

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 47, NR 1, 2001

| | |
|--|-----|
| Kazimierz Zakrzewski – wspomnienia | |
| Forma CCC DNA genomu HBV | 2 |
| Czynnik Sp1 | 10 |
| Struktura 70S | 19 |
| Rola białek Gre w transkrypcji | 30 |
| Rekombinacja homologiczna | 38 |
| Naprawa DNA w mitochondriach | 52 |
| Ubikwitynacja i endocytoza | 63 |
| Receptor estrogenowy β | 72 |
| Receptory HIV-1 w terapii AIDS | 80 |
| Rodzicielskie piętno genomowe | 87 |
| Nietypowo piętnowany gen | 98 |
| Dinukleozydopolifosforany | 105 |
| Genom ludzki 2001 | 114 |

Krajowa Nagroda Naukowa z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego 2000

Rada Naukowa Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu ustanowiła Krajową Nagrodę Naukową z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego.

Ideą nagrody jest wyróżnianie młodych naukowców zajmujących się genetyką roślin i promowanie osiągnięć będących rezultatem badań prowadzonych w warunkach krajowych laboratoriów.

Nagroda przyznawana jest od 1994 roku corocznie, przez Kapitułę Nagrody, za oryginalne prace badawcze udokumentowane publikacją w krajowym lub zagranicznym czasopiśmie w okresie ostatnich trzech lat, dotychczas nienagradzane.

W roku 2000 zostali wyróżnieni:

nagrodą I stopnia – dr MARCIN PRZEWŁOKA

(IBER UW, Warszawa) za „Prace nad nowymi funkcjami histonów roślinnych w procesach wytwarzania gamet”

nagrodą II stopnia – dr MARK SZKLARCZYK

(KGHiN AR, Kraków) za „Badania nad molekularnymi podstawami cytoplazmatycznej męskiej sterylności u marchwi”

Sponsorami funduszu nagród byli: Agencja Własności Rolnej Skarbu Państwa – Warszawa, Dom Handlowy Nauki – Poznań, PlantiCo Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Gołębiew – Głębiew /Kutno, PlantiCo Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze w Świątosławiu – Kruszyn, Poznańska Hodowla Roślin – Tulce k/Poznania, „Spójnia” Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Nochowo-Śrem



Z głębokim smutkiem
powiadamy naszych Czytelników, że
w dniu 18 grudnia 2000 roku zmarł w Warszawie
Profesor Kazimierz Zakrzewski
lekarz, biochemik i biotechnolog
uczony i społecznik
współorganizator i wieloletni Prezes
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

W imieniu społeczności biochemicznej pożegnała
Profesora prezes Towarzystwa prof. Jolanta Barańska.
W imieniu uczniów oraz Instytutu Hematologii
przemówił prof. Jerzy Kościelak

Profesor Kazimierz Zakrzewski

1918 – 2000

Kazimierz Zakrzewski urodził się 11 listopada 1918 roku w Warszawie. Studiował medycynę w Warszawie i we Lwowie, tam też uzyskał dyplom lekarza w roku 1941. Biochemią interesował się już podczas studiów i był wolontariuszem w Zakładzie Chemii Fizjologicznej profesora Stanisława Przyłęckiego w Warszawie, a później w Zakładzie Chemii Lekarskiej profesora Jakuba Karola Parnasa we Lwowie. W latach 1946 i 1947, jako stypendysta fundacji Rockefellera, Kazimierz Zakrzewski studiował w Londyńskiej Szkole Higieny i Medycyny Tropikalnej, potem w Zakładzie Biochemii Instytutu Listera w Londynie pod kierunkiem profesora Waltera T.J. Morgana, jednego z twórców współczesnej immunochemii. W latach późniejszych pracował okresowo w laboratoriach w Paryżu i w Nowym Jorku. W latach 1959-1960 był Sekretarzem Naukowym Komitetu ONZ do Badania Skutków Promieniowania.

Swą pracę zawodową rozpoczął Kazimierz Zakrzewski jako inspektor nadzoru przeciwdemicznego. Od 1948 do 1952 roku był asystentem i adiunktem w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego, gdzie doktoryzował się w 1949 roku. Stopień docenta otrzymał w roku 1954, a tytuł profesora w 1963 roku.

