielanie INF- γ i TNF- α już przy stężeniu 10^{-10} M [10] w przeciwieństwie do tuftsyny, która nawet w wyższych dawkach nie wykazała takiej aktywności.

Tuftsyna w terapii wielolekowej wykazuje działanie synergistyczne. Jej dodatek pozwala na zmniejszenie skutecznej dawki niektórych leków oraz na poszerzenie spektrum ich działania. W Tabeli 1 przedstawione są eksperymentalne przykłady le-

czenia infekcji bakteryjnych, pasożytniczych i wirusowych opartych na synergistycznym oddziaływaniu tuftsyny z wybranymi lekami.

V. N a j j a r [12] stwierdził, że podawanie tuftsyny myszom z wszczepionym nowotworem L-1210 znacznie wydłuża ich czas przeżycia w odniesieniu do kontroli. Podobny efekt działania tuftsyny zauważono na myszach z wszczepionymi komórkami czerniaka typu B16 i C57BL/6 [13]. Zaobserwowano również znaczne obniżenie śmiertelności wśród myszy DBA/2J zainfekowanych wirusem białaczki Friend'a [14], które leczono tuftsyną. W przypadku traktowania tuftsyną innych złośliwych nowotworów, np. włókniako-mięsaka jej lecznicze działanie jest słabsze. Natomiast łączne podawanie tuftsyny z cyklofosfamidem powodowało zahamowanie wzrostu niemałokomórkowego nowotworu płuc (ang. *Non-small Cell Lung Cancer*) [3, 15]. Tuftsyna podawana po zabiegach operacyjnego usunięcia mięsaków szyi i głowy przywracała aktywność naturalnym komórkom zabójczym (NK) [16]. Ponadto zaobserwowano synergistyczne oddziaływanie tego immunomodulatora z 3-metylo-cholantrenem w leczeniu zwierząt laboratoryjnych z wszczepionymi komórkami raka płuc Lewis'a oraz włókniako-mięsaka [17]. Te wyniki potwierdzają przypuszczenie że, przeciwnowotworowa aktywność tuftsyny wynika ze zdolności wzmacniania cytotoksycznych właściwości makrofagów [3].

II-3. Inne właściwości tuftsyny

Poza właściwościami omówionymi wcześniej tuftsyna wykazuje jeszcze kilka innych:

Tabela 1

Eksperymentalne metody leczenia infekcji bakteryjnych, pasożytniczych i wirusowych opartych na synergistycznym oddziaływaniu tuftsyny z wybranymi lekami

Związek	Typy infekcji bakteryjnych, pasożytniczych i wirusowych	Literatura
Tuftsyna	<i>Candida albicans</i>	Nishioka [52]
Tuftsyna	<i>Candida peritonis</i>	Levy [53]
Tuftsyna	<i>Mycobacterium leprae</i>	Iyer [54]
Tuftsyna zamknięta w liposomach	<i>Leishmania donovani</i>	Guru [55]
Tuftsyna + Gentamycyna	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Smith [56]
Tuftsyna + Ivermectin	<i>nicienie</i>	Fatma [57]
Tuftsyna + Bestatyna	<i>HIV-1</i>	Mathe [58]
Tuftsyna + Amfoterycyna B (liposomy)	<i>Asparagilloza</i>	Owais [48]
Tuftsyna + Ryfampicyna (liposomy)	<i>Gruźlica</i>	Agarwal [59]
Thr-Lys-Pro-Arg-NH-(CH ₂) ₂ -NHCO ₂ C ₁₅ H ₃₁ (analog tuftsyny)	<i>Plasmodium berghei</i>	Gupta [60]

- działa przeciwbólowo — podanie jej szczurom powoduje, że zwierzęta dłużej wytrzymują test gorącej płytki [18, 19];
- modyfikuje aktywność monoaminooksydazy i acetylocholinoesterazy w synaptosomalnych i komórkowych frakcjach mitochondrialnych pozyskiwanych z kory mózgowej [3, 20];
- jest inhibitorem hydrolazy tyrozynowej – jednego z ważniejszych enzymów w szlaku wytwarzania amin katecholowych [3, 21];
- powoduje osłabienie percepcji w sytuacjach stresowych i normalizuje poziom serotoniny w mózgu szczurów [3, 22];
- zwiększa intensywność oddychania komórkowego, wzmacnia wewnątrzkomórkowe procesy redoks [3, 23];
- łagodzi objawy głodu narkotycznego u morfinozależnych szczurów [24];
- powoduje wzrost produkcji hormonu uwalniającego tyreotropinę (TRH) przez podwzgórze a przez to stymuluje wydzielanie tyreotropiny (THS) [25, 26];
- hamuje kurczenie się mikronaczynek limfatycznych [27];
- powoduje obniżenie poziomu histaminy w płucach, natomiast podnosi jego stężenie w wątrobie i nerkach a także wywołuje zmiany poziomu histaminy w dwunastnicy i we krwi [28];
- zwiększa ciśnienie tętnicze krwi [29];
- wpływa na temperaturę ciała powodując przejściową hipertermię, po czym następuje hipotermia [30];
- ma właściwości przeciwzakrzepowe [31].

II-4. Analogi tuftsyny i ich aktywność biologiczna

W wyniku prowadzonych badań biologicznych okazało się, że połowiczny czas degradacji tuftsyny w organizmie jest stosunkowo krótki, wynosi bowiem około 16 minut. Jest ona łatwo degradowana pod wpływem licznych proteaz, np. aminopeptydazy leucynowej, karboksypeptydazy B, pronazy, subtylizyny. Co ciekawe nie ulega rozpadowi pod wpływem: trypsyny, chymotrypsyny, papainy czy pepsyny. Produktami hydrolizy enzymatycznej tuftsyny są dwa tripeptydy: Thr-Lys-Pro oraz Lys-Pro-Arg, wykazujące działanie inhibitujące w stosunku do wyjściowego tetrapeptydu [32]. Podatność tuftsyny na biodegradację i antagonistyczne własności produktów jej rozkładu zainspirowały do poszukiwania jej analogów o dłuższym czasie działania, wyższej aktywności biologicznej, łatwiejszych w oczyszczaniu i bardziej trwałych. Dzięki wysiłkom

wielu ośrodków akademickich uzyskano liczne analogi tuftsyny o obiecujących właściwościach. Pierwsze modyfikacje tuftsyny polegały na zmianie składu aminokwasowego oraz sekwencji poszczególnych aminokwasów w łańcuchu [33]. Uzyskano szereg

Tabela 2

Wybrane pochodne tuftsyny - ich zdolności stymulujące i inhibitujące w organizmie

Związek	Stymulacja fagocytozy(%)	Inhibicja fagocytozy (%)
Tuftsyna	96	-
[Lys ¹]T	30	-
[Ser ¹]T	20	78
[Val ¹]T	-	30
[Ala ¹]T	-	65
{ω-NO ₂ Arg}T	-	-
[Des-Thr ¹]T	-	44
Acetylo-T	-	44

związków, które jednak nie dorównywały peptydowi natywnemu w aktywności biologicznej (Tabela 2). Duży wkład w poszukiwaniu skuteczniejszych analogów tuftsyny wnieśli zespoły I. Siemiona i D. Konopińskiej. W 1977 roku w grupie Siemiona zsyntetyzowano serię tuftsyno-podobnych tetrapeptydów będących częścią sekwencji histonów — białek zawierających dużo aminokwasów zasadowych (argininę, histydynę i lizynę) znajdujących się w chromosomach wszystkich komórek eukariotycznych z wyjątkiem komórek nasion. Niektóre z tych peptydów wykazywały wyraźną aktywność stymulowania fagocytozy. Była to pierwsza publikacja, która zwróciła uwagę na peptydy o zbliżonej sekwencji do tuftsyny będące fragmentami różnych białek [34]. Ta sama grupa zsyntetyzowała serię analogów tuftsyny podstawionej różnymi aminokwasami w pozycji 3 łańcucha peptydowego. Stwierdzono, że analogi projektowane w oparciu o mutację Pro³ kodonu posiadają wyższą aktywność biologiczną w porównaniu z innymi analogami [35]. Jednym z bardziej znanych analogów zsyntetyzowanych w tym ośrodku jest analog tuftsyny o sekwencji (Thr-Lys-Pro-Arg)₂ zwany tuftsynylotuftsyną. Wykazuje on silne działanie na komórki białaczki L-1210. W Tabeli 3 zebrano kilka analogów otrzymanych przez zespół D. Konopińskiej. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na myszach testowano wpływ tych analogów na rozwój guzów indukowanych przez wirusy MSV oraz ich

działanie przeciwwirusowe. Okazało się, że były one aktywne przeciw wirusom z grupy DNA (HSV1) i z

Tabela 3

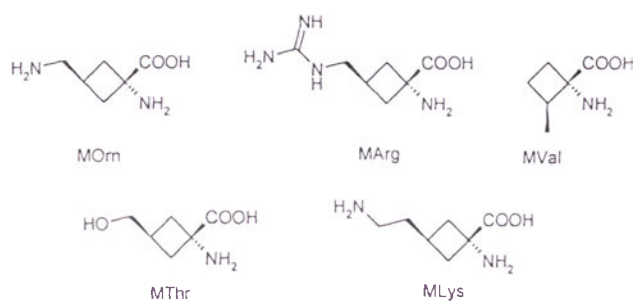
Analogi otrzymane przez zespół D. Konopińskiej

Thr-Lys-Pro-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg	I
Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Gln	II
Arg-Thr-Lys-Pro-Arg	III
Pro-Arg-Thr-Lys-Pro-Arg	IV
Lys-Pro-Arg-Thr-Lys-Pro-Arg	V
Thr-Lys-Pro-Arg-Thr-Lys-Pro-Arg	VI

grupy RNA (EMC) [36, 37], a ich działanie było porównywalne z aktywnością tuftsyny.

Analogi tuftsyny bardziej odporne na działanie proteaz zostały otrzymane przez zespół G. Mezo [38]. Wzrost stabilności tetrapeptydu w surowicy udało się uzyskać dzięki utworzeniu wiązania izopeptydowego łączącego odpowiedni aminokwas z ε-aminową grupą lizyny. Zsyntetyzowano następujące pochodne: Lys(Thr)-Pro-Arg, Lys(Ala)-Pro-Arg, Thr-Lys(Ala)-Pro-Arg, Thr-Lys(Thr)-Pro-Arg, Ala-Lys(Ala)-Pro-Arg. Kilka z nich okazało się lepszymi aktywatorami funkcji makrofagów niż naturalna tuftsyna.

E. Gershonov i wsp. [32] przygotowali serię trans-2,4-metano-aminokwasów, które posłużyły do otrzymania pięciu nowych pochodnych tuftsyny (Ryc. 2). Zastosowanie tak zmodyfikowanych ami-



Ryc. 2. Trans-2,4-metano-aminokwasy wykorzystane przez E. Gershonov'a w syntezie metano-analogów tuftsyny.

nokwasów miało na celu przede wszystkim zabezpieczenie tetrapeptydu przed działaniem enzymów proteolitycznych. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na otrzewnowych makrofagach okazało się, że [MThr¹]-tuftsyna i [MVal³]-tuftsyna wykazują bardzo silne działanie. Zwiększają one wydzielanie IL-6 odpowiednio do 125% i 141% w stosunku do

prób kontrolnych, wykazując przy tym przedłużony czas działania w porównaniu z naturalnym tetrapeptydem. W Tabeli 4 zebrano wartości przedstawiające czasy połowicznej degradacji metano-analogów tuftsyny. Mimo, że pochodna [MOrn²]-tuftsyny ma znacznie przedłużony czas degradacji wykazuje jednak dużo słabszą aktywność niż wyjściowy tetrapeptyd [32].

Tabela 4

Metano-analogi tuftsyny oraz czasy ich połowicznej degradacji w organizmie

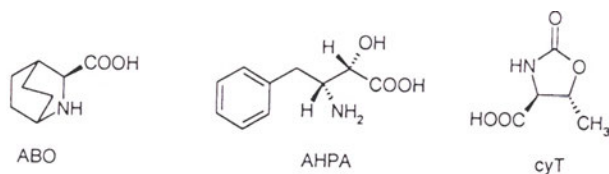
Analog	Czas 1/2 degradacji
Thr-Lys-Pro-Arg	16
[MThr ¹]T	90
[MOrn ²]T	90
[MVal ³]T	25
[MLys ²]T	13
[MArg ⁴]T	11

Obiecujące wyniki uzyskano stosując *retro-inverso* analogi tuftsyny. Wiązanie pomiędzy Thr a Lys z układu -CONH- zostało zamienione na -NHCO-. Taka modyfikacja powoduje, że pseudopeptyd staje się całkowicie odporny na działanie enzymów proteolitycznych i może być podawany doustnie. Ponadto peptydy o składzie: H-Thr-ψ[NHCO](R,S)Lys-Pro-Arg-OH i H-gThr-(R,S)mLys-Pro-Arg-OH okazały się dziesięć razy aktywniejsze od tuftsyny. Zwiększały cytotoksyczną aktywność splenocytów oraz stymulowały wydzielanie INF-γ i TNF-α [6, 10].

Zespół F. Arcoleo [39] zachęcony doświadczeniami swych poprzedników zsyntetyzował kolejne analogi *retro-inverso*-tuftsyny. Modyfikacje w tym przypadku dotyczyły głównie zmiany składu aminokwasowego tego tetrapeptydu. W pracy przedstawiono kilka nowych analogów: H-gGly-(R,S)mLys-Pro-Arg-OH, H-gThr-(R,S)mLys-Pro-Leu-OH i H-gThr-(R,S)mLys-Pro-Gln-OH, które jak się okazało indukowały wytwarzanie przez otrzewnowe makrofagi NO, IL-1 oraz TNF-α.

L. Kraus-Berthier i wsp. [40, 41] w celu zwiększenia stabilności tuftsyny zastąpili niektóre aminokwasy białkowe takimi, które nie występują w środowisku naturalnym, a swoją budową przypominają aminokwasy białkowe. Poniżej przedstawiono aminokwasy, wykorzystane w syntezie niektórych analogów tuftsyny (Ryc. 3), w tym: Thr-Lys-ABO-Arg, cyT-Lys-ABO-Arg i AHPA-Lys-ABO-Arg.

Chociaż wyżej wymienione analogi nie były bardziej aktywne niż tuftsyna, to po wstępnych badaniach Kraus-Berthier uważa jednak, że analog *retro-inverso*-tuftsyny o składzie Phe-ψ[CH₂NH]-Lys-ABO-Arg może okazać się obiecującym związkiem w immunoterapii chorób infekcyjnych i nowotworowych [41].



Ryc. 3. Niebiałkowe aminokwasy zastosowane do syntezy analogów tuftsyny.

Znane są również tioanalogi tuftsyny. B. Z a c h a r i e wraz ze wsp. [42] twierdzi, że większy promień jonowy i mniejsza elektrojemność atomu siarki w porównaniu z tlenem spowodują, iż takie pochodne powinny być bardziej odporne na działanie enzymów proteolitycznych. Zsyntetyzowali oni następujące tioanalogi tuftsyny: H-Thr-Lys-Proψ[CSNH]Arg-OH, H-Thr-Lysψ[CSNH]Pro-Arg-OH oraz H-Thrψ[CSNH]-Lys-Pro-Arg-OH(e). Niestety dotychczas nie znaleziono opisu ich aktywności biologicznej.

Stosując metody komputerowego modelowania udało się przewidzieć kilka konformacji analogów, które przyjmują podobny układ przestrzenny jak tuftsyna. Do szczególnie obiecujących należą cykliczne analogi tuftsyny. Kilka z nich, np. c-(Thr-Lys-Pro-Arg), c-(Thr-Lys-Pro-Arg-Gly), c-(Thr-Lys-Pro-Arg-Asp) zostało po raz pierwszy zsyntetyzowane przez N i s h i o k a w 1995 roku [8]. W doświadczeniach biologicznych, w których badano wpływ tych związków na zdolność stymulowania fagocyto-

zy okazało się, że peptyd c-(Thr-Lys-Pro-Arg-Gly) wykazuje taką samą aktywność jak wyjściowy immunomodulator przy stężeniu 50-ciokrotnie niższym. Pozostałe pochodne również wykazywały znaczną aktywność, ale nieco mniejszą niż ten najaktywniejszy cykliczny peptyd. Do innej grupy analogów tuftsyny należą jej połączenia z cukrami. W 1984 roku R o c c h i [43] zsyntetyzował kilka analogów zawierających reszty cukrowe w różnych pozycjach. W Tabeli 5 zaprezentowano niektóre z nich.

Tabela 5

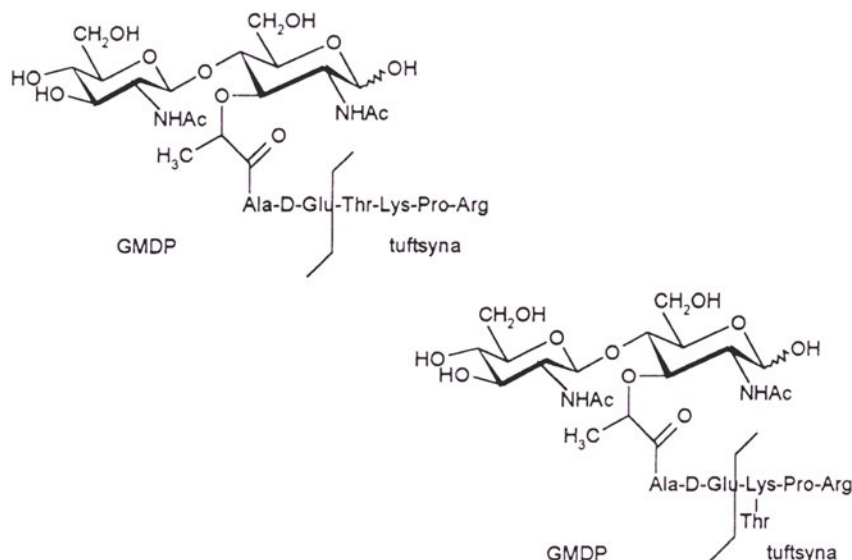
Tuftsyna i jej analogi modyfikowane cukrami

Analog	Zdolność stymulacji fagocytozy
Thr-Lys-Pro-Arg-NHGlc	+
N ⁹ -glukozylo-Thr-Lys-Pro-Arg	-
N ⁹ -glukozylo-Gly-Gln-Pro-Arg	+
Gly-Glu(NH-Glc)-Pro-Arg	-
Gly-Gln-Pro-Arg-NH-Glc	-
N ⁹ -gluko-Gly-Glu-Pro-Arg	+
(Thr(α+β)-O-glukozylo) ¹ -tuftsyna	-
(Hyp(α+β)-O-glukozylo) ³ - tuftsyna	++

+ słabo aktywny; - nieaktywny; ++ aktywny

Większość z tych analogów wykazuje niewielką zdolność do pobudzania fagocytozy. Takie modyfikacje nie poprawiły stabilności tuftsyny i nie doprowadziły do uzyskania związków wykazujących lepsze niż naturalny peptyd zdolności aktywowania poszczególnych elementów układu immunologicznego.