W 1951 roku zorganizował Zakład Biochemii w nowopowstającym Instytucie Hematologii, dokąd przeniósł się wraz ze współpracownikami, wówczas jeszcze studentami, i pracował tam przez 10 lat. W latach 1955-1973 był konsultantem w Wytwórni Surowic i Szczepionek, tam też zorganizował Centralne Laboratorium, którego został kierownikiem. Równocześnie, w okresie 1958-1961, był konsultantem w Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie. W latach 1961-1986 pracował w Instytucie Badań Jądrowych, początkowo w Zakładzie Radiobiologii na Żeraniu, następnie w oddziale Instytucie w Świerku jako kierownik Zakładu Radioimmunologii. Pracami Zakładu kierował do przejścia na

emeryturę w 1986 roku, pozostał jednak nadal czynny naukowo jako konsultant, a od 1988 roku dyrektor do spraw badawczo-rozwojowych przedsiębiorstwa innowacyjnego Bion w Puławach i Warszawie.

W swojej działalności naukowej profesor Kazimierz Zakrzewski zawsze ściśle łączył prace badawcze ze stosowanymi. Wśród tych ostatnich miał wiele trwałych osiągnięć, jak technologia produkcji dekstranu, ważnego w medycynie polowej środka krwiozastępczego.

Tematyka prac badawczych profesora Zakrzewskiego koncentrowała się głównie wokół zagadnień struktury i funkcji makromolekuł, a w szczególności tych, które biorą udział w zjawiskach homeostazy ustrojowej człowieka. Jego wczesne badania dotyczyły antygenów somatycznych drobnoustrojów, ich struktury i zmienności; późniejsze zaś antygenów komórek organizmów wyższych i antygenów indukowanych przez transformujące wirusy.

Badania właściwości fizykochemicznych białek krwi zaowocowały serią publikacji dotyczących głównie albuminy surowicy ludzkiej. W szczególności opisał On cechy strukturalne miejsc wiązania przez nie kwasów tłuszczowych, wykrył nieznany dotąd wariant albuminy ludzkiej oraz stechiometryczne kompleksy bakteryjnych aktywatorów z plazminogenem, opisał rolę grup tiolowych w strukturze ceruloplazminy. Szeroko rozbudował badania nad immunoglobulinami ludzi i zwierząt, metodyką ich izolowania, ruchliwością molekularną, restytucją natywnej struktury z rozdzielonych podjednostek, uzyskał wysokooczyszczone preparaty ludzkiej substancji grupowej A. Pod Jego kierunkiem opracowano szereg procedur oznaczania hormonów i markerów nowotworowych metodą radioimmunologiczną; znalazły one szerokie zastosowanie w polskim leczeniu. Stosując dzisiejsze nazewnictwo można profesora Zakrzewskiego określić jako prekursora biotechnologii medycznej.

Opublikowany dorobek profesora Zakrzewskiego liczy blisko 150 prac, do czego dodać należy patenty. Wiele z nich zyskało wyróżnienia środowiskowe i nagrody resortowe. Świetnie wykładał. Jego prelekcje i seminaria zawsze cieszyły się szczególnie wysoką frekwencją uczestników. Seminaria z zakresu biochemii i radiobiologii były na tak znakomitym poziomie, że gromadziły słuchaczy z kilku warszawskich instytutów. Efekty działalności dydaktycznej Profesora można wyrazić liczbą kilkunastu magistrów oraz kilkunastu doktorów nauk medycznych, biologicznych i chemicznych. Z Jego zakładów wyszło kilku doktorów habilitowanych, piastujących wysokie godności naukowe w kraju i zagranicą.

Profesor Kazimierz Zakrzewski był członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego od jego powstania w roku 1958, a w Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych od jej utworzenia w roku 1964. Zarówno w naszym Towarzystwie, jak i w Federacji uczestniczył w wielu komisjach specjalistycznych i pełnił funkcje prezesowskie. W roku 1960 został członkiem Nowojorskiej Akademii Nauk. Był członkiem wielu komitetów Polskiej Akademii Nauk, rad naukowych różnych instytutów, a także rad redakcyjnych czasopism krajowych i międzynarodowych.

Od początków działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Kazimierz Zakrzewski był członkiem Zarządu Głównego, kolejno jako skarbnik, wiceprezes, a od 1963 do 1967 roku jako prezes. W tym czasie powstały podstawy organizacyjne i pierwszy statut. Aby zapobiec „petryfikacji” Towarzystwa przyjęto wówczas, na wniosek profesora Zakrzewskiego, zakaz pełnienia we władzach tej samej funkcji dłużej niż przez dwie kadencje, z możliwością podjęcia

tej samej funkcji po kilkuletniej przerwie. Uchwalono, także na Jego wniosek, zasady corocznego odbywania ogólnokrajowych zjazdów Towarzystwa doceniając ich znaczenie szkoleniowe oraz integrujące środowisko biochemiczne. Przyjęto też zasadę corocznego przyznawania Nagrody im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w kraju oraz Nagrody im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł opublikowany w „Postęпах Biochemii”.