Za udane osiągnięcie trzeba uznać syntezę kilku połączeń GMDP (*N*-acetylo-glukozaamino-mura-



Ryc. 4. Połączenia tuftsyny z GMDP wykazujące aktywność zbliżoną do IFA.

mylodipeptydu) z tuftsyną (Ryc. 4) wykonaną przez Titova [44]. Wysoką aktywność adiuwantową syntetycznej pochodnej MDP (GMDP) z tuftsyną wykazano w testach immunologicznych, stwierdzając silne stymulowanie produkcji przeciwciał przeciw albuminom jaja, stymulację reakcji nadwrażliwości typu późnego (DTH) i aktywowanie fagocytozy [44]. Zarówno sama mieszanina GMDP z tuftsyną, jak i GMDP połączony wiązaniem kowalencyjnym z tym tetrapeptydem podawane w soli fizjologicznej wykazywały wysoką, porównywalną z IFA (niekompletnym adiuwantem Freuda) aktywność adiuwantową.

Podjęto również próby modyfikacji tuftsyny przez przyłączenie do niej naturalnych peptydów, wśród których należy wymienić przede wszystkim THF γ 2. P. Grant [45] zsyntetyzował dwie takie pochodne o składzie: H-THF γ 2-tuftsyna-OH oraz H-tuftsyna-THF γ 2-OH. Oba związki indukowały wytwarzanie IL-6 silniej niż tuftsyna i THF- γ 2 osobno. Te ostatnio przedstawione analogi potwierdzają, że planowane przez nas koniugaty MDP z tuftsyną mogą okazać się silnymi immunoaktywatorami.

III. Synteza tuftsyny

Chociaż syntezę tuftsyny prowadzi się zgodnie z zasadami obowiązującymi w chemii peptydów jej otrzymywanie nie jest łatwe ze względu na aminokwasy, które wchodzi w skład jej budowy (Lys czy Arg). Śledząc literaturę można zaobserwować różnorodność proponowanych rozwiązań syntetycznych oraz metod tworzenia wiązania peptydowego pomiędzy aminokwasami wchodzącymi w skład tuftsyny. Jej synteza najczęściej prowadzona jest metodą klasyczną w roztworze z wykorzystaniem EEDQ lub DCC jako odczynników kondensujących, rzadziej metodą azydkową. Po usunięciu grup ochronnych otrzymany tetrapeptyd zwykle poddaje się oczyszczaniu na kolumnie wypełnionej żelem typu AG 50W-X2, Sephadex G-25 czy żywicą jonowymienną typu Amberlite IR-4B a następnie liofilizacji. Na uwagę zasługuje zastosowanie polimerycznego aktywnego estru 3-nitro-4-hydroksy-benzylolipoli-styrenu (PHNB), dzięki czemu otrzymano tetrapeptyd o czystości 95% [46]. W naszym zespole do syntezy tuftsyny zastosowaliśmy azydofosforan difenyłu (DPPA), znany odczynnik kondensujący. Metoda ta pozwala na znaczne obniżenie stężenia produktów ubocznych powstających, np. w procesie dysproporcjonowania mieszanego bezwodnika, zapewnia wysoką czystość chiralną otrzymanych produktów, dobrą wydajność, jest szybka i prosta w wy-

konaniu. Otrzymany chroniony tetrapeptyd oczyszczaliśmy za pomocą chromatografii radialnej (Chromatotron firmy Harrison Research) na płytach pokrytych we własnym zakresie żelem krzemionkowym z gipsem (Kieselgel 60 PF₂₅₄) i na preparatywnych płytkach TLC (Merck F₂₅₄) otrzymując produkt z wydajnością 75%, czysty chromatograficznie. Dodatkowo czystość została potwierdzona analizą widm dwuwymiarowych (COSY, TOCSY) NMR (500 MHz). Chociaż kilka znanych firm farmaceutycznych (np. Bachem) produkuje tuftsynę w celach komercyjnych w postaci soli octanowej o czystości 97% wg HPLC to ciągle trwają prace nad otrzymaniem produktu o jeszcze większym stopniu czystości.

IV. Podsumowanie

Tuftsyna, bioaktywny peptyd pochodzenia zwierzęcego o silnym działaniu immunomodulującym, w badaniach *in vivo* wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznej w tym immunostymulacyjną, przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i przeciwnowotworową. W eksperymentach przeprowadzonych na zwierzętach tuftsyna powodowała wzrost produkcji komórek krwi w szpiku kostnym. Ponadto uzyskano obiecujące rezultaty w leczeniu infekcji grzybowych i pasożytniczych [47, 48]. Działanie tuftsyny na układ immunologiczny oraz jej niska toksyczność zachęcają wielu badaczy do poszukiwania analogów potencjalnie przydatnych w terapii. W 1983 roku Cattan i wsp. [49] wykazał, że tuftsyna podana w dawce 0.96 mg/kg nie wykazuje efektów toksycznych, jednakże prawie u 50% pacjentów zaobserwowano leukocytozę 4-5 dni po jej podaniu. Duże nadzieje budzą *retro-inverso* analogi tuftsyny, które indukują wydzielanie dwóch cytokin: IFN- γ i TNF- α przez PBMC w przeciwieństwie do naturalnej tuftsyny nie wykazującej takiej aktywności. Jak wiadomo nawet małe stężenie tych cytokin (femtomolarne) powoduje wzrost właściwości immunomodulujących i aktywności przeciwwirusowej. W Izraelu zastosowano tuftsynę w leczeniu pacjentów w zaawansowanym stadium nowotworowym dzięki temu można dowiedzieć się czegoś na temat jej działania na organizm ludzki. Podano ją pacjentom chorym na raka, u których zawiodła klasyczna chemioterapia. Rezultaty I fazy badań pokazały, że tuftsyna jest substancją bezpieczną w dawkach dochodzących nawet do 1 mg/kg masy ciała, a pacjenci odczuli wyraźną poprawę stanu zdrowia. Izraelscy uczeni opublikowali również wyniki doświadczeń przeprowadzonych na pacjentach chorych na AIDS. Tuftsynę podawano pacjentom, u których występowała utrata wagi, biegunka,

podwyższona temperatura ciała i przechodzili infekcje grzybowe. Podanie tuftsyny w dawce nie przekraczającej 5 mg na tydzień spowodowało całkowity spadek gorączki, ustała biegunka i nastąpiła wyraźna poprawa [50, 51]. Tuftsyna wydaje się być idealną substancją poprawiającą właściwości układu odpornościowego. Prognozuje się, że otrzymanie nowych aktywniejszych analogów i określenie ich dawek leczniczych dla człowieka to tylko kwestia czasu. Wydaje się, że tuftsyna będzie przydatna w leczeniu pacjentów z brakiem odporności, nowotworami lub w reumatoidalnym artretyzmie.

Podziękowania

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Grant Nr 4 P05F 017 16.

Artykuł otrzymano 24 sierpnia 2000 r.
Zaakceptowano do druku 7 listopada 2000 r.

Piśmiennictwo

- Dzierzbicka K, Kołodziejczyk AM, Wysocka-Skrzela B, Kołodziejczyk AS (1994) *Polish J Chem* **68**: 37-45
- Dzierzbicka K, Gozdowska M, Wysocka-Skrzela B, Kołodziejczyk AM (1999) *Acta Poloniae Pharmaceutica* **56**: 20-24
- Siemion Z, Kluczyk A (1999) *Peptides* **20**: 647-674
- Najjar VA, Nishioka K (1970) *Nature* **228**: 672-673
- Najjar VA (1987) *Drugs Future* **12**: 147-160
- Verdini AS, Silvestri S, Becherucci C, Longobardi MG, Parente L, Peppoloni S, Perretti M, Pileri P, Pinori M, Viscomi GC, Nencioni L (1991) *J Med Chem* **34**: 3372-3377
- Mezo G, Szerekerke M, Sarmay G (1990) *Peptides* **11**: 405-51
- Nishioka K, Obeyesekere U, McMurray JS (1995) *Biochem Pharmacol* **49**: 735-738
- Corazza GR, Zoli G, Ginaldi L, Cancellier C, Profeta V, Gasparrini G, Quagliano D (1991) *Lancet* **337**: 12-13
- Paulesu L, Di Stefano A, Luzzi E, Bocci V, Silvestri S, Nencioni L (1992) *Immunol Lett* **34**: 7-12
- Wegla JR, Ansevin AT, Dessens SE, Nishioka K (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 1147-1153
- Najjar VA, Konopińska D, Chaudhuri MK, Schmidt DE, Linehan L (1981) *Mol Cell Biochem* **41**: 3-12
- Najjar VA, Linehan L, Konopińska D (1983) *Ann NY Acad Sci* **41**: 261-267
- Wleklík M, Levy SB, Łuczak M, Najjar VA (1986) *J Gen Virol* **67**: 2001-2004
- Warner E, Sulkes A, Gez E, Uziely B, Ben-Baruch N, Ben-Yosef R, Biran S, Catene R (1987) *Chemioterapia* **6**: 706-708
- Schantz SP, Romsdahl MM, Bobcock GF, Nishioka K, Goepfert H (1985) *Laryngoscope* **95**: 588-594
- Banks RA, Nishioka K, Kazazi F, Bobcock GF (1985) *J Natl Cancer Inst* **74**: 1074-1083
- Herman ZS, Stachura Z, Opielka Ł, Siemion Z, Nawrocka E (1981) *Experientia* **37**: 76-77
- Galasik-Bartoszek U, Konopińska D, Plech A, Najjar VA, Brus R (1991) *Int J Peptide Protein Res* **38**: 176-180
- Dovedova EL (1986) *Biull Eksp Biol Med* **102**: 155-157
- Pawelczyk E (red) (1978) *Chemia leków*, Warszawa PZWL, str. 94 i 155
- Seredenin SB, Semenova TP, Kozlovskaja MM, Medcinskaia NI, Nezhovibatko VN (1995) *Eksp Klin Farmakol* **58**: 3-6
- Begum R (1985) *Farmakol Toksikol* **48**: 41-45
- Aronowski J, Wleklík M, Gumulka SW, Łuczak M, Konopińska D (1985) *Life Sci* **37**: 1649-1653
- Mitsuma T, Nogimori T, Chaya M (1984) *J Aichi Med Univ Assoc* **12**: 185-190
- Mitsuma T, Nogimori T, Chaya M (1985) *Experientia* **41**: 113-114
- Lelekova TV, Romanowski PI, Aleksandrov PN, Ashmarin IP (1989) *Biull Eksp Biol Med* **108**: 8-10
- Paradowski A, Rózga M, Nawrocka E, Siemion IZ (1991) *Arch Immunol Ther Exp* **39**: 159-164
- Paradowski A, Dynowski Z, Kubik A, Siemion IZ (1991) *Arch Immunol Ther Exp* **39**: 147-152
- Kamenskii AA, Sarycheva NI, Kalikhevich VN (1988) *Fiziol Zh SSSR* **74**: 547-550
- Ashmarin IP, Pastorova VE, Liapina LA, Kudriashov BA, Kalikhevich VN, Kamenskii A, Azieva LD (1991) *Izv Akad Nauk SSSR* **2**: 302-306
- Gershonov E, Granoth R, Tzevoval E, Gaoni Y, Fridkin M (1996) *J Med Chem* **39**: 4833-4843
- Fridkin M, Stabinsky Y, Zakuth V, Spirer (1977) *Biochimica et Biophysica Acta* **496**: 203-211
- Konopińska D, Nawrocka E, Siemion IZ, Ślopek S, Szymaniec S, Kłonowska E (1977) *J Protein Peptide Res* **9**: 71-77
- Konopińska D, Siemion IZ, Szymaniec S, Ślopek S (1979) *Polish J Chem* **53**: 343-351
- Konopińska D, Łuczak M, Gumulka S (1983) *Int J Peptide Protein Res* **22**: 223-228
- Konopińska D, Najjar VA, Callery M (1982) *Pol J Chem* **56**: 1063-1066
- Mezo G, Szekere M, Sarmay G, Gergely J (1990) *Peptides* **11**: 405-415
- Arcoleo F, Milano S, Di Agostino P, Misiano G, Cappelletti S, Gromo G, Marcucci F, Leoni F, Cillari E (1997) *Br J Pharmacol* **120**: 1383-1389
- Kraus-Berthier L, Ferry G, Combe-Perez V, Vissalli M, Remond G, Vincent M, Bounti JA (1991) *Biochem Pharmacol* **41**: 1411-1418
- Kraus-Berthier L, Remond G, Vissalli M, Heno D, Portevin B, Vincent M (1993) *Immunopharmacology* **25**: 261-267
- Zacharie B, Sauve G, Penny C (1993) *Tetrahedron* **49**: 10489-10500
- Rocchi R, Biondi L, Filira F, Gobbo M, Dagan S, Fridkin M (1987) *Int J Peptide Protein Res* **29**: 250-261
- Titov VM, Meshcheryakova EA, Balashova TA, Andronova TM, Ivanov VT (1995) *Int J Peptide Protein Res* **45**: 348-355
- Granoth P, Vadai E, Burstein Y, Fridkin M, Tzevoval E (1997) *Immunopharmacology* **37**: 43-52
- Fridkin M, Stabinsky Y, Zakuth V, Spirer Z (1977) *Biochim Biophys Acta* **496**: 203-211
- Guru PY, Agrawal AK, Singha UK, Singhal A, Gupta CM (1989) *FEBS Lett* **245**: 204-208
- Owais M, Ahmed I, Krishnakumar B, Jain RK, Bachhawat BK, Gupta CM (1993) *FEBS Lett* **326**: 56-58
- Catane R, Schlanger S, Weiss L, Penchas S, Fuks Z, Treves AJ, Gottlieb P, Fridkin M (1983) *Ann NY Acad Sci* **419**: 251-260
- Marilus R, Spirer Z, Michaeli D, et al. (1984) *Israel J Med Sci* **20**(3): 249-251
- Marrow WJW, Isenberg DA, Sobel RE (1991) *Clin Immunol Immunopathol* **58**: 163-180
- Nishioka K, Hopfer RL, El-Hagin T, Lopez-Berstein G (1986) *J Antimicrob Chemother* **17**: 631-633

53. Levy R, Kain Z, Chaimovitz C, Fridkin M, Segal S, Alkan M (1989) *J Biol Regul Homeost Agents* **303**: 211-229
54. Iyer RR, Prasad HK, Bhutani LK, Rao DN (1990) *Int J Immunopharmac* **12**: 85 9-869
55. Guru PY, Agrawal AK, Singha UK, Singha A, Gupta CM (1989) *FEBS Lett* **245**: 669-674
56. Smith PC, Zam ZS, Stem GA (1986) *Cornea* **5**: 181-183
57. Fatma N, Mathur KB, Chatterjee RK (1994) *Acta Trop* **57**: 55-67
58. Mathe G, Colasante U, Morette C, Hallard M, Blanquet D (1996) *Biomed Pharmacother* **50**: 473-479
59. Agarwal A, Kandpal H, Gupta HP, Singh NB, Gupta CM (1994) *Antimicrob Agent Chemother* **38**: 588-593
60. Gupta CM, Puri A, Jain RK, Bali A, Anand N (1986) *FEBS Lett* **205**: 351-354

Czy kalcyklina, białko wiążące jony Ca^{2+} , pełni podobną funkcję jak kalmodulina?

Does calcyclin, a Ca^{2+} -binding protein, play a similar role as calmodulin?

ANNA FILIPEK

Spis treści:

- I. Białka wiążące jony wapnia
- II. Odkrycie i występowanie kalcykliny
- III. Struktura kalcykliny
- IV. Funkcja kalcykliny
 - IV-1. Kalcyklina a proliferacja i różnicowanie komórek
 - IV-2. Kalcyklina pozakomórkowa
 - IV-3. Kalcyklina – oddziaływanie z białkami efektorowymi
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: CacyBP — białko wiążące się z kalcykliną; CNBr — cyjanobrom; GAPDH — dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; SDS — siarczan sodowy dodecyłu

I. Białka wiążące jony wapnia

W komórce, w stanie spoczynku, stężenie wolnych jonów wapnia wynosi około 10^{-7} M a w środowisku zewnątrzkomórkowym około 10^{-3} M. Działanie na komórkę różnymi związkami może prowadzić do wzrostu stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie do poziomu 10^{-5} - 10^{-6} M, a sygnał w postaci podwyższonego stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie odbierany jest między innymi przez białka specyficznie wiążące ten kation [1, 2].

Wśród białek wiążących jony wapnia na szczególną uwagę zasługują białka posiadające w swej strukturze tzw. motywy „EF-hand”. Analiza strukturalna tych białek wskazuje na bardzo wysoki stopień podobieństwa w obrębie motywu „EF-hand”. Dwa motywy „EF-hand” występujące w białku w bliskim sąsiedztwie określane są mianem „domeny wiążącej

Contents:

- I. Calcium binding proteins
- II. Discovery and distribution of calcyclin
- III. Structure of calcyclin
- IV. Function of calcyclin
 - IV-1. Calcyclin in proliferation and differentiation
 - IV-2. Extracellular calcyclin
 - IV-3. Calcyclin – interaction with target proteins
- V. Summary

wapń”. Białka zawierające motywy „EF-hand”, mają na ogół niską masę cząsteczkową wynoszącą od 10 do 30 kDa i występują powszechnie w komórkach eukariotycznych. Kalcyklina, białko będące przedmiotem niniejszego artykułu zawiera dwa motywy „EF-hand” i zaliczana jest do rodziny białek S100 [3].

Wśród białek zawierających motywy „EF-hand” są białka, które w komórce pełnią funkcję „buforów” jonów wapnia oraz białka, które oddziałują z innymi białkami komórkowymi (zwanymi białkami efektorowymi) i modułują ich aktywność. Białka działające jako „bufory” jonów wapnia zmieniają nieznacznie konformację po związaniu Ca^{2+} i nie oddziałują z białkami efektorowymi. Przykładami „buforów” Ca^{2+} są parwalbumina i kalbindyna D28K [4]. Białka zawierające motywy „EF-hand”, które oddziałują z białkami efektorowymi zmieniają znacznie konformację po związaniu Ca^{2+} . Najbardziej znanym przykładem takiego białka jest kalmodulina [5]. W wyniku oddziaływania kalmoduliny z białkami efektorowymi (najczęściej enzymami komórkowymi), zapoczątkowana zostaje kaskada reakcji, co ma wpływ na wiele procesów komórkowych takich jak np. transkrypcja, proliferacja i różnicowanie się komórek, uwalnianie przekaźników nerwowych, mitoz, endocytoza, egzocytoza, komunikacja międzykomórkowa, metabolizm glikogenu, proteoli-

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

za oraz skurecz mięśni i ruchliwość komórek niemięśniowych.

Ostatnio zidentyfikowano nieznanne dotąd białko zawierające motywy „EF-hand” i wiążące się z DNA [6, 7]. Białko to wiąże się z sekwencją określaną jako DRE (*Downstream Regulatory Element*), odpowiedzialną za ekspresję niektórych genów. Wykazano, że wiązanie się tego białka z sekwencją DRE hamuje transkrypcję i dlatego też białko to nazwano DREAM (*DRE Antagonist Modulator*). Zmiana konformacji w białku DREAM pod wpływem Ca^{2+} prowadzi do dysocjacji kompleksu DREAM — DNA i aktywację transkrypcji. Zatem DREAM pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego.

II. Odkrycie i występowanie kalcykliny

Kalcyklinę po raz pierwszy zidentyfikowano w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha (EAT) [8]. Jednak na istnienie tego białka wskazywały wcześniejsze badania dotyczące ekspresji genów po podaniu komórkom hodowanym *in vitro* czynników wzrostowych [9, 10].

Tabela 1

Występowanie kalcykliny

Izoforma kalcykliny	Tkanki/komórki	Piśmiennictwo
Kalcyklina ssacza	Komórki nabłonkowe i fibroblasty, płytki krwi, neurony, komórki glejowe, tkanka doczesna, mięsień sercowy, płuco	[14] [15] [16] [17] [18] [19] [20]
Kalcyklina kurza	Mięśnie gładkie	[21-24]

Intensywne badania nad kalcykliną rozpoczęto pod koniec lat 80-tych. Jednym z ważnych osiągnięć tego okresu było uzyskanie kalcykliny w postaci homogennej [8]. Białko to migruje w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS na poziomie około 10 kDa. Różnymi metodami wykazano, że kalcyklina wiąże jony wapnia oraz jony cynku. Po związaniu jonów wapnia cząsteczka kalcykliny zmienia konformację [8, 11-13], co w efekcie powoduje zmianę ruchliwości tego białka w żelu mocznikowym, zmianę fluorescencji tyrozynowej, wzrost stopnia hydrofobowości i oddziaływanie z nośnikami hydrofobowymi (np. *Phenyl-Sepharose*). Innym kierunkiem

badawczym dotyczącym kalcykliny była szczegółowa analiza występowania tego białka. Wykazano, że kalcyklina jest w różnych tkankach i komórkach różnych organizmów (Tabela 1).

III. Struktura kalcykliny

Kalcyklina ma cechy budowy pierwszorzędowej typowe dla białek z rodziny S100 [3]. Zawiera dwa motywy „EF-hand” wiążące jony wapnia oraz dwie domeny hydrofobowe. Wykazano, że fragmenty kalcykliny otrzymane w wyniku chemicznego rozszczylenia cząsteczki przy użyciu CNBr, zawierające po jednym motywie „EF-hand”, nie wiążą jonów wapnia i nie wiążą się z nośnikami hydrofobowymi [25].

Stosując różne czynniki sieciujące wykazano, że cząsteczka kalcykliny ma masę wynoszącą około 20 kDa, co odpowiada podwójnej masie cząsteczkowej wyznaczonej na podstawie składu aminokwasowego tego białka. Wskazuje to, że *in situ* kalcyklina występuje w formie dimeru utworzonego wskutek oddziaływań wodorowych (dimeru niekowalencyjnego) [22, 26]. Występowanie kalcykliny w roztwo-

rze w formie dimeru niekowalencyjnego wykazano też metodą rozpraszania światła (ang. *light scattering*) i metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [27]. Z badań NMR wynika, że monomery kalcykliny ułożone są antyrównolegle i tworzą homodimer o wymiarach 38 x 33 x 31 Å. Monomery kalcykliny oddziałują ze sobą domenami hydrofobowymi i fragmentami α -helikalnymi, podobnie jak monomery białka S100B [28].

Wiadomo też, że niektóre izoformy kalcykliny mają jedną resztę cysteiny i mogą tworzyć dimer kowalencyjny. Dimer ten migruje w żelu poliakrylamidowym, w obecności SDS i przy braku czynnika

redukującego, na poziomie odpowiadającym migracji białka o masie cząsteczkowej 20 kDa [11, 29]. Nie wiadomo, czy dimer kowalencyjny kalcykliny tworzy się w warunkach *in vivo*. Reasumując, uzyskane wyniki sugerują, że oba motywy „EF-hand” w cząsteczce monomeru kalcykliny stanowią domenę funkcjonalną oraz, że dimer jest formą pełniącą funkcję w warunkach fizjologicznych.

IV. Funkcja kalcykliny

IV-1. Kalcyklina a proliferacja i różnicowanie komórek

Liczne doniesienia dotyczące kalcykliny wskazują na udział tego białka w różnych procesach komórkowych. Już pierwsze badania sugerowały, że białko to może pełnić funkcję w cyklu komórkowym [9]. Zaobserwowano między innymi, że poziom mRNA kalcykliny wzrasta w fazie G₁ cyklu komórkowego fibroblastów po stymulacji tych komórek naskórkowym bądź płytkowym czynnikiem wzrostu. Pojawienie się lub wzrost poziomu mRNA kalcykliny stwierdzono w nowotworach takich jak np. przewłękła białaczka szpikowa, nowotwór Hodgkina (rak układu limfatycznego), nowotwór piersi, czerniak, nerwiak zarodkowy [9, 30-32]. Wykazano też, że poziom mRNA kalcykliny wzrasta w fibroblastach w wyniku ich transformacji onkogenem *h-ras* [33]. Szczególnie wysoką ekspresję mRNA kalcykliny zaobserwowano w nowotworach mających zdolność do tworzenia przerzutów [31]. W tkankach prawidłowych kalcyklina występuje głównie w komórkach nabłonkowych i fibroblastach. Zatem choroby, które charakteryzują się zwiększoną proliferacją tych komórek (np. marskość wątroby) mogą być diagnozowane na podstawie oznaczenia poziomu kalcykliny w tkankach zmienionych patologicznie [14, 34-35].

Wykazano także, że poziom mRNA kalcykliny wzrasta w czasie różnicowania się komórek guza chromochłonnego nadnerczy szczura (komórek PC12) [36], komórek nerwiaka złośliwego (neuroblastoma) [37] oraz komórek mieszka włosowego [38]. Sugeruje się też, że poziom kalcykliny zmienia się w czasie różnicowania się tkanek narządów rozrodczych ciężarnej myszy [39] oraz w regeneracji nabłonka rogówki oka [40].

IV-2. Kalcyklina pozakomórkowa

W 1990 roku po raz pierwszy zaobserwowano, że kalcyklina jest wydzielana przez komórki tkanki do-

czesnej macicy ciężarnej myszy [18] oraz że znajduje się w płynie owodniowym [41]. Wykazano też, że kalcyklina dodana do pożywki komórek trofoblastu oraz pożywki komórek β wysepek Langerhansa trzustki hodowanych *in vitro*, stymuluje odpowiednio wydzielanie laktogenu [18] i insuliny przez te komórki [42]. W przypadku komórek tucznych hodowanych *in vitro*, wykazano, że kalcyklina hamuje wydzielanie histaminy [43]. Ponadto, istnieją doniesienia wskazujące na udział kalcykliny w egzocytocie składników śluzu w komórkach nabłonkowych myszy [44].

IV-3. Kalcyklina — oddziaływanie z białkami efektorowymi

Zmiana konformacji kalcykliny w wyniku związania jonów wapnia wskazuje, że kalcyklina, podobnie jak kalmomodulina, może oddziaływać z białkami efektorowymi w komórce i modulować aktywność tych białek. Zatem, przeprowadzono szereg badań mających na celu identyfikację białek wiążących się z kalcykliną w sposób zależny od stężenia jonów wapnia i wykazano, że znane dotychczas izoformy kalcykliny oddziałują z różnymi białkami efektorowymi (Tabela 2).

Już pierwsze badania wykazały, że kalcyklina wiąże się z aneksynami i enzymem glikolitycznym — dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) [50]. Szczegółowe badania kompleksu kalcykliny z GAPDH nie wykazały wpływu kalcykliny na aktywność enzymu [51]. Wiązanie się kalcykliny z aneksynami i GAPDH zachodzi w obecności jonów wapnia w stężeniu milimolowym i być może w warunkach *in vivo*, tworzeniu kompleksów kalcykliny z tymi białkami towarzyszą dodatkowe ligandy. Fakt, że kalcyklina oddziałuje z aneksynami zasługuje na szczególną uwagę. Wiadomo, że oprócz kalcykliny, jest kilka innych białek S100, które wiążą się z aneksynami. Ponieważ aneksyny regulują proces egzocytozy [62], możliwy jest zatem udział kompleksów kalcykliny z aneksynami w tym procesie. Wykazano też, że kalcyklina występuje w pobliżu błon komórkowych [63-64] i że wiąże się z kwasem sjałowym, będącym jednym ze składników tzw. błon podstawnych tkanek.

Kalcyklina, podobnie jak białka S100A1 i S100B, występuje we frakcji białek rozpuszczalnych i w mniejszych ilościach w mikrosomach. Stosując różne metody stwierdzono, że w mikrosomach, kalcyklina występuje we frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100, co wskazuje, że wiąże się ona z białkami cytoszkieletu podbłonowego [52]. Białka te

mają masę cząsteczkową od 20 do 30 kDa a ich identyfikacja może przyczynić się do określenia funkcji kalcykliny w strukturach błonowych komórki.

znakowanego ^{32}P (wyniki nieopublikowane). Porównanie składu aminokwasowego CacyBP (wyznaczonego na podstawie sekwencji nukleotydowej) ze

Tabela 2

Oddziaływanie kalcykliny z białkami efektorowymi

Izofорма kalcykliny	Białka efektorowe	Piśmiennictwo
Kalcyklina ssacza	Aneksyna II, aneksyna VI, aneksyna XI, GAPDH, CacyBP	[19, 45–54] [55–58]
Kalcyklina kurza	Kaldesmon, kalponina, tropomiozyna, lizozym	[22–23, 59–61]

Stosując metodę „gel overlay” wykazano, że we frakcji białek rozpuszczalnych komórek Ehrlicha, kalcyklina wiąże się z białkiem o masie cząsteczkowej 30 kDa (nazwanym CacyBP, od **Ca**lcyclin **B**inding **P**rotein) [55]. Białko to oczyszczono, a jego fragment uzyskany w wyniku trawienia α -chymotrypsyną poddano analizie sekwencji aminokwasowej. Analiza tej sekwencji wykazała, że białko CacyBP nie wykazuje podobieństwa do żadnego znanego białka [55]. Stosując sondę oligonukleotydową zsyntetyzowaną na podstawie sekwencji aminokwasowej fragmentu białka, zidentyfikowano klon cDNA kodujący CacyBP. Analiza sekwencji nukleotydowej tego genu potwierdziła brak podobieństwa do sekwencji genów dostępnych w różnych bazach danych (m. in. w GenBank). Następnie wyprodukowano CacyBP w bakteriiach *E. coli* i oczyszczono białko rekombinowane. Wykazano, że wiązanie się kalcykliny z CacyBP zachodzi w obecności jonów wapnia w stężeniu mikromolowym [56], co wskazuje, że kompleks kalcyklina — CacyBP może mieć znaczenie w warunkach fizjologicznych.

Analiza sekwencji CacyBP metodami teoretycznymi wskazuje, że jest to białko zasadowe ($\text{pI} = 7.78$), niestabilne i posiadające krótki okres półtrwania. Ponadto, białko to posiada miejsca potencjalnej N-glikozylacji oraz miejsca potencjalnej fosforylacji przez kinazę C, kinazę kazeinową II i kinazę tyrozynową. Wykazano, że w warunkach *in vitro* kinazy te fosforylują CacyBP. Nie stwierdzono jednak fosforylacji białka CacyBP w komórkach neuroblastoma NB-2a w warunkach *in situ* z użyciem ortofosforanu

składem aminokwasowym innych białek metodą teoretyczną opisaną przez H o b o h m i S a n d e r [65], pokazało, że istnieje duże podobieństwo pomiędzy CacyBP i kilkoma hipotetycznymi białkami, których geny zidentyfikowano w drożdżach. Sekwencje nukleotydowe genów kodujących te białka wykazują wysokie podobieństwo do sekwencji genów kodujących białka z rodziny SSRP (SSRP — DNA *Structure-Specific Recognition Protein*), a zatem wyniki te sugerują, że CacyBP może brać udział w regulacji ekspresji genów. Analiza sekwencji pod kątem obecności w białku charakterystycznych domen (sekwencji) wykazała, że CacyBP zawiera sekwencję podobną do sekwencji występującej w nukleoplazminie i kierującej to białko do jądra komórkowego [66].

Badania prowadzone nad CacyBP metodą *western* i *northern blot* pokazują, że białko to występuje w różnych tkankach i, że najwyższy poziom jego ekspresji zachodzi w mózgu, śledzionie, wątrobie i mięśni gładkim żołądka szczura [57]. Analiza immunohistochemiczna skrawków mózgu wskazuje, że CacyBP występuje głównie w neuronach mózdzku, hipokampa i kory mózgowej. Te ostatnie wyniki wskazują również na brak współwystępowania CacyBP i kalcykliny w komórkach neuronalnych. Możliwe jest zatem, że kompleks CacyBP — kalcyklina pełni funkcję tylko w niektórych komórkach takich jak np. komórki nowotworowe Ehrlicha, a w tkance mózgowej CacyBP współdziała z innym niż kalcyklina białkiem wiążącym wapń. Stosując metody biologii molekularnej zidentyfikowano najkrótszy fragment

w białku CacyBP, wykazujący zdolność wiązania się z kalcykliną. Fragment ten zawiera reszty aminokwasowe 178-229, a jego stała dysocjacji z kalcykliną wynosi 0.9 μM [58].

V. Podsumowanie

W niniejszym artykule opisano odkrycie, występowanie, strukturę i możliwe funkcje kalcykliny, białka wiążącego Ca^{2+} poprzez motywy „EF-hand” i należącego do rodziny białek S100. Kalcyklina występuje w różnych tkankach i komórkach, głównie w fibroblastach i komórkach pochodzenia nabłonkowego. W warunkach *in situ* kalcyklina tworzy dimer niekowalencyjny. Sugeruje się, że kalcyklina bierze udział w regulacji wielu procesów komórkowych. Może wpływać na proliferację, różnicowanie się komórek lub regulować wydzielanie hormonów i innych cząsteczek sygnałowych. Na podstawie najnowszych wyników dotyczących oddziaływania kalcykliny z CacyBP w sposób zależny od stężenia Ca^{2+} można sugerować, że kalcyklina podobnie jak kalmodulina, wywołuje kaskadę reakcji i ma wpływ na różne procesy komórkowe. Dalsze badania dotyczące kalcykliny i CacyBP dostarczą zapewne informacji w jakich procesach bierze udział kompleks tych dwóch białek.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach grantu KBN Nr 6P04 A05415.

Artykuł otrzymano 14 września 2000 r.
Zaakceptowano do druku 25 września 2000 r.

Piśmiennictwo

- Niki I, Yokokura H, Sudo T, Kato M, Hidaka H (1996) *J Biochem* **120**: 685-698
- Kawasaki H, Nakayama S, Kretsinger RH (1998) *BioMetals* **11**: 277-295
- Donato R (1999) *Biochim Biophys Acta* **1450**: 191-231
- Heizmann CW, Braun K (1992) *Trends in Neuroscience* **15**: 303-308
- James P, Vorherr T, Carafoli E (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 38-42
- Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR (1999) *Nature* **398**: 80-84
- Buxbaum JD, Choi E K, Luo Y, Lilliehook C, Crowley AC, Merriam DE (1998) *Nat Med* **10**: 1177-81
- Kuźnicki J, Filipek A (1987) *Biochem J* **247**: 663-667
- Calabretta B, Kaczmarek L, Mars W, Ochoa D, Gibson CW, Hirschhorn RH, Baserga R (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4463-4467
- Calabretta B, Battini R, Kaczmarek L, DeRiel JK, Baserga R (1986) *J Biol Chem* **261**: 12628-12632
- Kuźnicki J, Filipek A, Hunziker PE, Huber S, Heizmann CW (1989) *Biochem J* **263**: 951-956
- Filipek A, Heizmann CW, Kuźnicki J (1990) *FEBS Lett* **264**: 263-266
- Kuźnicki J, Filipek A, Heimann P, Kaczmarek L, Kamińska B (1989) *FEBS Lett* **254**: 141-144
- Kuźnicki J, Kordowska J, Puzianowska M, Woźniewicz BM (1992) *Exp Cell Res* **200**: 425-430
- Tomida Y, Tersawa M, Kobayashi R, Hidaka H (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 1310-1316
- Filipek A, Puzianowska M, Cieślak B, Kuźnicki J (1993) *NeuroRep* **4**: 384-386
- Yamashita N, Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW, Kosaka T (1999) *J Comp Neurol* **404**: 235-257
- Thordarson G, Southard J N, Talamantes F (1991) *Endocrinology* **129**: 1257-1265
- Zeng F-Y, Gerke V, Gabius H J (1993) *Int J Biochem* **25**: 1019-1027
- Tokumitsu H, Kobayashi R, Hidaka H (1991) *Arch Biochem Biophys* **288**: 202-207
- Mani R S, Kay CM (1990) *Biochemistry* **29**: 1398-1404
- Filipek A, Zasada A, Wojda U, Makuch R, Dąbrowska R (1995) *Comp Biochem Biophys* **113B**: 745-752
- Filipek A, Wojda U (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 151-154
- Allen BG, Andrea JE, Sutherland C, Schonecess BO, Walsh MP (1997) *Biochem Cell Biol* **75**: 733-738
- Wojda U, Kuźnicki J (1993) *Int J Biochem* **25**: 999-1007
- Wojda U, Kuźnicki J (1994) *Biochim Biophys Acta* **1209**: 248-252
- Potts BCM, Smith J, Akke M, Macke TJ, Okazaki K, Hidaka H, Case DA, Chazin WJ (1995) *Nature Struct Biol* **2**: 790-796
- Kilby PM, Van-Eldik LJ, Roberts GC (1996) *Structure* **4**: 1041-1052
- Emoto Y, Kobayashi R, Akatsuka H, Hidaka H (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 1246-1253
- Calabretta B, Venturelli D, Kaczmarek L, Narni F, Talpaz M, Anderson B, Beran M, Baserga R (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1495-1498
- Weterman MAJ, Stoopen GM, van Muijen CNP, Kuźnicki J, Fuiters DJ, Bloemers HPJ (1992) *Cancer Res* **52**: 1291-1296
- Tonini GP, Fabretti G, Kuźnicki J, Massimo L, Scaruffi P, Brisigotti M, Mazzocco K (1995) *Eur J Can* **31A**: 499-504
- Guo X, Chambers AF, Parfett CLJ, Waterhouse P, Murphy LC, Reid RE, Craig AM, Edwards DR, Denhardt DT (1990) *Cell Growth Diff* **1**: 333-338
- Woźniewicz BM, Kordowska J, Kluge P, Puzianowska M, Kuźnicki J (1993) *Acta Histochem Cytochem* **26**: 397-404
- Kordowska J, Apel A, Brandl IA, Kuźnicki J (1994) *Acta Histochem Cytochem* **27**: 205-218
- Leonard DB, Ziff EB, Greene LA (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 3156-3167
- Tonini GP, Antonella C, Cara A, Di Martino D (1991) *Cancer Res* **51**: 1733-1737
- Wood L, Carter D, Mills M, Hatzenbuehler N, Vogeli G (1991) *J Invest Dermatol* **96**: 383-387
- Waterhouse P, Parhar RS, Guo X, Lala PK, Denhardt DT (1992) *Mol Reprod Devel* **32**: 315-323
- Bazan HEP, Allan G, Bazan NG (1992) *Exp Eye Res* **55**: 173-177
- Celis JE, Gesser B, Rasmussen HH, Madsen P, Leffers H, Dejgaard K, Honore B, Olsen E, Ratz G, Lauridsen JB, Basse B, Mouritzen S, Hellerup M, Andersen A, Walbum E, Celis A, Bauw G, Puype M, Damme JV, Vandekerckhove J (1990) *Electroporesis* **11**: 989-1071
- Okazaki K, Niki I, Iino S, Kobayashi S, Hidaka H (1994) *J Biol Chem* **269**: 6149-6152
- Fujii T, Kuzuymaki N, Ogoma Y, Kondo Y (1994) *Biol Pharm Bull* **17**: 581-585