W latach sześćdziesiątych Towarzystwo zorganizowało dwa wielkie zjazdy biochemiczne, w czym decydującą rolę grał Kazimierz Zakrzewski. W 1963 roku odbył się w Łodzi I Kongres Biochemii Polskiej, w 1967 roku w Warszawie III Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych. Jako organizator tego zjazdu profesor Zakrzewski był wówczas prezesem Federacji. Chętnie i kompetentnie służył pomocą i radą organizatorom lokalnych i ogólnokrajowych zjazdów Towarzystwa. Inicjował i wspierał współpracę naszego Towarzystwa z pokrewnymi towarzystwami naukowymi.

W okresie 1980-1986 profesor Zakrzewski ponownie był przez dwie kadencje prezesem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Z Jego inicjatywy Towarzystwo przystąpiło do ogólnokrajowego porozumienia towarzystw naukowych. Zainicjowana wówczas przez porozumienie akcja zbierania podpisów pod apelem do Sejmu w sprawie stanu nauk przyrodniczych wywarła duże wrażenie.

Do ostatnich dni nie ustawał w swej działalności. Propozycje dotyczące niezbędnej modyfikacji statutu Towarzystwa konsultował z przedstawicielami Oddziałów. Mobilizował do współdziałania.

Zofia Zielińska

Wspomnienie o profesorze Zakrzewskim

Pisząc o profesorze Kazimierzu Zakrzewskim występuję w podwójnej roli jako jego uczeń i dyrektor naukowy Instytutu Hematologii w Warszawie, którego profesor był współorganizatorem. Moja znajomość z Nim datuje się od roku 1950, kiedy wraz z moim kolegą Krzysztofem Murawskim, obaj zainteresowani nową dyscypliną biochemią, zjawiliśmy się w naukowym kółku biochemicznym dla studentów medycyny przy Katedrze Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego. W następnym roku zabrał nas do nowotworzonego Instytutu Hematologii gdzie podjęliśmy pracę pod jego kierunkiem. Profesor Zakrzewski nas ukształtował i uczynił pracownikami naukowymi. Byliśmy pod wrażeniem jego silnej osobowości, szerokich horyzontów wiedzy, energii i zdolności organizacyjnych. Z trzech studentów medycyny, bo była z nami jeszcze Janka Malec, kilku chemiczek bez przygotowania naukowego i jednej lekarki utworzył dobrze pracujący zespół. Profesor Zakrzewski miał rozległe zainteresowania naukowe, ale jego ulubioną dziedziną były aplikacje, nowe leki i pomoc chorym. W kraju, który dopiero dźwigał się ze zniszczeń wojennych, w nowym instytucie bez tradycji naukowych, uruchomił na dużą skalę i przy pomocy nowoczesnych metod produkcję albumin, immunoglobulin, dekstranu oraz całego szeregu innych leków. Godnym podkreślenia jest fakt, że były one wtedy wytwarzane tylko w nielicznych krajach na świecie, Stanach Zjednoczonych, An-

glii i Szwecji. Wiele z nich produkuje się w Polsce do dziś według podobnej lub nieco tylko zmienionej technologii jak np. immunoglobuliny anty-D i anty-HBs. Były i inne osiągnięcia w tym dydaktyczne i organizacyjne których wszystkich nie sposób wymienić. Jestem pewien, że zdziałałby znacznie więcej w warunkach gospodarki rynkowej. Tym niemniej polska biochemia, hematologia i transfuzjologia zawdzięczają mu bardzo dużo. Wielu też pamięta Jego znakomite wykłady na różnych kongresach i zjazdach naukowych.

Prof. Zakrzewski był człowiekiem wybitnym ale i bezkompromisowym. Jeśli w coś wierzył to o swoje racje walczył do końca. Tę samą miarę przykładął do krytyki naukowej. I tu był bezkompromisowy. Był człowiekiem walki. Niestety nie mógł wygrać walki z nieuleczalną chorobą. W późniejszym okresie jego życia, gdy przestały już nas łączyć stosunki typu mentor-uczeń odkryłem, że był człowiekiem bardzo sympatycznym pod względem towarzyskim. Bardzo mile wspominamy z Krzysztofem Murawskim nasze spotkania z Kazikiem przy szklaneczce whisky na miłej rozmowie o nauce i nie tylko. Jego cierpienia i zmagania z ciężką i wyniszczającą chorobą głęboko nas poruszyły. Będziemy Go zawsze pamiętać jako naszego nauczyciela i kolegę.