43. Timmons PM, Chan C-TJ, Rigby PWJ, Poirier F (1993) *J Cell Sci* **104**: 187-196
44. Minami H, Tokumitsu H, Mizutani A, Watanabe Y, Watanabe M, Hidaka H (1992) *FEBS Lett* **305**: 217-219
45. Tokumitsu H, Mizutani A, Minami H, Kobayashi R, Hidaka H (1992) *J Biol Chem* **267**: 8919-8924
46. Tokumitsu H, Mizutani A, Hidaka H (1993) *Arch Biochem Biophys* **303**: 302-306
47. Sudo T, Hidaka H (1998) *J Biol Chem* **273**: 6351-6357
48. Watanabe M, Ando Y, Tokumitsu H, Hidaka H (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1376-1382
49. Filipek A, Gerke V, Weber K, Kuźnicki J (1991) *Eur J Biochem* **195**: 795-800
50. Filipek A, Wojda U, Leśniak W (1995) *Int J Biochem Cell Biol* **27**: 1123-1131
51. Leśniak W, Filipek A (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **220**: 269-273
52. Hidaka H, Mizutani A (1993) *Biomedical Res* **14**: 53-55
53. Mamiya N, Iino S, Mizutani A, Kobayashi S, Hidaka H (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 403-409
54. Filipek A, Wojda U (1996) *Biochem J* **320**: 585-587
55. Filipek A, Kuźnicki J (1998) *J Neurochem* **70**: 1793-1798
56. Jastrzębska B, Filipek A, Nowicka D, Kaczmarek L, Kuźnicki J (2000) *J Histochem Cytochem* **48**: 1195-1202
57. Nowotny M, Bhattacharya S, Filipek A, Krezel AM, Chazin W, Kuźnicki J (2000) *J Biol Chem* **275**: w druku
58. Mani RS, McCubbin WD, Kay CM (1992) *Biochemistry* **31**: 1398-1404
59. Wills FL, McCubbin WD, Kay CM (1994) *Biochemistry* **33**: 5562-5569
60. Golitsina NL, Kordowska J, Wang C-LA, Lehrer SS (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **220**: 360-365
61. Gerke V, Moss S (1997) *Biochem Biophys Acta* **1357**: 129-154
62. Gabius HJ, Bardosi A, Gabius S, Hellmann KP, Karas M, Kratzin H (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 506-512
63. Zeng F-Y, Gabius HJ (1992) *Biochem Int* **26**: 17-24
64. Hobohm U, Sander C (1993) *FEBS Lett* **333**: 211-213
65. Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991) *Cell* **64**: 615-625

Mucyna MUC1 i jej znaczenie w procesach nowotworzenia

MUC1 mucin and its signification in cancerogenesis

ANNA PASZKIEWICZ-GADEK¹, ANDRZEJ GINDZIEŃSKI²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Funkcje mucyny MUC1
- III. Struktura cząsteczek MUC1
 - III-1. Szkielet białkowy
 - III-2. Biosynteza i struktura części węglowodanowej MUC1
 - III-3. Biosynteza i struktura O-glikozydowo związanych oligosacharydów w nowotworowym MUC1
- IV. Immunogenność MUC1
- V. Odpowiedź układu immunologicznego na nowotworową postać MUC1
- VI. Próby immunoterapii nowotworowej opartej na MUC1

Contents:

- I. Introduction
- II. MUC1 mucin functions
- III. Molecular structure of MUC1 mucin
 - III-1. Protein backbone
 - III-2. Biosynthesis and structure of MUC1 glycans
 - III-3. Biosynthesis and structure of O-linked oligosaccharides in cancer-associated MUC1
- IV. MUC1 immunogenity
- V. Immune response to cancer MUC1 mucin
- VI. Experiments of cancer immunotherapy based on MUC1

Wykaz stosowanych skrótów: AB0 — antygeny grup krwi A, B, 0; antygen T — Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr; antygen sT — sjalo-T, SA α 2-3Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr; antygen Tn — GalNAc-Ser/Thr; cDNA — komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy; CTL — cytotoksyczne limfocyty T; ER — siateczka śródplazmatyczna; GalNAc — *N*-acetylo-D-galaktozoamina; GlcNAc — *N*-acetylo-D-glukozaamina; Gal — galaktoza; pp-GalNAc-T — polipeptydylo-*N*-acetyllogalaktozoaminylotransferaza; IgM, IgG — immunoglobuliny klasy M, G; kDa — tys. Daltonów; Le^a, Le^x — antygeny Lewis a i Lewis x; MHC — główny układ zgodności tkankowej; PDTRPAGSTAPPAGVTSA — Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala; S.A. — kwas sjalowy; S.A.-T — sjalo-transferaza; TS — treonina-seryna; TCR — receptory cytotoksycznych limfocytów T; VNTR lub TR — intensywnie O-glikozylowany obszar cyklicznie powtarzających się aminokwasów.

I. Wprowadzenie

Na powierzchni komórek nabłonkowych występują wielkocząsteczkowe glikoproteiny (>200kDa) zwane mucynami. Uwzględniając ich strukturę i znaczenie, wyróżnia się mucyny błonowe wchodzące w

skład elementów błony komórkowej i mucyny wydzielnicze, stanowiące podstawowy składnik śluzu [1-3]. Wśród mucyn błonowych wyróżniamy: leukosjalinę (CD43), glikoforynę, ASGP-1 (*ascites sialo-glycoprotein 1*) i polimorficzną mucynę nabłonkową (PEM, *polymorphic epithelial mucin*) [4]. Ta ostatnia zwana jest również episjaliną, epitelialnym antygenem błonowym (EMA), PAS-0 (od nazwy przeciwciał z nią reagujących) i mucyną MUC1, jako produktu ekspresji genu *MUC1* [5].

Od wczesnych lat osiemdziesiątych, po uzyskaniu swoistych przeciwciał monoklonalnych do identyfikacji MUC1 znacznie wzrosła możliwość badania roli biologicznej tej mucyny. Praca ta stanowi podsumowanie wiadomości o najlepiej przebadanej mucynie błonowej MUC1, z uwzględnieniem jej roli w nowotworzeniu. [4, 5*].

II. Funkcje mucyny MUC1

Mucyna MUC1, pokrywająca komórki przewodów gruczołowych i nabłonka błon śluzowych, różni się od mucyn wydzielniczych mniejszą masą cząsteczkową, mniejszą gęstością O-glikozytacji oraz tym, że nie tworzy oligomerów i nie występuje w formie żelowej [6]. Występowanie mucyny MUC1 stwierdzono na powierzchni komórek nabłonkowych

¹Dr, ²prof. dr hab., Zakład Chemii Ogólnej i Organicznej Akademii Medycznej, ul. A. Mickiewicza 2a, 15-222 Białystok

przewodu pokarmowego, jamy macicy, przewodów trzustki, pęcherzyka żółciowego, gruczołu piersiowego. Stanowi ona zewnętrzny składnik błony komórkowej o grubości 200-500 nm oddzielający komórki od środowiska zewnętrznego [7]. Ochronia więc komórki przed działaniem obecnych w środowisku czynników zewnętrznych, które mogą uszkadzać strukturę zewnętrzną błon śluzowych.

Poziom ekspresji MUC1 w macicy podlega regulacji hormonalnej. W fazie estrogenowej cyklu miesięczkowego obfite występowanie mucyny MUC1 na powierzchni nabłonka utrudnia zagnieżdżenie się zarodka, w fazie progesteronowej następuje drastyczne zmniejszenie poziomu ekspresji genu MUC1, co umożliwi zakorzenienie się zarodka [4].

W prawidłowych komórkach nabłonka gruczołowego mucyna MUC1 pokrywa tylko wolne powierzchnie zwrócone do światła przewodów. W wielu komórkach nowotworowych ekspresja MUC1 znacznie wzrasta [8, 9], a mucyna występuje na całej powierzchni błony komórkowej [10]. Zwiększa to odległości między komórkami i obniża siły adhezji międzykomórkowej umożliwiając odrywanie się komórek od podłoża [11-13]. Mucyna syntetyzowana przez komórki nowotworowe ma zmienioną strukturę glikanów z wysoką zawartością zjonizowanych reszt kwasu sialowego, co powoduje wzajemne odpychanie się komórek nowotworowych i przenoszenie ich przez krew do innych tkanek [12, 14, 15]. Co więcej niektóre nietypowe dla komórek prawidłowych formy glikanów mogą wykazywać powinowactwo do selektyn śródbłonka, co umożliwi z kolei zagnieżdżanie się komórek przerzutowych [16, 17].

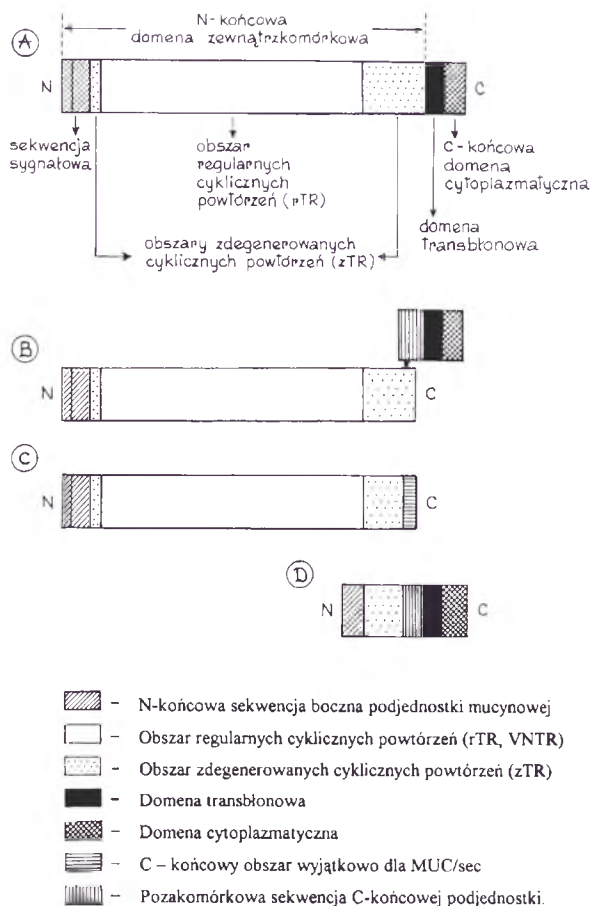
III. Struktura cząsteczek MUC1

III.1. Szkielet białkowy

W szkielecie białkowym prekursorowej cząsteczki MUC1 można wyodrębnić kilka obszarów (Ryc. 1A):

1) N – końcową domenę zewnątrzkomórkową zawierającą kolejno siedem aminokwasów, za którą znajduje się hydrofobowa sekwencja sygnałowa złożona z 13-stu aminokwasów i region zdegenerowanych cyklicznych powtórzeń,

2) centralny obszar regularnych powtórzeń cyklicznych (VNTR – *variable number tandem repeats*)



Ryc. 1. Schemat budowy rdzenia polipeptydowego różnych izoform MUC1. A — prekursor MUC1, B – dojrzała forma MUC1, kompleks podjednostki zewnątrzkomórkowej i transbłonowej, C – izoforma MUC1/sec, D – izoforma MUC1/Y (według F-G Hanisch a S. Muller a [23], zmodyfikowany).

at, TR) zawierający powtarzające się 20 aminokwasowe sekwencje,

3) drugi obszar zdegenerowanych cyklicznych powtórzeń aminokwasów z miejscami do glikozylacji; wymienione domeny 1, 2, 3 stanowią pozakomórkową część mucyny (1000-3000 aminokwasów),

4) hydrofobową domenę transbłonową (31 aminokwasów) i

5) domenę cytoplazmatyczną (69 reszt aminokwasowych) zakończoną wolną grupą karboksylową (C-końiec) [18-21].

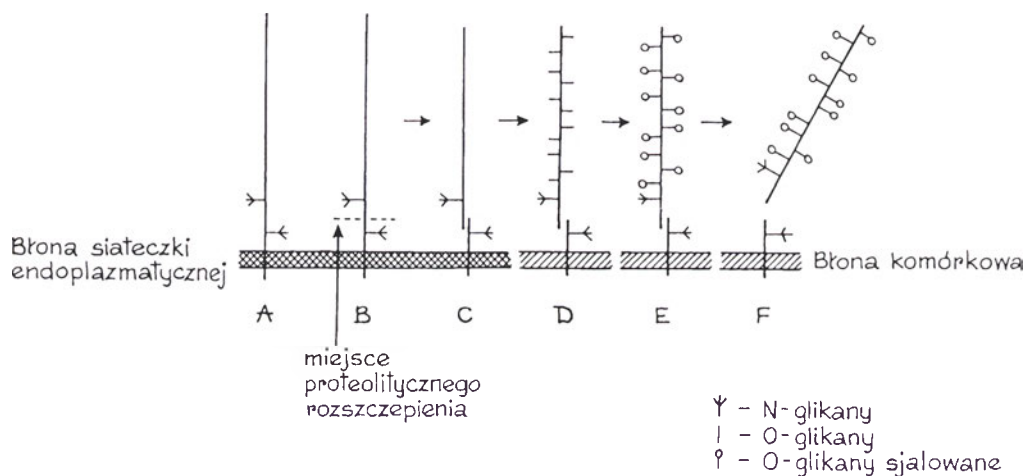
Kodujący strukturę gen MUC1 występuje w chromosomie 1q21-24 i zawiera 7 eksonów. W drugim jego eksonie znajdują się sekwencje kodujące cyklicznie powtarzające się sekwencje aminokwasowe, zajmujące 2/3 rdzenia białkowej cząsteczki. Każdy allel genu zawiera zmienną liczbę cyklicznych powtórzeń sekwencji (tandemów), co wraz z odmien-

*Niektóre właściwości mucyny MUC1 były tematem artykułu opublikowanego w *Postęпах Biochemii* w 1997 roku (Gindzieński, Zwierz, 1997)

nym sposobem wycinania intronów pre-mRNA (*alternative splicing*) jest przyczyną polimorfizmu cząsteczek [22, 23]. Na podstawie struktury cDNA ustalono, że region cyklicznych powtórzeń sekwencji aminokwasowych (VNTR), może zawierać od 21 do 125 powtórzeń sekwencji *PDTRPAPGSTAPPA-HGVTSA* z typowymi aminokwasami: Ser, Thr, Pro, i Gly [18, 24, 25]. Najczęściej spotyka się 41 lub 85 powtórzeń [26], a każde zawiera 5 reszt Ser lub Thr które mogą być O-glikozylowane; cztery z nich występują w dubletach Thr-Ser lub Ser-Thr i jak wskazują badania, 2 lub 3 miejsca są efektywnie glikozylowane [25, 27]. Poza regionem VNTR, w pobliżu błony komórkowej, znajdują się również potencjalne

logicznym [31]. Masa rdzenia białkowego cząsteczki MUC1 wynosi 120-220 kDa, a po uwzględnieniu zawartości 50% węglowodanów, całkowita masa cząsteczkowa glikoproteiny osiąga wielkość 240-450 kDa, co jest zgodne wynikami eksperymentalnymi [18, 32].

Dojrzałe białko MUC1 powstaje jeszcze w siateczce śródplazmatycznej z N-glikozylowanego prekursora białkowego (200 kDa) przez proteolityczne odcięcie części łańcucha polipeptydowego z N-końcem (o masie 20kDa) od fragmentu transbłonowego w pozycji 65 reszty aminokwasowej (Ryc. 2B) i obie części łańcucha tworzą heterodimersy, niekwalencyjnie połączony kompleks (Ryc. 1B i Ryc. 2D,



Ryc. 2. Etapy potranslacyjnej modyfikacji rdzenia polipeptydowego MUC1. A — N-glikozylowany prekursor, B — N-glikozylowany prekursor ulegający proteolizie na dwie podjednostki zewnątrzkomórkową i transbłonową, C — kompleks obu podjednostek, D — podjednostka zewnątrzkomórkowa po O-glikozylacji, E — podjednostka zewnątrzkomórkowa po wprowadzeniu reszt kwasu sjałowego (D, E — etapy glikozylacji rdzenia polipeptydowego zachodzące podczas recykliczacji w komórce), F — oddysocjowanie podjednostki zewnątrzkomórkowej MUC1 (według A. Gindzieńskiego i K. Zwierza [5], zmodyfikowany).

miejsca N-glikozylacji a w obszarze transbłonowym i cytoplazmatycznym reszty cysteiny (odpowiednio trzy i pięć reszt). Przypuszcza się, że cysteiny z regionu transbłonowego wiążą się kowalencyjnie z kwasami tłuszczowymi warstwy lipidowej błony od strony cytoplazmy, co ma ułatwiać oddziaływania hydrofobowe między białkiem i podwójną warstwą lipidową [28]. Domenom cytoplazmatycznej i transbłonowej przypisuje się udział w przewodzeniu sygnałów i komunikacji międzykomórkowej [20, 29]. Liczne reszty Pro w łańcuchu polipeptydowym MUC1 nadają cząsteczce strukturę typu beta, usztywnioną dodatkowo z powodu dużej zawartości O-glikozydowo związanych łańcuchów oligosacharydowych (O-glikanów). Pozakomórkowa domena MUC1 sięga ponad glikokaliks [30] i może być jednym z pierwszych elementów strukturalnych błony komórkowej rozpoznawanych w systemie immuno-

E). Zawiera on zakotwiczoną w błonie komórkowej C-terminalną, amfipatyczną podjednostkę (20 kDa) i dużą hydrofilową zewnątrzkomórkową podjednostkę mucynową z obszarem O-glikozylowanym VNTR [33].

Opisano także inne izoformy białka MUC1 (Ryc. 1C, D), które są skutkiem odmiennego sposobu wycinania intronów pre-mRNA lub proteolizy. Jedną z nich jest, znana jako MUC1/Y, krótka forma transbłonowa, o masie cząsteczkowej wynoszącej 33 lub 42-45 kDa, zależnie od stopnia glikozylacji. Izofорма ta nie zawiera w domenie pozakomórkowej obszaru VNTR (134 aminokwasów) [29]. Inną formą jest glikoproteina MUC1/sec wykryta w płynie hodowlanym komórek nowotworowych, zawierająca pełną strukturę obszaru VNTR lecz pozbawiona obszarów: cytoplazmatycznego i transbłonowego. Pochodzenie tej glikoproteiny nie jest znane, według

jednych autorów jest ona produktem fragmentacji proteolitycznej mucyny MUC1 [32-34], według innych ma być skutkiem odmiennego sposobu wycinania intronów (ang. *splicing*) mRNA [4, 10, 35, 36].

W uzyskanym drogą klonowania mysim homolo-gu MUC1 (Muc1), sekwencja tandemowych powtórzeń wykazuje jedynie 34% zgodności z ludzkim MUC1. Ponadto mysz gen Muc1 różni się od ludzkiego tym, że nie jest polimorficzny. Porównanie struktury homologicznych genów różnych gatunków wykazuje wysoki konserwatyzm domen transbłonowej i cytoplazmatycznej, co sugeruje istotne znaczenie biologiczne tych domen. Różnice w strukturze obszaru tandemowych powtórzeń mucyny MUC1 różnych zwierząt sugerują, że identyczność tego obszaru jest mniej istotna i typ VNTR jest cechą gatunku [37].

III-2. Biosynteza i struktura części węglowodanowej MUC1

W wyniku post-translacyjnej modyfikacji rdzeniowe białko MUC1 ulega rozległej glikozylacji nie tylko wewnątrz, ale i poza obszarem VNTR. W polipeptydowym rdzeniu, między obszarem VNTR i odcinkiem transbłonowym stwierdzono obecność pięciu potencjalnych miejsc N-glikozylacji [26]. N-glikozylacja zachodzi jako pierwsza i polega na ko-translacyjnym przeniesieniu polimannozowych glikanów z fosforanu dolicholu na syntetyzowany na rybosomach łańcuch polipeptydowy [38]. W dalszej kolejności następuje przekształcenie N-glikanów do form kompleksowych (Ryc. 2A), po czym kolejno następuje inicjacja i elongacja O-glikanów; prawdopodobnie w przedziałach *cis* i *trans* aparatu Golgiego. Wstępnie zsyntetyzowana glikoproteina zostaje na krótko wyeksponowana na powierzchni błony plazmatycznej (Ryc. 2D), następnie podlega recykliczacji przechodząc ponownie przez przedział *trans* aparatu Golgiego, i po 60 minutach pojawia się na powierzchni błony jako gotowa, w pełni sjalowana mucyna (Ryc. 2E). W konsekwencji, na powierzchni błony występują obok siebie jednocześnie dojrzałe i niedojrzałe formy mucyny MUC1 [39].

O-glikany są przyłączane do N-glikozylowanego łańcucha polipeptydowego podczas licznych, kolejno następujących po sobie reakcji, katalizowanych przez glikozylotransferazy i sulfotransferazy. Ekspresja genów odpowiedzialnych za syntezę transferaz i ich substratów białkowych może zmieniać się podczas wzrostu i różnicowania się komórek oraz nowotworzenia. Transferazy cukrowe i sulfotransferazy identyfikują specyficzne donory cukrowe jak

UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, GDP-Fuc, CMP-kwas sjalowy i 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfo-siarczan oraz swoiste sekwencje akceptorowe na polipeptydowym czy oligosacharydowym substracie [40]. Inicjacja O-glikozylacji zachodzi przy udziale polipeptydylo- α -N-acetylogalaktozaminylotransferazy (pp-GalNAc-T), której izoenzymy są kodowane przez kilka różnych genów. W organizmach ssaków ekspresji ulega jeden lub więcej izoenzymów pp-GalNAc-transferazy w sposób tkankowo-specyficzny. Glikozylacja hydroksoaminokwasów powinna być uzależniona od konformacji łańcucha polipeptydowego, jednak nie wiemy jaka sekwencja determinuje miejsce rozpoczęcia O-glikozylacji (tak jak w przypadku N-glikozylacji glikozylowana jest asparagina w sekwencji Asn-X-Ser/Thr, gdzie X nie może być Pro). Obecnie identyfikacja sekwencji będącej potencjalnym miejscem O-glikozylacji sprowadza się do oceny podobieństwa struktur wokół ustalonych miejsc glikozylacji oraz sprawdzania swoistości syntetycznych peptydów przy użyciu rekombinowanych pp-GalNAc-transferaz [2, 41]. Dotychczas drogą klonowania uzyskano siedem takich enzymów [42, 43]; różniących się nieco swoistością w stosunku do peptydowych substratów [44]. W badaniach *in vitro* reszty Thr są glikozylowane częściej niż reszty Ser, natomiast w badaniach *in vivo* nie wykazano takich różnic. Ponadto polipeptydy już glikozylowane pojedynczymi resztami GalNAc są glikozylowane efektywniej niż nie podstawione [45]. Wykazano natomiast, że pojedyncze podstawniki disacharydowe wykazują działanie hamujące, niezależnie od odległości disacharydu od potencjalnego miejsca następnej glikozylacji. Zjawisko to sugeruje istnienie mechanizmu hamowania glikozylacji innych potencjalnych miejsc, jeśli rozpoczęła się już elongacja oligosacharydów [22].

Podczas elongacji oligosacharydów, do pierwszej reszty N-acetylogalaktozamininy w części aparatu Golgiego zwanej *medial* przyłączane są następne monosacharydy (galaktoza, N-acetyloglukozoamina, fukoza, N-acetylogalaktozamina), zaś w części zwanej *trans* — kwas sjalowy. Dwie lub trzy reszty cukrowe połączone z białkiem noszą nazwę struktur rdzeniowych. Tabela 1 przedstawia 8 takich struktur rdzeniowych dla O-glikanów. W mucynie MUC1 znaleziono tylko dwie pierwsze (rdzeń 1 i 2), do których dobudowywane są reszty galaktozy i N-acetyloglukozoaminy (N-acetylolaktozamina). Fukoza (jedna lub dwie reszty) podstawiona na nieredukującym końcu łańcucha do N-acetyloglukozoaminy i galaktozy tworzy różne warianty struktury antygenowej Lewis (Le^a, Le^x, Le^b, Le^y, Tabela 2);

Tabela 1

Struktury rdzeniowe O-glikanów w mucynach*

Typ rdzenia	Struktura	Występowanie	
		MUC1	Inne mucyny
1	Galβ1-3GalNAc-R	mleko, mocz	powszechne
2	GlcNAcβ1-6 Galβ1-3GalNAc-R	mleko, mocz	powszechne
3	GlcNAcβ1-3GalNAc-R	n. ozn.	okreźnica, smółka płodowa
4	GlcNAcβ1-6 GlcNAcβ1-3GalNAc-R	n. ozn.	drogi oddechowe, smółka płodowa
5	GalNAcα1-3GalNAc-R	n. ozn.	smółka płodowa, nowotwory odbytu
6	GlcNAcβ1-6 GalNAc-R	n. ozn.	płyn nasienny, smółka płodowa, cysty ajników
7	GalNAcα1-6 GalNAc-R	n. ozn.	n.ozn.
8	Galα1-3GalNAc-R	n. ozn.	n.ozn.

*Według Hanisch i Mullera [23]; n. ozn., nie oznaczano; R — Ser/Thr

maksymalna liczba monosacharydów w łańcuchu wynosi zazwyczaj 16 reszt [23].

III-3. Biosynteza i struktura O-glikozydowo związanych oligosacharydów w nowotworowym MUC1

Inna jest struktura i położenie O-glikanów w łańcuchu polipeptydowym MUC1, syntetyzowanym przez komórki nowotworowe. Z badań struktury tych glikanów wynika, że brak jest aktywności β1-6GlcNAc-transferazy w większości linii komórkowych raka gruczołu piersiowego [13, 46], natomiast aktywność α2-3 sialotransferazy wzrasta we wszystkich liniach kilkakrotnie [25]. Z powodu większej ekspresji α2-3sialotransferazy (α2-3SA-T) niż β1-6GlcNAc-transferazy zsyntetyzowane, sjalowane łańcuchy oligosacharydowe są znacznie krótsze. Przyłączenie reszty kwasu sjalowego do Galβ1-3GalNAc blokuje dalsze przedłużanie łańcucha oligosacharydowego, tak że pozostaje on tylko trisacharydem SAα2-3Galβ1-3GalNAc (antygen sjało-T) (Ryc. 3 i Tabela 2). Tak krótkie glikany powodują znaczne odsłonięcie rdzenia polipeptydowego, ukrytego pod glikanami w mucynach prawidłowych. Do innych cech glikanów z tkanek nowotworowych można zaliczyć mniejszą zawartość reszt siarczanych a większą zawartość reszt kwasu sjalowego oraz mniejszy stopień O-acetylacji tego kwasu [40].

Antygeny mucynowe T i Tn (Tabela 2) zostały wykryte w płynach ustrojowych w zaawansowanych stanach choroby nowotworowej. W nowotworach,

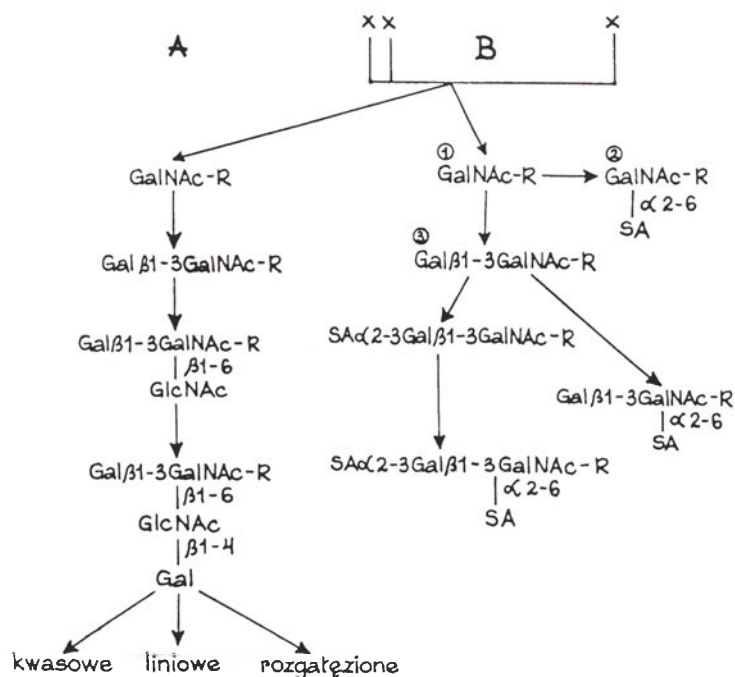
Tabela 2

Struktury sacharydowe antygenów tkankowych, występujące w komórkach nowotworowych

Antygen	Struktura
Tn	GalNAcα-Thr/Ser
Sjało-Tn	SAα2-6 GalNAcα-Thr/Ser
T	Galβ1-3GalNAcα-Thr/Ser
Sjało-T	SAα2-3 Galβ1-3GalNAcα-Thr/Ser SAα2-6 Galβ1-3GalNAcα-Thr/Ser
Le ^a	Galβ1-3GlcNAcβ1-3 Gal- Fucα1-4
Sjało-Le	SAα2-3 Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal- Fucα1-4
Le ^b	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal- Fucα1-2 Fucα1-4
Le ^x	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal- Fucα1-3
Sjało-Le ^x	SAα2-3 Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal- Fucα1-3
Le ^y	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal- Fucα1-2 Fucα1-3

między innymi żołądka [47, 48] gruczołu piersiowego [49, 50] oraz okrężnicy [51] stwierdzono również obecność struktur węglowodanowych sjało-Tn (SAα2-6GalNAc) oraz zaobserwowano podwyższo-

...PDTRPAPGSTAPPA HGV TSA...



Ryc. 3. Etapy O-glikozylacji reszt Ser lub Thr w prawidłowych (A) i nowotworowych (B) formach MUC1. Oznakowanie: x – aminokwasy najczęściej glikozylowane; R – reszty Ser/Thr (S/T); (1) – antygen Tn; (2) – sjało-Tn; (3) – antygen T i struktura rdzeniowa I.

ny poziom antygeny MUC1 we krwi pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego oraz jajników [52]. Miano tych antygenów oznacza się w celu prognozowania i oceny wyników leczenia [40].

IV. Immunogenność MUC1

Odpowiedź układu immunologicznego na antygeny wiąże się z prezentacją na powierzchni każdej komórki proteolizowanych fragmentów własnych białek, za pośrednictwem układu zgodności tkankowej MHC typu I, lub sfagocytowanych obcych białek na komórkach obrony immunologicznej, za pośrednictwem układu MHC typu II. Wykazano, że nieimmunogenne polipeptydy, poddane glikozylacji krótkimi łańcuchami oligosacharydowymi, nabierały cech immunogennych ponieważ podczas prezentacji przez układ MHC II były rozpoznawane jako obce przez receptory komórek T (receptory TCR) [53, 54]. Szczególnie silnie immunogenne są peptydy glikozylowane pojedynczą resztą N-acetylogalaktozamininy (antygen Tn), która bierze bezpośredni udział w interakcjach z efektorowymi komórkami układu immunologicznego (oddziaływania lektynowe) [25].

Pomijając przypadki autoagresji, odpowiedź immunologiczna przeciwko występującej fizjologicznie, nie zmienionej mucynie MUC1 nie powinna mieć miejsca w warunkach zdrowia. Opisano natomiast przypadki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej na różne glikoformy MUC1

występujące w pewnych stanach fizjologicznych. Odnosi się to do wieloródek i matek bliźniąt [55], u których opisano występowanie różnych form mucyny o niekompletnej strukturze węglowodanowej. Takie postacie mucyny MUC1 występują w błonie śluzowej macicy oraz w surowicy kobiet ciężarnych [56, 57] i pobudzają system immunologiczny do namnażania limfocytów T anty-MUC1. Zjawisko to może wyjaśniać znany fakt rzadszego występowania nowotworów gruczołu piersiowego u wieloródek [58].

V. Odpowiedź układu immunologicznego na nowotworową postać MUC1

Nowotworowe formy MUC1 mogą być jednymi z pierwszych struktur komórkowych rozpoznawanych przez układ immunologiczny z powodu ich wyeksponowanej lokalizacji i szeregu specyficznych właściwości [13]:

- 1) wzmożonej ekspresji, co najmniej dziesięciokrotnie, w porównaniu z ekspresją mucyny prawidłowej,
- 2) zaburzonej glikozylacji i odsłonięcia łańcucha polipeptydowego, który stanowi swoistą determinantę antygenową,
- 3) determinanta antygenowa (obszar TR) powtarza się w cząsteczce co najmniej 30-krotnie, stwarzając duży obszar zdolny do reakcji z przeciwciałami,

4) mucyna MUC1 rozmieszczona jest na całej powierzchni błony komórkowej a nie na wolnej powierzchni jak ma to miejsce w zdrowej tkance.

Wykazano eksperymentalnie, że proces nowotworowy stymuluje proliferację limfocytów cytotoksycznych skierowanych przeciwko peptydowej strukturze mucyny MUC1 [59, 60]. Odpowiedź immunologiczną limfocytów T daje się zahamować za pomocą przeciwciał monoklonalnych (SM3), po ich reakcji z immunogennymi fragmentami rdzenia peptydowego, wyeksponowanymi z powodu krótkich łańcuchów oligosacharydowych [13]. Podobnie lizę komórek nowotworowych przez limfocyty T hamują przeciwciała reagujące z receptorami $\alpha\beta$ cytotoksycznych limfocytów T (receptory TCR) [61, 62]. Brak hamującego wpływu przeciwciał anti-MHC wskazuje, że odpowiedź nie zależy od epitopów MUC1 prezentowanych przez białka MHC [61], jest więc specyficzna w stosunku do nowotworowego MUC1 i TCR zależna. Taką samą obserwację poczyniono u pacjentów z różnymi szpiczakami (*myeloma*) [62]. Stąd wniosek, że epitopy sekwencji cyklicznych powtórzeń mucyny MUC1, odsłonięte wskutek zmniejszonej glikozylacji, reagują bezpośrednio z receptorami TCR chętniej niż poprzez kompleks MHC/TCR [13].

U 20% spośród badanych pacjentów z nowotworami piersi, trzustki i okrężnicy wykryto obecność przeciwciał z grupy IgM, również skierowanych przeciwko powtarzającym się strukturom peptydowym TR, oraz kompleksy immunologiczne MUC1 z IgG i IgM [63-65]. U osób zdrowych i pacjentów z chorobą nowotworową małe sekwencje peptydowe z tego obszaru (RPAPGS, PPAHGVT i PDTRP) są rozpoznawane przez naturalne przeciwciała z grupy IgG i IgM jako obce. Wykazano też, że peptydy z obszaru TR, glikozylowane oligosacharydami rdzeniowymi typu 1 indukują silną odpowiedź poliklonalną w postaci namnażania komórek T_H CD+4 [66-68].

Spotyka się również informacje o immunosupresyjnym wpływie niektórych form MUC1 (rozpuszczalne formy antygeny MUC1) na proliferację komórek T [58]. Podczas badań nad rolą MUC1 w nowotworzeniu wykazano, że pochodzące z komórek nowotworowych, oczyszczone za pomocą chromatografii powinowactwa cząsteczki MUC1 hamują proliferację ludzkich komórek T. Przypuszcza się, że hamowanie odpowiedzi komórek T nie jest wynikiem zawady przestrzennej wynikającej z dużych rozmiarów MUC1 lub współoczystczenia innych cząstek jak np. transformującego czynnika wzrostu TGF β . Syntetyczne peptydy zawierające liczne tan-

demowe powtórzenia MUC1 (3-6 tandemowych powtórzeń) ale mniejsze niż cała cząsteczka MUC1, mogą również hamować odpowiedź komórek T. Ta inhibicja może zostać odwrócona przez dodanie syntetycznego peptydu MUC1, obejmującego mniej niż 1 „tandem” MUC1 [57], sugerując rolę rdzenia białkowego MUC1 w blokowaniu odpowiedzi komórek T. Również dodawanie egzogennej interleukiny IL-2 lub przeciwciał monoklonalnych do antygeny powierzchniowego CD28 współstymulującego komórki-T, odwraca inhibicję odpowiedzi komórek T, indukowaną przez MUC1 związany z nowotworami [69].

VI. Próby immunoterapii przeciwnowotworowej opartej na MUC1

Humoralna i cytotoksyczna odpowiedź immunologiczna przeciwko nowotworowej postaci mucyny MUC1 związana jest z immunogennością obszaru tandemowych powtórzeń (TR), co skłania do prowadzenia prób nad swoistą immunoterapią antynowotworową u zwierząt, a także i u ludzi [31]. Syntetyczne peptydy, zawierające od jednego do trzech cyklicznych powtórzeń struktury TR mucyny MUC1, używano do immunizacji myszy. Następtwem było osłabienie wzrostu implantowanych guzów i przedłużenie przeżywalności myszy z guzami nowotworowymi. Immunizacja syntetycznymi peptydami zawierającymi struktury TR (antygenami z epitopami syntetycznych peptydów) powodowała głównie odpowiedź humoralną z małą aktywnością przeciwnowotworową [70].

Próba immunizacji pacjentów za pomocą syntetycznego polipeptydu zbudowanego ze 105 aminokwasów, zawierającego 5,25 struktur peptydowych TR zwiększała co prawda miano przeciwciał, ale nie stymulowała w istotny sposób odpowiedzi komórkowej CTL [71]. Wysunięto przypuszczenie, że jest to spowodowane krzyżową reakcją polipeptydu, prawdopodobnie obszarów TR, z naturalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko strukturze Gal α 1-3Gal i powstałe kompleksy immunologiczne nie stymulują proliferacji limfocytów T [72]. Użycie natomiast krótkiego, 16 aminokwasowego peptydu o strukturze rdzenia MUC1 z poza obszaru TR (TR < 1) indukowało silną odpowiedź komórkową, zależną od MHC kl I. Stwierdzono także, że interleukina IL-2 odwraca hamowanie proliferacji komórek CTL i razem z peptydem może być użyta do prób immunizacji pacjentów [57].

Do immunoterapii wprowadzono również rekombinowane wektory wirusowe z cDNA, kodującym immunogenne białko nowotworowe MUC1. Szczepionka wirusowa z takiego cDNA, zawierająca kod trzech lub czterech tandemowych powtórzeń, przyczynia się do odrzucenia nowotworu w doświadczalnym modelu mysim, z użyciem komórek P815 linii komórek *mastocytoma* (guz z komórek tucznych) transfekowanych z MUC1 [73]. Rekombinowana szczepionka wirusowa jest zdolna prezentować antygen MUC1 w systemie immunologicznym różnych

immunizacja cDNA mucyny MUC1 wytwarza dwie odpowiedzi immunologiczne — humoralną i komórkową. Po immunizacji wykrywano przeciwciała anty-MUC1, co wskazywało że wprowadzony DNA ulegał ekspresji, a poziom przeciwciał wzrastał dodatkowo po pobudzeniu komórkami nowotworowymi syntetyzującymi MUC1 [13].