Jerzy Kościelak

WYDAWCA

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

REDAKTOR SENIOR

Senior Editor
Zofia Zielińska
tel. 831-24-03

REDAKTOR NACZELNY

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

REDAKTORZY

Editors
KRYSTYNA GRZELAK
BARBARA HULANICKA
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
ANDRZEJ KASPRZAK
LILIANA KONARSKA
ANNA SZAKIEL
ADAM SZEWCZYK

BIURO REDAKCJI

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

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
EWA BARTNIK (Warszawa)
MAGDALENA BOGUTA
(Warszawa)
NADZIEJA DRELA (Warszawa)
WITOLD JACHYMCZYK
(Warszawa)
ARTUR JARMOŁOWSKI (Poznań)
ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK
(Warszawa)
WOJCIECH RODE (Warszawa)
EWA ŚIKORA (Warszawa)
EWA ŚLEDZIEWSKA-GÓJSKA
(Warszawa)
JACEK WOJCIEROWSKI (Lublin)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

| | |
|---|-----|
| Profesor Kazimierz Zakrzewski — Wspomnienia Professor Kazimierz Zakrzewski — Obituary | |
| CCC DNA — pośrednia forma replikacyjna genomu HBV CCC DNA — the intermediate replication form of HBV genome MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ | 2 |
| Czynnik transkrypcyjny SP1 Sp1 transcription factor MAŁGORZATA CZYŻ | 10 |
| Struktura rybosomu prokariotycznego Structure of procaryotic rybosome BEATA DUDZIŃSKA, TOMASZ TWARDOWSKI | 19 |
| Regulacja elongacji transkrypcji bakteryjnej Control of bacterial transcription elongation BEATA NOWICKA-SANS, KRYSZYNA I. WOLSKA | 30 |
| Naprawa DNA w komórkach ssaków: mechanizm rekombinacji DNA repair in mammalian cells: mechanisms of homologous re- combination ANDRZEJ TRZECIAK, JANUSZ BŁASIAK | 38 |
| Czy w mitochondriach działają skuteczne mechanizmy na- prawy DNA Mechanisms of DNA repair — are they effective in mitochondria? RYSZARD OLIŃSKI, MAREK JURGOVIK | 52 |
| Rola ligazy ubikwitynowo-białkowej Rsp5p w endocytozie białek błony komórkowej u drożdży Role of Rsp5p ubiquitin-protein ligase in endocytosis of plasma membrane proteins in yeast TERESA ŻOŁĄDEK, JOANNA KAMIŃSKA | 63 |
| Receptor estrogenowy β — budowa, regulacja i funkcja Estrogen receptor β — structure, regulation and function MARIA TKACZYK, KATARZYNA KALITA | 72 |
| Rola receptorów chemokin w procesie infekcji HIV i leczeniu AIDS Role of chemokine receptors in HIV infection and AIDS therapy PAWEŁ P. JAGODZIŃSKI | 80 |
| Rodzicielskie piętno genomowe w zespole Pradera-Williego Genomic imprinting in Prader-Willi syndrome AGNIESZKA SZPECHT-POTOCKA | 87 |
| Przyczyna zespołu Angelmana — nowe spojrzenie na mecha- nizm rodzicielskiego piętna genomowego The cause of Angelman syndrome — the new look on the me- chanism of genomic imprinting KATARZYNA BORG, AGNIESZKA SZPECHT-POTOCKA | 98 |
| Dinukleozydopolifosforany: występowanie, metabolizm i funkcja Dinucleoside polyphosphates: occurrence, metabolism and function MARLENA SZALATA | 105 |
| Nota — Genom ludzki 2001 Note — Human genom 2001 EWA BARTNIK | 114 |

CCC DNA — pośrednia forma replikacyjna genomu HBV

CCC DNA — the intermediate replication form of HBV genome

MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Cykl replikacyjny HBV
 - II-1. Powstawanie pregenomowego RNA
 - II-2. Proces odwrotnej transkrypcji
- III. Rola pośredniej formy replikacyjnej HBV — CCC DNA
 - III-1. CCC DNA w cyklu życiowym HBV
 - III-2. CCC DNA w mechanizmie przetrwania zakażenia
- IV. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: HBV— wirus zapalenia wątroby typu B; IFN α — interferon alfa; CCC DNA— forma kowalencyjnie zamkniętego, kolistego DNA (ang. *covalently closed circular DNA*)

I. Wstęp

Przewlekłe zapalenie wątroby, powstające na skutek nie wyeliminowania wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) przez zakażony organizm, znacznie zwiększa ryzyko rozwoju pierwotnego raka wątroby i marskości wątroby [1, 2]. Obecnie jedynym praktycznie stosowanym sposobem kontroli replikacji HBV jest hamowanie aktywności wirusowej polimerazy. W praktyce klinicznej realizowane jest to przez stosowanie interferonu alfa (IFN α) [3, 4] oraz analo-

Contents:

- I. Introduction
- II. Replication cycle of HBV
 - II-1. Pregenomic RNA formation
 - II-2. Process of reverse transcription
- III. The role of HBV intermediate replication form — CCC DNA
 - III-1. CCC DNA in life cycle of HBV
 - III-2. CCC DNA in the mechanism of infection persistence
- IV. Concluding remarks

gów nukleozydów takich jak famcyklowir [5] i lamiwudyna [6]. W wyniku stosowanej terapii dochodzi u części pacjentów do zahamowania procesu replikacji [7-9]. Zjawisku temu towarzyszy odpowiedź immunologiczna organizmu w postaci przeciwciał skierowanych przeciw antygenowi HBe, rzadziej serokonwersja w układzie HBs, obniżenie poziomu HBV DNA w surowicy. Jednak w wielu przypadkach, po zakończeniu leczenia, replikacja HBV zostaje wznowiona, co oznacza, że leczenie nie doprowadziło do całkowitej eliminacji wszystkich form wirusa z ustroju [10]. Tak więc podstawową wadą wymienionych czynników jest brak trwałej odpowiedzi na leczenie oraz pojawianie się szczepów opornych na stosowane czynniki [11, 12].

Badania prowadzone na zwierzęcych modelach wirusów hepatotropowych wskazują, że mechanizm przetrwania zakażenia może być bezpośrednio związany z formowaniem trwałych, kowalencyjnie zamkniętych, kolistych cząstek wirusowego DNA (forma CCC DNA), które mają możliwość migracji do jądra hepatocytu i „przeczekania” terapii przeciw-

Dr, Zakład Biochemii, IFiB Akademii Medycznej w Łodzi, 90-131 Łódź, ul. Lindleya 6, e-mail: msidor@psk2.am.lodz.pl

wirusowej [13]. Co więcej, pula CCC DNA magazynowana w jądrach zakażonych hepatocytów powiększa się, jeśli z jednej strony ograniczone zostaje wydzielanie wirionów na zewnątrz hepatocytu, z drugiej zaś nasila się wewnątrzkomórkowy szlak przekształceń, w wyniku którego dojrzałe cząstki nukleokapsydowe trafiają do jądra hepatocytu.

W podobny sposób może dochodzić do przetrwania zakażenia HBV u osób poddawanych terapii antywirusowej, która hamując sam proces replikacji, nie prowadzi do eliminacji wirusowego CCC DNA. Wydaje się, że skuteczność metod leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu B ograniczona jest głównie przez brak leków oddziałujących bezpośrednio na formę CCC wirusowego DNA.

W poniższym artykule prześledzimy dokładniej proces replikacji HBV ze szczególnym uwzględnieniem roli cząstek CCC DNA oraz przeanalizujemy jakie może być znaczenie formy CCC DNA w mechanizmie przetrwania zakażenia HBV w warunkach presji antywirusowej.

II. Cykl replikacyjny HBV

Swoistość gatunkowa HBV, który wywołuje zakażenie tylko u wyższych naczelnych [14], jego ścisły hepatotropizm oraz brak dostępnych modeli do badań *in vitro* ograniczały badania nad strategią replikacyjną tego wirusa. Dopiero odkrycie innych wirusów hepatotropowych, których gospodarzami są zwierzęta oraz wykorzystanie transfekowanych HBV komórek ludzkiego wątrobiaka [15, 16] doprowadziło do rozwoju wydajnych systemów umożliwiających badanie mechanizmu zakażenia i replikacji HBV.

Genom wirusa zapalenia wątroby typu B stanowi episomalne DNA o długości około 3200 pz [17]. Jak u wszystkich Hepadnawirusów genom [18] występujący w cząstkach infekcyjnych zbudowany jest z częściowo dwuniciowej, kolistej cząstki DNA. Unikalny sposób replikacji wirusów Hepadna odkryto dzięki wykazaniu obecności dużych ilości nici (-) wirusowego DNA niesparowanych z niemi (+) w zakażonych hepatocytach. Obecność takich form nie dawała się wyjaśnić w oparciu o klasyczny semikonserwatywny mechanizm replikacji. Dalsze badania prowadzone w latach 80-dziesiątych dowiodły, że proces replikacji Hepadnawirusów jest bardzo złożony i obejmuje tworzenie pregenomowego RNA, a następnie jego odwrotną transkrypcję [19], która rozpoczyna się w cytoplazmie komórek gospodarza a kończy wewnątrz wirusowego kapsydu (Ryc. 1).

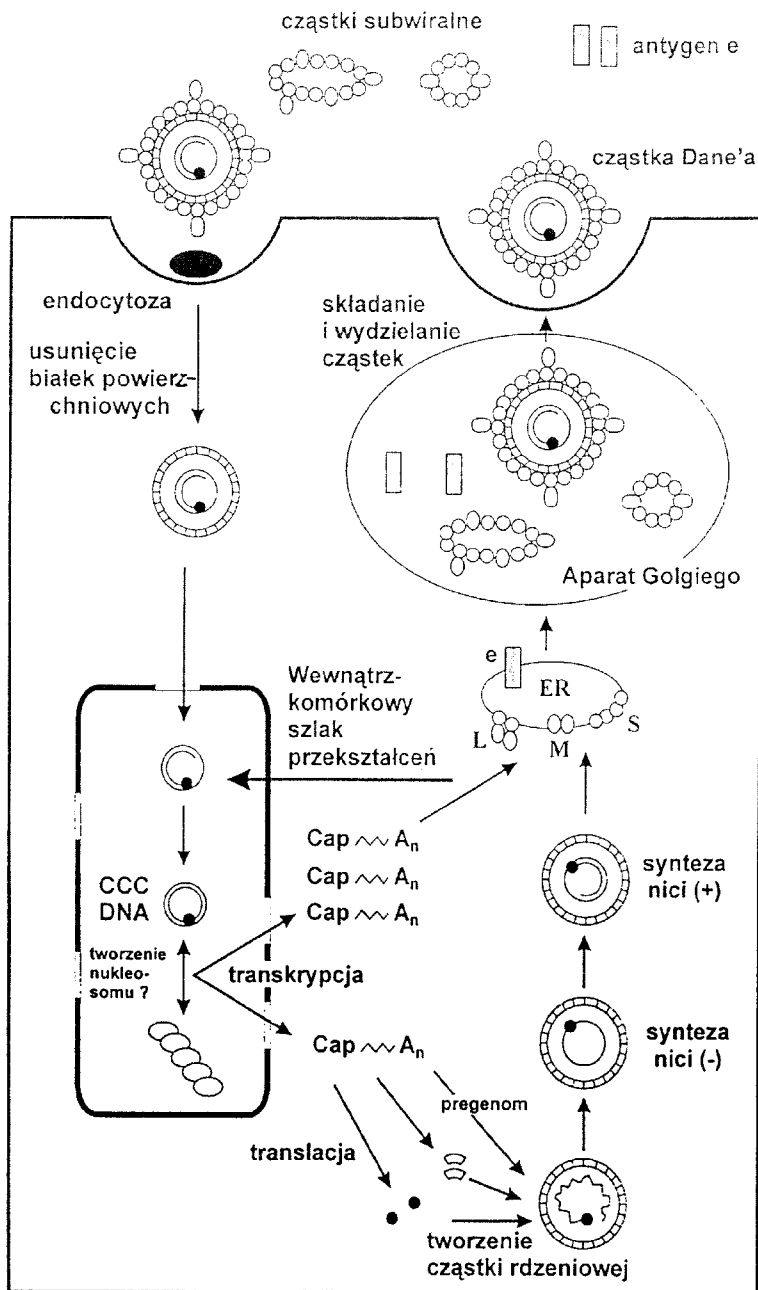
II-1. Powstawanie pregenomowego RNA

Tak jak w przypadku innych „opłaszczonych” wirusów wejście nukleokapsydu do cytosolu komórkowego uzależnione jest od połączenia otoczki wirusowej z błoną komórkową. HBV przyłącza się do hepatocytu poprzez specyficzny, niezidentyfikowany do tej pory [20] receptor w błonie hepatocytu, który rozpoznaje na powierzchni otoczki wirusowej fragment regionu preS1 (21-47 aa) powierzchniowego białka L [21, 22]. Dla DHBV wykazano bezpośrednią zależność zakaźności wirusa od obecności domeny preS1 [23]. Po wnikięciu do hepatocytu, HBV traci otoczkę glikoproteinową, a wirusowy genom, prawdopodobnie jeszcze w postaci nukleokapsydu [24], przedostaje się do jądra hepatocytu. Blokowanie interakcji pomiędzy HBV i błonowym receptorem komórkowym, a następnie blokowanie transportu genomu wirusowego do jądra hepatocytu mogą stać się po identyfikacji ich mechanizmu [25] podstawą nowej strategii antywirusowej.

Pierwszy etap replikacji następuje po oddzieleniu białek rdzeniowych. Asymetryczne cząstki wirusowego DNA (forma RC DNA) przekształcają się w kowalencyjnie zamknięte koliste cząstki DNA (forma CCC DNA). Proces ten zachodzi przez dobudowanie nici (+) na matrycy nici (-) dzięki aktywności polimerazy DNA zależnej od DNA. Po odłączeniu białka i oligorybonukleotydu (służących jako primeiry w procesie odwrotnej transkrypcji) następuje ligacja i kowalencyjne zamknięcie obu nici DNA [26]. Szybkość wbudowywania nukleotydów do niepełnej nici (+) DNA stała się podstawą pomiaru aktywności wirusowej polimerazy (pDNA) *in vitro* [27], metody która służy do oceny poziomu replikacji HBV [28].