W podsumowaniu należy dodać, że w celu oceny skuteczności fragmentów MUC1 jako immunogenów testuje się kilka modeli zwierzęcych i wyniki badań są obiecujące. W modelowych systemach im-

Tabela 3

Proponowane immunogeny oparte na MUC1*

1.	Komórki wydzielające mucynę
2.	Mucyna oczyszczona z komórek nowotworowych
3.	Rekombinowane białko mucynowe
4.	Różne glikoformy mucynowe wytwarzane w transfekowanych komórkach
5.	Peptydy lub glikopeptydy oparte na sekwencji VNTR
6.	Rekombinowane wirusy z cDNA MUC1: szczepionki wirusowe, retrowirusowe, adenowirusowe
7.	Syntetyczne węglowodany analogiczne do krótkich łańcuchów cukrowych występujących w mucynach nowotworowych
8.	Nagi DNA, bez systemu przenoszącego
9.	Przeciwciała antymucynowe

*Według Grahama [13]

gatunków zwierząt, prowadząc do częściowego usunięcia zmian nowotworowych. Niestety nie uzyskano 100% odrzucenia nowotworu, dlatego w preparatach szczepionek stosuje się immunomodulatory, w celu wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej [74].

Rekombinowane szczepionki wirusowe z genem MUC1 i adiuwantem (cytokinami) oraz szczepionki wirusowe przenoszące cDNA mucyny MUC1 i interleukiny IL2 wykorzystywano w modelu mysim do badania odpowiedzi komórkowej układu immunologicznego. Używano ich również w I fazie badań klinicznych, u pacjentek z zaawansowanym nowotworem piersi, a uzyskana odpowiedź immunologiczna skłoniła do przeprowadzenia II fazy badań na pacjentkach z przerzutami nowotworów piersi (badania są jeszcze w toku) [25, 74].

W badaniach klinicznych stosowano również cDNA mucyny MUC1 jako immunogenu, gdy DNA wprowadzano bez użycia nośnika wirusowego. Wolff i inni [75] pierwsi wykazali, że w komórkach włókienek mięśniowych można było wywołać ekspresję obcego genu po iniekcji nagim DNA u zwierząt różnych gatunków (kury i naczelne), lecz nie udało się to u ludzi [13]. W modelowym układzie

immunogeny posiadające struktury MUC1 indukują odpowiedź immunologiczną i zapobiegają wzrostowi nowotworu. Jednym z lepszych immunogenów wydaje się być nagi cDNA mucyny MUC1, choć nadal nie wiadomo na jakiej drodze prezentowany jest antygen i jaki jest mechanizm odrzucenia nowotworu. Wytworzenie efektywnych immunogenów wywodzących się ze struktur mucyny MUC1 (Tabela 3) może mieć bardzo duże znaczenie w skutecznej terapii antynowotworowej i kliniczne badania przy użyciu różnych form antygeny MUC1 są obecnie szeroko rozwijane.

Artykuł otrzymano 11 września 2000 r.

Zaakceptowano do druku 13 listopada 2000 r.

Literatura

1. Perez-Vilar J, Hill RL (1999) *J Biol Chem* **274**:31751-31754
2. Paszkiewicz-Gadek A, Porowska H (2000) *Post Hig Med. Dośw* **54**: 183-198
3. Zalcwska A, Zwierz K, Żółkowski K, Gindzińska A (2000) *Acta Biochim Polon* **47**: 1067-1079
4. Meseguer M, Pellicer A, Simón C (1998) *Mol Human Reproduction* **4**: 1089-1098
5. Gindziński A, Zwierz K (1997) *Post Biochemii* **43**: 80-84

6. Hilgers J, von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten A A, Kenemans P (1995) *Scand J Clin Lab Invest* **55** Suppl 221: 81-86
7. Devine P L, McKenzie I F C (1992) *BioEssay* **14**: 619-625
8. Burdick M D, Harris A, Reid C J, Iwamura T, et al (1997) *J Biol Chem* **272**: 24198-24202
9. Zhang S, Zhang H S, Reuter V E, Slovin S E et al (1998) *Clin Cancer Res* **4**: 295-302
10. Aplin J D (1999) *Human Reproduction* **14** (Suppl 2): 17-25
11. Ligtenberg M J L, Vos H L, Gennissen A M C, Hilkens J (1990b) *J Biol Chem* **265**: 5573-5578
12. Wesseling J, vander Valk S W, Vos H L, Sonnenberg A et al. (1995) *J Cell Biol* **129**: 255-265
13. Graham R A, Burchell J M, Taylor-Papadimitriou J (1996) *Cancer Immun Immunother* **42**: 71-80
14. Wesseling J, vander Valk S W, Hilkens J (1996) *Mol Biol Cell* **7**: 565-577
15. Burchell J, Taylor-Papadimitriou J (1993) *Epithel Cell Biol* **2**: 155-162
16. Zhang K, Baekstrom D, Brevinge H, Hansson G C (1996) *J Cell Biochem* **60**, 538-549
17. Zhang K, Baekstrom D, Brevinge H, Hansson G C (1997) *Tumor Biol* **18**, 175-187
18. Gendler S J, Lancaster C A, Taylor-Papadimitriou et al (1990b) *J Biol Chem* **265**: 15286-15293
19. Lesuffleur T, Zweibaum A, Real F X (1994) *Critical Reviews Oncology/Hematology* **17**: 153-180
20. Poland P A, Kinlough C L, Rokaw M D, Magarian-Blanc J et al (1997) *Glycoconjugate J* **14**: 89-96
21. Regimbald L H, Pilarski L M, Longenecker B M, Reddish M A, et al. (1996) *Cancer Res* **56**: 4244-4249
22. Gendler S J, Cohen E P, Craston A et al. (1990a) *Int J Cancer* **45**: 431-435
23. Hanisch F-G, Müller S (2000) *Glycobiology* **10**: 439-449
24. Swallow D M, Gendler S, Griffiths G, Corney G et al (1987) *Nature* **328**: 82-84
25. Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles D W, Dalziel M (1999) *Biochim Biophys Acta* **1455**: 301-313
26. Ligtenberg M J L, Vos H L, Gennissen A M C et al (1990a) *J Biol Chem* **265**: 5573-5578
27. Muller S, Goletz S, Packer N, Gooley A et al (1997) *J Biol Chem* **272**: 24780-24793
28. Magge A I, Gutierrez L, Marshall C J et al (1989) *J Cell Sci* **11** (Suppl): 149-160
29. Zrihan-Licht S, Vos H L, Baruch A, Elroy-Stein O et al (1994) *Eur J Biochem* **224**: 787-795
30. Jentoft N (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 291-294
31. Miles D W, Taylor-Papadimitriou J (1999) *Pharmacol Ther* **82**: 97-106
32. Hey N A, Aplin J D (1996) *Glycoconjugate J* **13**: 769-779
33. Ligtenberg M J L, Kruijshaar L, Buijs F, van Meijer M et al (1992) *J Biol Chem* **267**: 6171-6177
34. Boshell M, Lalani E-N, Pamberton L et al (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **185**: 1-8
35. Williams C J, Wreschner D H, Tanaka A et al (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 1331-1338
36. Wreschner D H, Hareuveni M, Tsarfaty I et al (1990) *Eur J Biochem* **189**: 463-473
37. Spicer A P, Parry G, Patton S J, Gendler S J (1991) *J Biol Chem* **266**: 15099-15109
38. Hilkens J, Buijs F (1988) *J Biol Chem* **263**: 4215-4222
39. Litvinov S V, Hilkens J (1993) *J Biol Chem* **268**: 21364-21371
40. Brockhausen I (1999) *Biochem Biophys Acta* **1473**: 67-95
41. Gooley A A, Williams K L (1994) *Glycobiology* **4**: 413-417
42. Clausen H, Bennett E P (1996) *Glycobiology* **6**: 635-646
43. Hagen K G, Hagen F K, Balys M M, Beres T M et al (1998) *J Biol Chem* **273**, 27749-27754
44. Wandall H H, Hassan K, Mirgorodskaya A K, Kristensen P et al (1997) *J Biol Chem* **272**: 23503-23514
45. Brockhausen I, Toki D, Brockhausen J et al (1996) *Glycoconjugate J* **13**: 849-856
46. Brockhausen I, Yang J-M, Burchell J, Whitehouse C et al. (1995) *Eur J Biochem* **233**: 607-618
47. Chun M, Terata N, Kodami M, Jancic S et al (1993) *Eur J Cancer* **29A**: 1820-1823
48. Miles D W, Linehan J, Smith P, Filipe I (1995) *Br J Cancer* **71**: 1074-1076
49. Longenecker B M, Reddish M, Miles D W, MacLean G D (1993) *Vaccine Res* **2**: 151-162
50. Springer G F (1997) *J Mol Med* **75**: 594-602
51. Itzkowitz S H, Bloom E J, Koka I W A, Modin G et al (1990) *Cancer* **66**: 1960-1989
52. Kobayashi H, Terao T, Kawashima Y (1992) *J Clin Oncol* **10**: 95-101
53. Jensen T, Hansen P, Galli-Stampino L, Mouritsen S, et al (1997) *J Immunol* **158**: 3769-3778
54. Galli-Stampino L, Meinjohannes E, Frische K, Meldal M, et al (1997) *Cancer Res* **57**: 3214-3222
55. Agrawal B, Reddish M A, Krantz M J, Longenecker M (1995) *Cancer Res* **55**: 2257-2261
56. McGuckin M A, Devine P L, Ramm L E, Ward B G (1994) *Tumour Biol* **15**: 33-44
57. Agrawal B, Gendler S J, Longenecker M (1998) *Mol Med Today* **3**: 397-403
58. Agrawal B, Reddish M A, Longenecker B M (1996) *J Immunol* **157**: 2089-2095
59. Jerome K R, Barnd K M, Bendt C M, Boyer J et al (1991) *Cancer Res* **51**: 2908-2916
60. Ioanides C, Fisk B, Jerome K, Irimura T et al (1993) *J Immunol* **151**: 3693-3703
61. Barnd D L, Lan M S, Metzgar R S, Finn O (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7159-7164
62. Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, (1994) *J Immunol* **153**: 2102-2109
63. Kotera Y, Fontenot J D, Pecher G, Metzgar R, Finn O (1994) *Cancer Res* **54**: 2856-2860
64. Gourevitch M M, von Mensdorff-Pouilly S, Litvinov S V, Kenemans P et al (1995) *Br J Cancer* **72**: 934-938
65. von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten A A, Kenemans P, Snijderwin F G M et al (2000) *J Clin Oncol* **18**: 574-583
66. Hiltbold E M, Ciborowski P, Finn O J (1998) *Cancer Res* **58**: 5066-5070
67. Hanisch F-G, Muller S, Hassan H, Clausen H et al (1999) *J Biol Chem* **274**: 9946-9954
68. Irimura T, Denda K, Iida S-I, Takeuchi H, Kato K (2000) *J Biochem* **126**: 975-985
69. Agrawal B, Krantz M J, Reddish M A, Longenecker B M (1997) *Nature Med* **4**: 43-49
70. Apostolopoulos V, Xing P-X, McKenzie I (1994) *Cancer Res* **54**: 5186-5193
71. Apostolopoulos V, Osinski C, McKenzie I F C (1998) *Nat Med* **4**: 315-320
72. Sandrin M S, Vaughan H A, Sing P-X, McKenzie I F C (1997) *Glycoconjugate J* **14**: 97-105
73. Acres R B, Hareuveni M, Balloul J-M, Kiény M-P (1993) *J Immunother* **14**: 36-143
74. Balloul J-M, Acres R B, Geist M, Dott K, et al (1994) *Cell Mol Biol* **40**: 49-59
75. Wolff J A, Malone R W, Williams P, Chong W et al (1990) *Science* **247**: 1465-1468

Biochemia w nowym millennium

Biochemistry in the new millenium

MIROŚLAWA Z. BARCISZEWSKA¹, JAN BARCISZEWSKI²

Dla biologii molekularnej przełom wieków jest dobrą okazją do zastanowienia się nad jej dokonaniem oraz wyzwaniem przyszłości, do których należą diagnostyka molekularna, walka z nowotworami, terapia genowa czy nowoczesne rolnictwo.

W drugiej połowie XIX wieku nastąpił wyraźny postęp w nauce, a w XX wieku szczególnie szybko rozwijała się biologia. Mając w świadomości wielkie dokonania biologii w ostatnim okresie można nawet zapytać, czy nauka się skończyła? Skoro najważniejsze odkrycia w biologii takie jak ewolucja i DNA zostały dokonane, reszta jest uzupełnianiem szczegółów. Warto zastanowić się, czy jeszcze coś ważnego w nauce się wydarzy.

Badania biologiczne w ostatnim wieku skupiły się na poznaniu ogromnego katalogu skomplikowanych reakcji i dróg metabolicznych żywej komórki. Specjalizacja, uporządkowanie i różnorodność są podstawowymi wyróżnikami świata biologicznego. Obserwujemy to w wielkiej złożoności organizmów znajdujących się w dowolnym segmencie biosfery. Z tego punktu widzenia biologia wydaje się być najbardziej intelektualnie satysfakcjonującą i inspirującą dziedziną nauki. Różnice i zasięg nauk biologicznych dobrze ilustruje następujące porównanie: biologia molekularna obejmuje znane geny oraz ich znane produkty, biochemia analizuje znane produkty nieznanymi genami, a genetyka bada znane geny nieznanymi produktami. T. Dobzhansky napisał, że „nic w biologii nie jest ważne, co nie ma związku z ewolucją”. Właśnie ewolucja jest siłą napędową kształtującą otaczający nas świat, poczynając od poziomu pojedynczych cząsteczek, poprzez genotypy, fenotypy do populacji gatunków oraz wyższych grup taksonomicznych. Jest przyczyną, dla której różne fakty w biologii są takie a nie inne.

Wiek XX rozpoczął się wspaniałymi pracami Pasteura i Kocha z zakresu mikrobiologii koncentrującymi się na ludzkich patogenach bakteryjnych, wirusowych oraz grzybiczych. Rozwijały się szczegółowe badania ich właściwości. Pod koniec lat pięćdziesiątych pojawił się pogląd wyrażony dobitnie przez J. Monoda, że jeśli poznamy bakterię *Escherichia coli*, zrozumiemy biologię słonia. Odkrycie struktury DNA spowodowało wielkie zainteresowanie bakteriami, które wykorzystano jako narzędzie badawcze do stworzenia podstaw genetyki oraz poznania struktury składników komórkowych, a także do rozszyfrowania mechanizmów regulacji ekspresji genów. Pojawiły się nowe możliwości eksperymentalne zdobywania informacji niezbędnych do zrozumienia funkcjonowania złożonych cząsteczek i wyjaśnienia problemów biologicznych. Kamieniem węgielnym „rewolucji” w biologii była technika klonowania genów pozwalająca usuwać segment materiału genetycznego z jego normalnego otoczenia w genomie i replikować go z dużą wydajnością np. dla potrzeb badań strukturalnych, w nowym otoczeniu genetycznym. Pod koniec lat 70 rozwiązanie każdego poważnego problemu biologii molekularnej upatrywano w klonowaniu. W latach 90 metodą z wyboru było sekwencjonowanie. Obecnie wydaje się, że w przyszłości te prace wykonywane będą w dużych komercyjnych centrach naukowo-przemysłowych dysponujących najnowocześniejszymi technologiami. Częściowo taka sytuacja już ma miejsce.

U progu nowego millennium dostępne są olbrzymie, szybko rozwijające się bazy danych molekularnych, które stanowią dobre i nowoczesne narzędzie badawcze. Są one wielkim wyzwaniem dla bioinformatyki, która jest połączeniem biologii oraz matematyki, nauki o komputerach i inżynierii. Olbrzymie bazy danych oraz dostępność sekwencji kilkudziesięciu genomów, w tym człowieka, wprowadzają rewolucję również w metodologii nauk. Sugeruje się zarzucenie procedur formułowania hipotez i przyjęcie strategii zbierania jak największej liczby danych, poprzez notowanie ich w taki sposób, jak zostały ze-

¹Prof. dr hab. (mbarcisz@ibch.poznan.pl); ²Prof. dr hab. (jbarcisz@ibch.poznan.pl), Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Noskowskiego 12, 61-704 Poznań.

brane. Określenie „rewolucyjność w biologii” odnosi się również do powstawania nowych dyscyplin i ich zastosowań. Rewolucja ta widoczna jest szczególnie w naukach biomedycznych, inżynierii genetycznej i biotechnologii.

Można zastanawiać się, jakie problemy będą rozwiązywane w XXI wieku, w jaki sposób będą porozumiewali się uczeni, gdzie leży granica między rozwojem osobistym oraz zawodowym, jakie powstaną narzędzia badawcze, jakie normy etyczne będą obowiązywały oraz gdzie i w jaki sposób naukowcy zdobywać będą środki finansowe na badania. Szczególnie interesujące będą problemy pojawiające się na granicy człowiek-komputer, a także te dotyczące klonowania i genetyki, ekologii i licznych zagrożeń środowiskowych.

Intensywnie rozwijać się będą: biologia strukturalna, biologia rozwoju, badania genomów, ochrona zdrowia i rolnictwo określane jako genomika i proteomika funkcjonalna. Wiele nadziei wiąże się z klonowaniem wyższych organizmów, poznaniem mechanizmów starzenia, alternatywną medycyną, zapobieganiem powstawaniu nowotworów oraz rozwojem i funkcją mózgu. Wykorzystując osiągnięcia genetyki molekularnej oraz bazy nukleotydowych sekwencji genomowych rozwinię się antropologia molekularna, której celem jest uzyskanie nowych danych o historii człowieka i jego pochodzenia oraz poznanie przyczyn różnic między ludźmi oraz innymi organizmami.

Zastanawiając się, w jakim kierunku podąży biologia molekularna na początku następnego millenium, warto przywołać sugestie F. H. C. Cricka, współodkrywcy DNA, poczynione 30 lat temu. W 1969 przewidywał on szybki rozwój kompleksowych badań biologii komórki Eukaryota, nowoczesnych fizycznych i fizykochemicznych technik eksperymentalnych, mechanizmów ewolucji a także rozwój szybkich komputerów. Trafne były jego sugestie masowego rozwoju nauk biologicznych oraz zainteresowanie psychiką ludzką, a szczególnie mechanizmami jej sterowania. Z badań zdominowanych przez biologię wynika, że znacznie większy niż podejrzewamy wpływ na życie mogą mieć geny. Kilka lat temu J. Watson wyraził przekonanie, że los człowieka zapisany jest nie w gwiazdach a w genach. Potwierdzeniem tego są znajdowane coraz to nowe fragmenty DNA (geny) mające związek ze skłonnościami do chorób psychicznych. Są to przesłanki do powstania nowej dyscypliny psycho-socjobiologii. Będzie ona łączyła elementy biologii molekularnej, genetyki i neurologii z jednej strony oraz nauk społecznych z drugiej. W nadchodzących latach

zblizymy się do momentu, w którym (tak jak obecnie określane są predyspozycje do wielu chorób) będziemy mogli przewidywać zaburzenia umysłowe, przejawiające się agresje, zachowania antysocjalne i skłonności do popełniania przestępstw. Wiadomości, że genetyka może wyjaśniać, przewidywać, a nawet modyfikować zachowania ludzkie, podawane są nie tylko podczas sensacyjnych programów telewizyjnych, ale również przez najwybitniejszych uczonych. Nie wydaje się jednak aby na te pytania można było odpowiedzieć po zakończeniu sekwencjonowania genomu człowieka, które nastąpi w ciągu roku 2001.