Następnym etapem cyklu życiowego HBV jest transkrypcja CCC DNA. Ponieważ HBV wykorzystuje komórkową „maszynę transkrypcyjną”, łącznie z jądrowymi czynnikami transkrypcyjnymi oraz komórkową RNA polimerazą II, bardzo trudne jest na tym etapie zastosowanie czynników antywirusowych. Cztery główne wirusowe RNA transkrybowane na matrycy CCC DNA, posiadają zmodyfikowany koniec 5' (cap) oraz 3' (poliA), ale nie podlegają składaniu [29]. Wszystkie wirusowe promotory zlokalizowane są na jednej nici DNA, a wszystkie transkrypty są syntetyzowane w tym samym kierunku przez polimerazę RNA II [30]. Z jądra hepatocytu transkrypty kierowane są do cytoplazmy, gdzie stanowią matrycę do syntezy co najmniej siedmiu produktów białkowych genomu HBV.

Najdłuższy wirusowy transkrypt, inicjowany jest w promotorze rdzeniowym C. W trakcie jego syntezy



Ryc. 1. Schemat cyklu życiowego HBV od wniknięcia do hepatocytu, poprzez utworzenie pregenomowego RNA, proces odwrotnej transkrypcji aż do etapu wydzielenia nowego, dojrzałego wirionu.

polimeraza RNA „ignoruje” [30], w czasie „pierwszego czytania” matrycy, sygnał poliadenylacji położony w bezpośrednim sąsiedztwie promotora C, co prowadzi do powstania transkryptu o długości 3,5 kb, czyli przekraczającej jednostkową długość genu HBV. Transkrypt ten wykorzystywany jest jako matryca do replikacji genu (tzw. pregenomowe RNA) w procesie odwrotnej transkrypcji oraz jako mRNA do syntezy białka rdzeniowego c (HBcAg), antygeny e (HBeAg) oraz białka polimerazy (białko P) [31].

Transkrypty o długości 2,4 i 2,1 tys zasad kodują białka powierzchniowe (białka otoczki wirusowej) [32]. Najmniejszy wirusowy transkrypt o długości

0,9 kb. koduje białko X, które wykazuje własności aktywatora transkrypcji genów własnych jak i komórkowych [33, 34]. Białko X może okazać się dogodnym celem terapii antywirusowej, wykazano bowiem w badaniach prowadzonych na modelu zwierzęcym z WHV [35], że jest ono niezbędne do zainicjowania infekcji wirusowej *in vivo*.

Użycie antysensownych RNA skierowanych przeciw poszczególnym genom HBV rozważane jest jako środek hamujący transkrypcję i translację HBV, przy czym szczególne znaczenie może mieć tutaj antysensowne RNA jako czynnik zmniejszający ilość pregenomowego RNA. Oprócz działania antywirusowego, antysensowne RNA jest doskonałym narzędziem do

badania funkcji poszczególnych rejonów transkryptów HBV [36].

II-2. Proces odwrotnej transkrypcji

Po procesie translacji pozostające w cytoplazmie białka rdzeniowe i polimerazowe oddziałują specyficznie z pregenomowym RNA tworząc nukleokapsyd. Cząstki kapsydowe składają się z pregenomowego RNA połączonego z wirusową polimerazą i z 240 podjednostek białka rdzeniowego tworzącego zewnętrzną część kapsydu [37]. Za upakowanie RNA wewnątrz cząsteczki nukleokapsydowej odpowiedzialna jest występująca w RNA sekwencja nazywana epsilon (ϵ) [38, 39]. We wnętrzu utworzonych nukleokapsydów rozpoczyna się, niezależny od czynników pochodzących z cytoplazmy komórek gospodarza, proces odwrotnej transkrypcji.

Unikalną cechą odwrotnej transkrypcji HBV jest wykorzystanie reszty tyrozyny pochodzącej z N-końca wirusowej polimerazy jako startera w syntezie nici (-) DNA [40]. Utworzenie kowalencyjnego połączenia pomiędzy pierwszym deoksyrybonukleotydem a resztą tyrozyny [41] wymaga oddziaływania polimerazy ze stabilną II-rzędową strukturą pętli ϵ [42, 43]. Struktura ϵ obecna jest zarówno na 5' jak i 3' końcu pregenomowego RNA, ale specyficzna interakcja polimerazy, inicjująca proces odwrotnej transkrypcji, zachodzi z kopią zlokalizowaną na 5' końcu pregenomu. Sekwencja nukleotydowa zawarta w rejonie ϵ jest wykorzystywana jako matryca do syntezy 4 pierwszych nukleotydów nici minus DNA. Występowanie takiej sekwencji (UUAC) w rejonie epsilon, wykazano we wszystkich genomach ssaczych wirusów Hepadna [44].