Molekularna biologia zajmując się głównie genami oraz białkami pozostawiła na obrzeżu zainteresowań małe cząsteczki. Jednakże ostatnie odkrycia dotyczące komórkowej roli tlenu azotu a także anionorodnika nadtlenkowego ponownie zwróciły uwagę na ważną rolę związków niskocząsteczkowych, które mogą okazać się potencjalnymi lekami. Oczekiwania dotyczące nowych leków, a szczególnie drobnocząsteczkowych połączeń, są olbrzymie. Triumfy w tym względzie święcić będzie zapewne farmakogenomika, nowy dział medycyny, zajmujący się badaniem genetycznych uwarunkowań metabolizmu leku w organizmie. Niezależnie od olbrzymiego postępu w genomice, chemii kombinatorycznej, robotyzacji, przetwarzaniu danych oraz zaangażowaniu dużych środków finansowych, firmy farmaceutyczne nie posuwają się dużo szybciej niż poprzednio w odkrywaniu nowych leków. Aspiryna poznana w 1897, symbol XX wieku, szybko uznana została za panaceum na wszystko i wszędzie. Dziś jest to najpopularniejszy środek przeciwbólowy, przeciwgorączkowy i przeciwzapalny. Inny popularny i skuteczny lek o niewielkiej masie cząsteczkowej to cis-platyna mająca zastosowanie w leczeniu nowotworów. Projektowanie nowych leków wymaga znajomości struktury przestrzennej badanych białek, enzymów, kwasów nukleinowych i komórkowych receptorów powierzchniowych. Budowa przestrzenna biocząsteczek jest podstawą dla zrozumienia cząsteczek życia. Analizując specyfikę wiązania i właściwości cząsteczek poznajemy ich chemię, badając właściwości elektronowe i spektralne rozumiemy fizykę, a na podstawie roli spełnianej w systemach fizjologicznych odkrywamy nowe obszary biologii i medycyny.

Jednym z ważniejszych wyzwań biologii molekularnej w XXI wieku będzie poznanie mechanizmów starzenia. Jest to główny problem społeczny i ekonomiczny oraz wielka szansa dla nauki. Starzenie dotyczy wszystkich organizmów. Wydaje się, że jest to

proces, do którego ewolucja nie przygotowała ludzi. Można go nawet uznać za artefakt cywilizacyjny. Zadaniem biologii oprócz zgromadzenia podstawowej wiedzy o starzeniu i procesach z nim związanych jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, dlaczego stare komórki są bardziej podatne na choroby aniżeli młode.

Należy się spodziewać wielu sukcesów w poznaniu biologii oraz chorób człowieka. Będzie to możliwe poprzez nowe kierunki badań jak genomika, proteomika, terapia genowa, kombinatoryczne projektowanie leków. Większość genów powodujących choroby u człowieka będzie znana. Metody molekularne będą szeroko wykorzystywane do oceny ryzyka w zachorowaniach na cukrzycę, schizofrenię, otyłość i wiele innych schorzeń. W wielu przypadkach będzie można uniknąć chorób poprzez terapeutyczną interwencję.

Czy możliwe jest zrozumienie dużego podobieństwa sekwencji nukleotydowych DNA człowieka i innych Eukariontów? Czy istnieją geny człowieczeństwa? Możemy powtórzyć pytanie F. J a c o b a , co decyduje, że z zapłodnionego jaja powstaje mysz, mucha lub człowiek? Co decyduje o różnicach w rozwoju poszczególnych gatunków? Jak zrozumieć, że spotkanie jaja i zarodka ludzkiego inicjuje lawinową kaskadę następujących po sobie, nakładających się oraz krzyżujących reakcji chemicznych, które tworzą uporządkowane, niezwykle skomplikowane cykle reakcji i prowadzą do powstania człowieka? Ostatnie sukcesy w sekwencjonowaniu kilkunastu genomów (człowieka, drożdży, muszki owocowej, rzodkiewnika, nicienia i myszy) potwierdziły celowość poznania pierwszorzędowej struktury genomu określonego organizmu oraz ich dostępności w formie elektronicznej bazy danych.

Molekularna biologia realizowana pod koniec XX wieku w probówkach Eppendorfa i pipetach, będzie realizowana w przyszłości w komórce żywej oraz w układach żywych łącznie z transgenicznymi. Genomika, proteomika i bioinformatyka przesuwają swoje zainteresowania z pojedynczych komponentów komórkowych na całe organizmy i systemy. W najbliższym czasie wzrośnie zapotrzebowanie na nowe technologie umożliwiające badania struktury, funkcji i dynamiki multi-białkowych kompleksów jak np. kompleksy transkrypcyjne, a także metody pozwalające badać pojedyncze komórki lub ich agregaty w postaci zarodka. Oznacza to również badanie aktywności komórek oraz struktur komórkowych.

Pełne wyjaśnienie dowolnego faktu lub zjawiska jest limitowane dostępnością metod badawczych, które są niezbędne dla postępu nauki i służą do prze-

siewania prawdy. Jest to bardzo istotne, dlatego że w wyjaśnianie życia zaangażowanych jest wiele dyscyplin naukowych jak chemia i biochemia, matematyka i informatyka, fizyka i biofizyka molekularna. Narzędzia chemii, a w szczególności synteza chemiczna i metody spektroskopowe, miały kluczowy wpływ na rozwój biologii, od poznania struktury podwójnej helisy do chemicznej syntezy i struktury peptydów oraz oligonukleotydów. Lepsze wykorzystanie tych narzędzi otwiera w nadchodzącym millennium nieograniczone możliwości zrozumienia skomplikowanych systemów biologicznych na poziomie molekularnym, jak również otrzymywania związków posiadających nowe właściwości biologiczne, chemiczne i fizyczne.

Dotychczasowe technologie oparte o analizę pojedynczych genów, rozwiną się w kierunku bardziej skomplikowanych systemów, mega baz danych transkryptonów i proteomów. Inżynieria metaboliczna będzie rozwijała się wokół modyfikacji genów i swoistych oddziaływań dla osiągnięcia zmian fizjologicznych oraz do produkcji nowych cząsteczek. W przyszłości badania nad konsekwencjami wyłączenia lub ekspresji pojedynczego genu będą wymagały analizy zmian w ekspresji transkryptonu i proteomu.

Genom, transkrypton, proteom oraz bioinformatyczne metody ich analizy i klasyfikacji są bardzo potężnymi metodami badawczymi, nie uwzględniającymi jednak kinetycznych aspektów metabolizmu i fizjologii organizmów.

Modelowanie molekularne zostanie wykorzystane do projektowania małych cząsteczek silnie wiążących się do rozpoznawanej powierzchni białka i powodujących modyfikację jego właściwości. Technika selekcji *in vitro* w połączeniu z amplifikacją DNA, łańcuchową reakcją polimerazy, pozwala na wyodrębnienie ligandów DNA i RNA wiążących dowolne białko. Na pograniczu chemii i biologii znajdują się nadzieje i szanse wykorzystania kombinatoryki do wytwarzania nowych materiałów syntetycznych i nieorganicznych oraz do manipulacji szlakami metabolicznymi w żywych organizmach. Metody kombinatoryczne dały impuls do syntezy i szybkiej analizy dużych bibliotek związków organicznych i nieorganicznych jak np. katalizatory homogenne i heterogenne czy materiały termoelektryczne. Metody te pozwalają analizować zbiory (biblioteki) zawierających np. 10^{14} sekwencji kwasów nukleinowych w ciągu kilku tygodni. Rozwój kombinatorycznych algorytmów będzie pomocny w inżynierii genetycznej do produkcji antybiotyków i innych reagentów chemicznych.

Wiele naszych dotychczasowych informacji o metabolizmie komórkowym jest niepewnych, ponieważ pochodzi z badań rozbitych komórek, a przede wszystkim wyodrębnionych z nich składników. Dostępne techniki odwzorowania przy pomocy jądrowego rezonansu magnetycznego umożliwiają badania dróg metabolicznych w całych organizmach, ale nie pozwalają oglądać reakcji biochemicznych w komórce.

Zrozumienie mechanizmów życiowych wymaga wiedzy o kompleksowych kaskadach procesów chemicznych na poziomie molekularnym. Czynnikiem limitującym w zdobywaniu tej wiedzy jest możliwość wykonania analiz i pomiarów w mikroskopowym otoczeniu lub z próbkami w skali mikro. Wa-

runki te narzucają wysoką rozdzielczość liniową (1-100 nanometrów), czasową (1-1000 mikrosekund) oraz czułość w granicach femtomoli i poniżej. Ostatnie osiągnięcia w mikroskopii dają możliwość uzyskania rozdzielczości atomowej. Techniki mikrokolumnowego oraz elektroforetycznego rozdziału pozwalają rozdzielać skomplikowane mieszaniny wykorzystując detektory do wybiórczej analizy ligandów.

Wielkim wyzwaniem i nakazem będzie informacyjne sprzężenie zwrotne i współpraca między centrami akademickimi, medycznymi oraz firmami biotechnologicznymi. Konieczne jest wypracowanie pryncypiów w badaniach naukowych jak naukowa doskonałość, szeroka współpraca oraz otwartość.

Komentarz Redakcji

Artykuł Prof. Prof. Mirosławy i Jana Barciszewskich przedstawia opinię Autorów na temat wyzwań, jakie stają przed naukami przyrodniczymi na przełomie wieków. Redakcja „Postępów Biochemii” wyraża nadzieję, że stanie się on początkiem dyskusji na ten i podobne tematy. Zapraszamy do niej naszych Czytelników.

SPRAWOZDANIE

Z XXXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Poznań, 11-14 wrzesień 2000

W dniach 11-14 września 2000 roku obradował w Poznaniu XXXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego pod honorowym patronatem Przewodniczącego Komitetu Badań Naukowych prof. dr hab. Andrzeja Wiszniewskiego, Prezesa Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. Mirosława Mossakowskiego, prezydenta miasta Poznania Ryszarda Grobelnego, wojewody miasta Stanisława Tamma, marszałka województwa wielkopolskiego Stefana Mikołajczaka oraz wszystkich rektorów poznańskich uczelni.

W Zjeździe wzięło udział około 900 osób z kraju i zagranicy, w tym sześciu biochemików pochodzenia polskiego z Białorusi, których pobyt sfinansowało Stowarzyszenie „Wspólnota Polska”.

Wydawnictwami Zjazdu były: dwa komunikaty informujące o organizacji Zjazdu na bieżąco, Program Zjazdu, Lista Uczestników oraz Streszczenia referatów.

Obrady odbywały się w Centrum Kultury „Zamek” w samym centrum miasta w dniach 12-14 września, natomiast inauguracja Zjazdu odbyła się w pięknej, zabytkowej Auli Uniwersyteckiej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Wszystkich uczestników i zaproszonych gości powitali Przewodniczący Oddziału Poznańskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. dr hab. Witold Walerych oraz Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego XXXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego dr hab. Zofia Szweykowska-Kulińska. Następnie przedstawiciele władz miasta powitali zebranych uczestników Zjazdu. W imieniu JM Rektora UAM przywitał zebranych Prorektor ds. Nauki prof. dr hab. Bronisław Marciniak, Prezes Poznańskiego Oddziału Polskiej Akademii Nauk – prof. dr hab. Andrzej Legocki. Listy pozdrawiające i życzące owocnych obrad do uczestników Zjazdu nadesłali Przewodniczący Komitetu Badań Naukowych prof. dr hab. Andrzej Wiszniewski, Prezes Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. Mirosław Mossakowski oraz Rektor Akademii Wychowania Fizycznego prof. dr hab. Jerzy Smorawiński.

Następnie prof. dr hab. Jolanta Barańska, Przewodnicząca Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, omówiła biochemiczne wydarzenia oraz działalność Towarzystwa Biochemicznego, po czym przystąpiła do uroczystości wręczania nagród laureatom różnych konkursów. Nagrodę im. Prof. Jakuba Parnasa w konkursie za najlepszą pracę biochemiczną wykonaną w laboratoriach polskich otrzymał zespół w składzie: M.Prymakowska-Bossak, M.R.Przewłoka, J.Ślusarczyk, M.Kuraś, J.Lichota, B.Kiljanczyk i A.Jerzmanowski z Uniwersytetu Warszawskiego i Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za pracę „Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco” ogłoszoną w *Plant Cell* w 1999 roku, nr 11 str. 2317-2329. Następnie Pan dr Maciej Marlewski – przedstawiciel firmy Sigma-Aldrich wręczył profesorom Maciejowi Wiewiórowskiemu i Dawidowi Shugarowi nagrody za wybitne osiągnięcia w badaniach kwasów nukleinowych, przyznawane przez Sekcję Kwasów Nukleinowych Zarządu Głównego PTBioch i firmę Sigma-Aldrich. Nagrodę imienia Prof. Antoniego Dmochowskiego za podręcznik akademicki otrzymał zespół profesorów: P.Węgleński (redaktor) E.Bartnik, M.Chorąży, M.Fikus, W.Gajewski, W.Jachimczyk, A.Jerzmanowski, H.Krzanowska, B.Lipińska, W.Zagórski-Ostoja, K.Staroń, P.Stępień, S.Szala, A.Taylor, K.Taylor. Jest to podręcznik pt. „Genetyka molekularna” wydany przez PWN w 1998 roku. Ponadto, w ramach tego samego konkursu, przyznano wyróżnienie za podręcznik „Na pograniczu chemii i biologii” (tomy 1,2,3) wydany przez Wydawnictwo Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań 1998-1999. Redaktorami tego podręcznika są profesorowie: J.Barciszewski, W.T.Markiewicz, K.Ziemnicki. Nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł w kwartalniku „Postępy Biochemii” otrzymała dr Alicja Węgrzyn za artykuł przeglądowy pt. „Regulacja replikacji DNA bakteriofaga lambda i plazmidów lambda”, opublikowany w *Postęпах Biochemii* 45(1) 5-11 w roku 1999.

Uroczystości inauguracyjne uświetniła wykładem inauguracyjnym pt. „Jak związać koniec z końcem czyli *splicing* prekursorów mRNA” profesor Maria Konarska z Rockefeller University w Nowym Jorku.

W części artystycznej wystąpił chór kameralny pod dyrekcją Jacka Sykulskiego Nova Gaudia. Na zakończenie uroczystości inauguracyjnych wszyscy obecni przeszli do Sali Lustrzanej gdzie odbył się bankiet powitalny.

Ogólny program Zjazdu przewidywał wykłady plenarne każdego przedpołudnia, przeznaczone dla wszystkich uczestników. Wykłady te wygłosili: prof. dr hab. Damian Labuda z Montreal University, Kanada, prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski z Uniwersytetu Warszawskiego, dr Aleksandra Wodnar-Filipowicz z University Hospital Basel, Szwajcaria, prof. dr hab. Maciej Żylicz z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie oraz prof. dr Dierk Scheel z Institute of Plant Pathology, Halle, Niemcy. Po wykładach plenarnych odbywały się sesje specjalistyczne. Sesji było czternaście:

1. Organizacja materiału genetycznego
2. Replikacja i naprawa DNA
3. Struktura i funkcje RNA
4. Regulacja ekspresji genetycznej
5. Struktura, funkcje i modyfikacje białek
6. Błony komórkowe: sygnalizacja i bioenergetyka
7. Struktura i funkcje błon fotosyntetycznych
8. Diagnostyka genetyczna. Terapia genowa
9. Biotechnologia
10. Odpowiedź organizmów na czynniki biotyczne i abiotyczne
11. Biochemia żywności
12. Biochemia kliniczna oraz metabolizm wysiłkowy
13. Dydaktyka biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii
14. Sesja studencka

Warsztaty sesji 6.

Obrady były przeplatane przerwami na kawę, herbatę i obiady. Dodatkowo we wtorek i środę późnym popołudniem odbyły się sesje plakatowe. O dobrym poziomie wykładów w ramach sesji niech świadczy fakt, że sale były wypełnione po brzegi i wiele osób musiało stać, co jednak ich nie odstraszało i trwały dzielnie do końca sesji.

W trakcie Zjazdu zostały zorganizowane dwa kursy: „Praktyczne wykorzystanie produktów firmy Eppendorf w biologii molekularnej ze szczególnym uwzględnieniem reakcji PCR”, organizowany przez firmę Meranco i drugi „Mikroskopia konfokalna” organizowany przez firmę Olympus.

W ciągu trwania Zjazdu uczestnicy mieli okazję brać udział w spacerze z przewodnikiem po mieście Poznaniu, a po zakończeniu Zjazdu w dwóch wycieczkach: Szlakiem Piastowskim oraz do Kórnik i Rogalina.

W czasie Zjazdu przeprowadzono dwa konkursy. Konkurs im. Prof. Włodzimierza Mozołowskiego za najlepszą pracę przedstawioną na Zjeździe przez młodego biochemika (do 30-tego roku życia) odbył się pod przewodnictwem prof. Witolda Walerycha (Poznań).

Konkurs im. Janiny Opieńskiej-Blauth na najlepszą prezentację przedstawioną przez autora-studenta, który w momencie przysyłania streszczenia nie posiadał jeszcze dyplomu ukończenia studiów, odbył się pod przewodnictwem prof. T. Borkowskiego.

Wśród innych imprez towarzyszących dużym zainteresowaniem cieszyły się liczne wystawy firm oferujących na Zjeździe aparaturę i odczynniki. Inną atrakcją była uczta na dziedzińcu zamkowym (z pieczonymi dzikami), w której uczestnicy Zjazdu wzięli licznie udział.

W czwartek (14.09.2000) koło południa odbyła się uroczystość zakończenia Zjazdu. Pani Przewodnicząca Zarządu Głównego PTBioch, prof. Jolanta Barańska wręczyła nagrody dla młodych naukowców i studentów, dr Krzysztof Wypijewski wręczył nagrody studentom biorącym udział w sesji studenckiej. Nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego otrzymał dr Krzysztof Kobiela za komunikat pt. „Rola czynnika transkrypcji LEF-1 i β kateniny w różnicowaniu się przydatków skóry. Udział ścieżki sygnałowej WNT”. Ponadto wyróżnienia otrzymali M. Bobeszko, H. Czapińska, M. Golczak, A. Masny, M. Nawrot, M. Palczewska, M. Schmidt. Nagrodę w konkursie im. Janiny Opieńskiej-Blauth otrzymał Michał Kaszuba za pracę „Próba przeniesienia genu syntazy resweratrolowej z winorośli (*Vitis vinifera*) do pomidora (*Lycopersicon esculentum*)”. Dwa wyróżnienia w ramach tego konkursu otrzymali: Justyna Gołębiewska i Katarzyna Raczyńska. Nagrody Fundacji

UAM za najlepsze komunikaty studentów UAM otrzymali Małgorzata Sobiesiak, Anna Grała i Magdalena Kistowska. Przewodniczący poszczególnych sesji zjazdowych omówili przebieg naukowy spotkań. Pani Przewodnicząca zamknęła XXXVI Zjazd PTBioch, a koledzy z Uniwersytetu Toruńskiego zaprosili wszystkich uczestników Zjazdu poznańskiego do Torunia na wrzesień przyszłego roku, gdzie odbędzie się kolejny Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Na zakończenie sprawozdania chciałabym jeszcze raz gorąco podziękować wszystkim kolegom i koleżankom z Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM oraz kolegom i koleżankom z Poznańskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za ogromną pomoc i zaangażowanie w przygotowanie Zjazdu oraz za czuwanie nad jego sprawnym przebiegiem. Bez ich pomocy nie byłoby możliwe zorganizowanie tak dużego przedsięwzięcia.

Organizatorom XXXVI Zjazdu PTBioch w Toruniu życzę sprawnej organizacji i udanego Zjazdu.

Zofia Szweykowska-Kulińska

Sprawozdanie z III Konferencji Parnasowskiej

III Konferencja Parnasowska odbyła się w dniach 13-18 października 2000 r we Lwowie na Ukrainie. Konferencja im. Jakuba Karola Parnasa to spotkanie naukowców głównie obu krajów, zapoczątkowane w roku 1996 wspólnym działaniem Polskiego i Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego, odbywające się co dwa lata naprzemiennie w Polsce i na Ukrainie. Pierwsza Konferencja Parnasowska odbyła się we Lwowie (1996), a druga w Gdańsku (1998). Omawiana w sprawozdaniu III Konferencja Parnasowska zgromadziła ze strony polskiej 85 osób, a ze strony ukraińskiej wzięło w niej udział około 100 naukowców i dodatkowo liczna grupa studentów nie będących formalnymi uczestnikami spotkania. Tematyka Konferencji, podobnie jak poprzednich, dotyczyła problemów przekazywania informacji w komórce („Mechanisms of cellular signal transduction and communication”). Tematyka taka została uznana uprzednio jako priorytetowa. Sesja pierwsza dotyczyła udziału hormonów, cytokin i czynników wzrostu w komunikacji komórkowej. Otwierał ją, a tym samym całą Konferencję, wykład profesora Aleksandra Koja z Uniwersytetu Jagiellońskiego. W Sesji tej wygłoszono 10 wykładów, z tego 3 z Polski. Następna Sesja dotyczyła szlaków przekazywania sygnałów i w jej ramach wygłoszono 16 wykładów, z tego 7 z Polski. Kolejna, trzecia Sesja, dotyczyła roli wapnia, tlenu azotu i innych niskocząsteczkowych molekuł w procesach przekazywania informacji. W tej Sesji wygłoszono 11 wykładów, z tego 7 z Polski. Ostatnia Sesja dotyczyła genetycznych i molekularnych aspektów nowotworzenia i na 8 wygłoszonych wykładów 2 były prezentowane przez polskich naukowców. Ponadto przedstawiono 85 posterów.

W porównaniu do dwóch poprzednich, Konferencja obecna stała na równie wysokim poziomie merytorycznym i organizacyjnym. Szczególnie wiele trudu w jej organizację włożyli prof. Rostislav Stoika i dr Ludmiła Drobot z Instytutu Biochemii im. Palladina we Lwowie. Osoby przybyłe na Konferencję z Polski reprezentowały różne środowiska i szeroki przegląd wartościowych dokonań. Liczna grupa naukowców pochodziła z Warszawy, a także Wrocławia. Licznie także reprezentowany był Kraków, Gdańsk, Łódź i Lublin. Gorzów, Poznań, Katowice, Gliwice, Białystok i Szczecin reprezentowane były przez pojedyncze osoby. Ze strony ukraińskiej najliczniejszą grupę stanowili oczywiście naukowcy lwowscy, choć także liczna była grupa naukowców z Kijowa. Strona ukraińska zaprosiła również na Konferencję wielu zaprzyjaźnionych badaczy ukraińskich, pracujących w zachodnich laboratoriach.

Obrady, których poziom był wysoki, toczyły się w języku angielskim.

Wszystkie zajęcia odbywały się w pięknym gmachu przedwojennego kasyna oficerskiego. Raz wywieszono postery były do wglądu przez cały czas trwania Konferencji. Komisja Konkursowa, której przewodniczył profesor Nowak z Instytutu Amin Biogennych z Łodzi i w skład której wchodziła polscy i ukraińscy naukowcy, wyłoniła trzy młode osoby, które prezentowały najlepsze plakaty. Przyznano dwie pierwsze nagrody dla młodego naukowca z Ukrainy i z Polski oraz jedną drugą. Nagrody dostały następujące osoby: O. Ilnytska, Lwów, za pracę: O. Ilnytska, N. Igumentsewa, S. Kusen, L. Drobot „Comparative study of phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling in K562 cells induced to differentiation and apoptosis with tyrosine kinases inhibitors” oraz J.E. Sobiesiak-Mirska, M.J. Nałęcz, K.A. Nałęcz „Regulation of protein kinase C (PKC) activation by palmitoylcarnitine in neuroblastoma NB-2a cells” (nagrody pierwsze). Nagrodę drugą otrzymała O. Oleksyak, Lwów, za pracę: V. Barylka, N. Volod'ko, O. Oleksyak, V. Pyddubnyak, B. Bilnsky, D. Galitsky „TGF- β levels in ovarian cancer patients”. Należy dodać, że prócz dyplomu nagrody miały również charakter finansowy i wynosiły po 100 USD w przypadku dwóch pierwszych nagród i 50 USD w przypadku drugiej nagrody. Nagrody te były ufundowane przez Polską Sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN oraz Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN. Za pomoc finansową przy organizowaniu tej Konferencji pragniemy obu tym Instytucjom podziękować, a w szczególności wyrazić wdzięczność profesorowi Maciejowi J. Nałęczowi.

Ponadto stronie ukraińskiej przekazaliśmy 170 podręczników „Biochemii klinicznej” autorstwa S. Angielski, Z. Jakubowski i M. Dominiczak, wydanych w języku ukraińskim w 2000 roku w Polsce, jako dar Ministerstwa Zdrowia i Akademii Medycznej w Gdańsku. Podręczniki te otrzymał Rektor Instytutu Medycznego we Lwowie i Konsultant wojewódzki do spraw diagnostyki laboratoryjnej województwa lwowskiego.

Spotkanie charakteryzowało się niezwykle serdeczną atmosferą. W części socjalnej zwiedzaliśmy Lwów i Cmentarz Łyczakowski, słuchaliśmy muzyki organowej w kościele św. Marii Magdaleny, odbył się także bankiet i oficjalny obiad. Ostatniego dnia pobytu, wracając do Polski, odwiedziliśmy Truskawiec. Wydarzenia naukowe oraz wymienione powyżej towarzyskie, a także wspólny przejazd autokarami spowodowały, że organizowana przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne Konferencja Parnasowska zaczyna obrastać legendą. Jest pewne, że mieliśmy wiele okazji, aby się bliżej poznać, nawiązać przyjacielskie kontakty i zacieśnić już istniejące. Uważamy, że odbywające się co dwa lata Konferencje Parnasowskie przyczyniają się do zadzierzgnięcia owocnej współpracy polsko-ukraińskiej i służą najlepszemu interesowi zarówno nauki polskiej jak i polskiej racji stanu.

Następna, IV Konferencja Parnasowska, odbędzie się we Wrocławiu w roku 2002. Serdecznie na nią zapraszamy.

Za Komitet Organizacyjny III Konferencji Parnasowskiej
(polska strona, uczestnicząca w Konferencji)

Stefan Angielski
Małgorzata Balińska
Jolanta Barańska (Prezes PTBioch.)
Jerzy Duszyński
Janina Kwiatkowska-Korczak

Roczny spis treści tom 46, nr 1, 2, 3, 4, 2000

ARTYKUŁY

- Iwona Grądzka** — Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium 2
- Anna Płatek, Krzysztof Flis, Elżbieta Wyroba** — Czy komórki projektują własny genom 17
- Zdzisław Krawczyk, Katarzyna Lisowska** — Regulacja ekspresji genów szoku termicznego 24
- Anna Grzyb, Piotr Zięń, Marek Pilecki, Ryszard Szyszka** — Kwaśne białka rybosomowe i ich udział w regulacji translacji 38
- Renata Jaskuła-Sztul** — Polimorfizm enzymów detoksykacyjnych 50
- Marek Jasionowski, Zbigniew Grzonka, Leszek Łankiewicz** — Receptory sprzężone z białkami G (GPCR), metody badań oddziaływań ligand-receptor. 60
- Izabela Berdowska, Maciej Siewiński** — Rola katepsyn cysteinowych oraz ich inhibitorów w procesach fizjologicznych i nowotworowych 73
- Jadwiga Szczegielniak, Grażyna Muszyńska** — Kinazy białkowe zależne od jonów wapnia 85
- Małgorzata Reda, Grażyna Kłobus, Józef Buczek** — Budowa i sposoby regulacji reduktazy azotanowej 99
- Magdalena Boguta** — Priony u drożdży i grzybów nitkowatych 108
- Danuta Kwiatkowska, Janina Kwiatkowska-KorczaK** — Heterodimeryczne receptory jądrowe. I. Receptory witamin i hormonów . 115
- Janina Kwiatkowska-KorczaK, Danuta Kwiatkowska** — Heterodimeryczne receptory jądrowe. II. Regulacja przemiany kwasów tłuszczowych i steroidów 125
- Natalia Derebecka, Marcin Hołysz, Wiesław H. Trzeciak** — Geny syntaz tlenu azotu: struktura, regulacja ekspresji, produkty białkowe . 130
- Iwona Wojda** — Grupa kinaz białkowych CKI 140
- Iwona Wojda** — Kinaza białkowa CKII . . . 148
- Dorota Piękna** — Dehydrogenaza NADH kompleksu I łańcucha oddechowego. Podstawowe podjednostki kodowane przez genom jądrowy 154
- Michał Rurek** — Mitochondrialne geny podjednostek dehydrogenazy NADH kompleksu I łańcucha oddechowego. Redagowanie ich transkryptów 163
- Anna Kicińska** — Antyportery Na^+/H^+ w komórkach ssaczych 177
- Gracjan Michlewski, Włodzimierz Krzyżosiak** — Sekwencjonowanie genomu człowieka — dwa projekty badawcze 187
- Piotr Widlak** — Białka rozpoznające i wiążące się z uszkodzonym DNA; udział w mechanizmach naprawy DNA i kancerogenezie . . . 198
- Krzysztof Sobczak, Włodzimierz Krzyżosiak** — Rola struktury mRNA w inicjacji translacji u Eukaryota 207
- Aleksander Sochanik, Stanisław Szala** — Perspektywy wykorzystania syntetycznych wirusów w terapii genowej 219
- Anna Powolny, Hanna Jańska** — Wewnątrzkomórkowy transfer genów 227
- Dariusz M. Domański, Miłosz A. Faber** — Dendrymery — nie takie zwyczajne polimery 234
- Magdalena Waśniewska** — Współzależność funkcjonalna mitochondriów oraz siateczki śródplazmatycznej a sygnał wapniowy . . . 247
- Joanna Bandorowicz-Pikuła** — Aneksynopatie — choroby związane z nieprawidłowym poziomem aneksyn w komórkach 253

- Beata Smolarz, Janusz Błasiak, Andrzej Kulig** — Rola urokinazowego układu aktywacji plazminogenu w angiogenezie 261
- Marek Mirowski, Jacek Bartkowiak** — Mikroprocesory DNA w badaniach biomedycznych 272
- Dagmara Jakimowicz, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska** — Inicjacja replikacji chromosomu u Prokaryota i Eukaryota. 282
- Paweł Mackiewicz** — Organizacja i ewolucja genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* a problem sierocych otwartych ramek odczytu. 291
- Agata Konopińska, Magdalena Boguta** — Wzajemna regulacja translacji mitochondrialnej i translacji cytoplazmatycznej u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. 299
- Rafał Czajkowski, Tomasz Drewa, Dorota Olszewska, Alina Woźniak** — Zaburzenia kontroli fazy G1cyklu komórkowego podczas onkogenezy. 309
- Katarzyna Winiarska** — Glutation: niezwykle funkcje pospolitego tripeptydu 318
- Krystyna Dzierzbicka, Tomasz Rakowski, Aleksander M. Kołodziejczyk** — Tuftsyna — endogeny immunomodulator. 327
- Anna Filipek** — Czy kalcyklina, białko wiążące Ca^{2+} , pełni podobną funkcję jak kalmodulina?. 336
- Anna Paszkiewicz-Gadek, Andrzej Gindzieński** — Mucyna MUC1 i jej znaczenie w procesach nowotworzenia 342
- Mirosława Z. Barciszewska, Jan Barciszewski** — Biochemia w nowym millennium . . . 351

INNE

- Sprawozdania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego** 355

Indeks autorów prac przeglądowych, tom 46, 2000

B

- Bandorowicz-Pikuła J** — Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa
- Barciszewska M Z** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12, 61-704 Poznań,
- Barciszewski J** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, jbarcisz@ibch.poznan.pl
- Bartkowiak J** — Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Onkologii Akademii Medycznej, Częstochowska 8/10, 92-216 Łódź j.bartkowiak@pro.onet.pl
- Berdowska I** — Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu, Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław,
- Błasiak J** — Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, januszb@biol.uni.lodz.pl

- Boguta M** — Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, magda@ibbrain.ibb.waw.pl
- Buczek J** — Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki Uniwersytetu Wrocławskiego, Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

C

- Czajkowski R** — Katedra i Zakład Biologii, Akademia Medyczna im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Karłowicza 24, 85-992 Bydgoszcz, rczajkowski@pf.pl

D

- Derebecka N** — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Święcickiego 6, 60-781-Poznań
- Domański D M** — Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, dardom@biol.uni.lodz.pl

Drewa T – Katedra i Zakład Biologii, Akademia Medyczna im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Karłowicza 24, 85-992 Bydgoszcz

Dzierzbicka K — Katedra Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej, Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, kd@chem.pg.gda.pl

F

Faber M A — Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, mi-fab@biol.uni.lodz.pl

Filipek A — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa, anfil@nencki.gov.pl

Flis K — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biologii Komórki, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

G

Gindzieński A — Zakład Chemii Ogólnej i Organicznej Akademii Medycznej, Mickiewicza 2a, 15-222 Białystok

Grądzka I — Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Dorodna 16, 03-195 Warszawa

Grzonka Z — Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk, leszek@chemik.chem.univ.gda.pl

Grzyb A — Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Al. Krasnicka 102, 20-718 Lublin

H

Holysz M – Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Święcickiego 6, 60-781-Poznań

J

Jakimowicz D — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Zakład Mikrobiologii, Weigla 12, 53-114 Wrocław

Jańska H — Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, Tamka 2, 50-137 Wrocław, janska@bf.uni.wroc.pl

Jasionkowski M — Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk

Jaskuła-Sztul R — Zakład Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, sztulren@rose.man.poznan.pl

K

Kicińska A — Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Kłobus G — Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki Uniwersytetu Wrocławskiego, Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

Kolodziejczyk AM — Katedra Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej, Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Konopińska A — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Genetyki, Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Krawczyk Zdzisław — Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Zakład Biologii Nowotworów, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-104 Gliwice,

Krzyżosiak W — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Pracownia Genetyki Nowotworów, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, wlo-dkrzy@man.poznan.pl

Kulig A — Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

Kwiatkowska D — Zakład Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej, Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

Kwiatkowska-Korczak J — Zakład Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej, Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

L

Lisowska K — Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Zakład Biologii Nowotworów, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-104 Gliwice

Ł

Łankiewicz L - Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk

M

Mackiewicz P — Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, Zakład Genetyki, Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, pamac@angband.microb.uni.wroc.pl

Michlewski G — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Pracownia Genetyki Nowotworów, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Mirowski M — Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Biochemii IBSiB Akademii Medycznej, Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, mirowski@ich.pharm.am.lodz.pl

Muszyńska G — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

O

Olszewska D — Katedra i Zakład Biologii, Akademia Medyczna im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Karłowicza 24, 85-992 Bydgoszcz

P

Paszkiwicz-Gadek A — Zakład Chemii Ogólnej i Organicznej Akademii Medycznej, Mickiewicza 2a, 15-222 Białystok

Piękna D — Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, piekna@main.amu.edu.pl

Pilecki M — Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Al. Krasnicka 102, 20-718 Lublin

Platek A — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biologii Komórki, Pasteura 3, 02-093 Warszawa, platek@nenci.gov.pl

Powolny A — Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, Tamka 2, 50-137 Wrocław

R

Rakowski T — Katedra Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej, Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Reda M — Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki Uniwersytetu Wrocławskiego, Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

Rurek M — Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, rurek@main.amu.edu.pl

S

Siewiński M — Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu, Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

Smolarz B — Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Sobczak Krzysztof — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Pracownia Genetyki Nowotworów Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Sochanik A — Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

Szala S — Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice, ssszala@onkol.instonko.gliwice.pl

Szczegieliński J — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Szyszkowa R — Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Al. Krasnicka 102, 20-718 Lublin, szyszkowa@kul.lublin.pl

T

Trzeciak WH — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Święcickiego 6, 60-781-Poznań, trzeciak@mail.usoms.poznan.pl

W

Waśniewska M — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biochemii Komórki, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Widlak P — Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice, widlak@onkol.instonko.gliwice.pl

Winiarska K — Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, K.Winiarska@biol.uw.edu.pl

Wojda I — Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMCS, Akademicka 19, 20-033 Lublin, iwoda@biotop.umcs.lublin.pl

Woźniak A — Katedra i Zakład Biologii, Akademia Medyczna im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Karłowicza 24, 85-992 Bydgoszcz

Wyroba E — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biologii Komórki, Pasteura 3, 02-093 Warszawa, wyroba@nenci.gov.pl

Z

Zakrzewska-Czerwińska J — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirsza

felda PAN, Zakład Mikrobiologii, Weigla 12,
53-114 Wrocław, zakrzew@immuno.iitd.pa.
wroc.pl

Zień P — Katedra Biologii Molekularnej, Wydział
Matematyczno-Przyrodniczy, Katolicki Uniwer-
sytet Lubelski, Al. Krasnicka 102, 20-718 Lublin

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

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność 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 „Postęпах Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierzają 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 ółówkiem 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]. Odnośniki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), 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, str. 541-553
4. Deleij J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 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, str. 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 ółówkiem 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” (ółówkiem, 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 zabezpieczoną przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przelać na adres:

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

KOMUNIKAT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

W związku z reorganizacją banku obsługującego rachunek PTBioch prosimy o wnoszenie opłat za składki członkowskie na nasze nowe konto w PBK XIII Oddział Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jednocześnie uprzejmie informujemy, że decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego została zmieniona wysokość składki członkowskiej. Od roku 2001 wynosi ona:

dla Członków rzeczywistych	60.- zł
dla Członków studentów	30.- zł

Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską za 2001 rok, otrzymają **bezpłatną prenumeratę kwartalnika PTBioch „Postępy Biochemii”**.

Osoby, które już dokonały wpłaty za składkę lub prenumeratę na 2001 rok, prosimy o dopłacenie różnicy należności.

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa. Natomiast Członkowie-Emeryci nadal zwolnieni z opłacania składek członkowskich – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” – 20.- zł.

Zakłady- Instytuty płacą za prenumeratę w 2001 roku – 80.- zł

KOMUNIKAT

W związku z reorganizacją banku obsługującego rachunki Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prosimy o wnoszenie opłat za składki członkowskie i prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii” na nasze **NOWE KONTO** w PBK XIII O/Warszawa nr 11101053-411050000371