W pierwszym etapie reakcji pomiędzy polimerazą, strukturą ϵ i nukleotydami dochodzi do kowalencyjnego połączenia reszty tyrozynowej z dGMP. W drugim etapie dobudowywane są kolejne trzy nukleotydy (Ryc. 2). Kompleks 4 nukleotydy + polimeraza oddysocjuje następnie od matrycy RNA przy 5' końcu i przyłącza się do komplementarnej sekwencji DR1 na 3' końcu pregenomu. Synteza DNA jest kontynuowana w kierunku 5' pregenomu. Wydłużanie nici (-) DNA w kierunku 5' pregenomu powoduje powstanie krótkiego nadmiarowego fragmentu końcowego o długości ok. 8 nukleotydów, który umożliwia prawdopodobnie „przeskok” wydłużającej się nici DNA. Równocześnie z wydłużaniem nici (-) DNA postępuje hydroliza matrycowego RNA dzięki aktywności RNA-zy H wirusowej polimerazy. Ograniczona hydroliza pregenomowego RNA prowadzi do pozostawienia na 5'-ko-

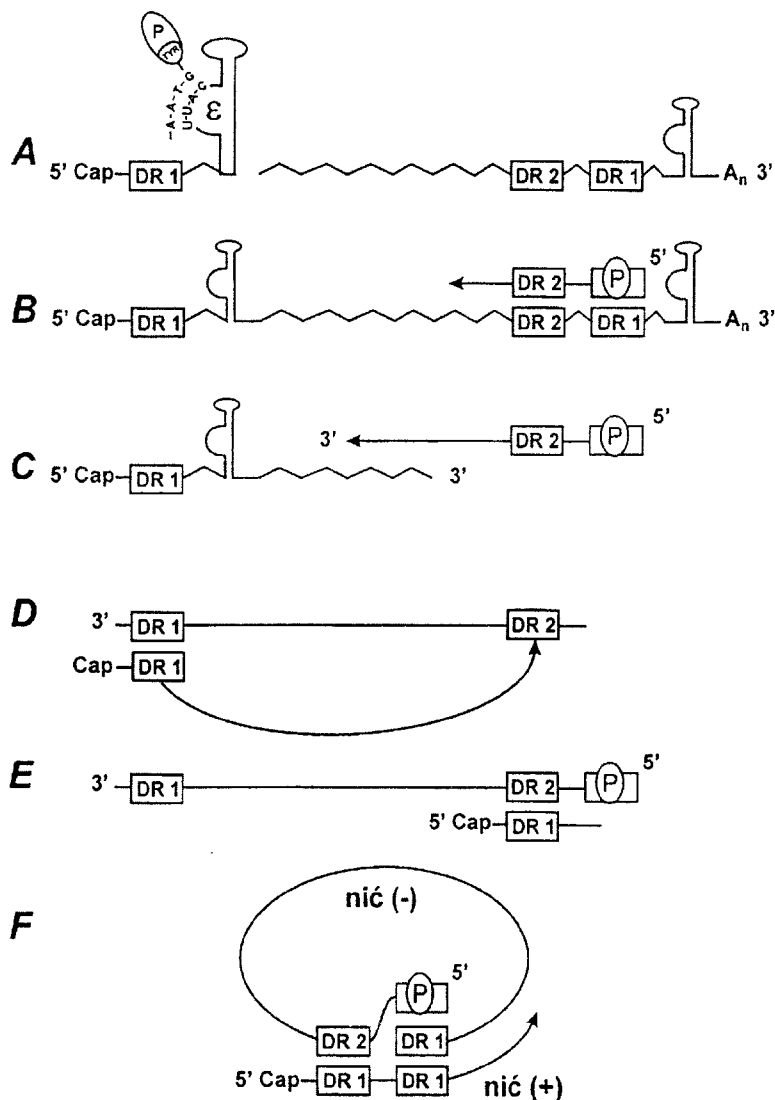
ńcu RNA 18-rybonukleotydowego fragmentu, który służy w następnym etapie jako primer do inicjacji syntezy nici (+) DNA [45]. Primer ten ulega translokacji z końca 3' nici DNA minus [46] do miejsca DR2 na 5' końcu nici minus DNA. Synteza nici plus postępuje od DR2 do końca 5' nici minus [29] na długości ok. 240 nukleotydów. Następnie na skutek wewnątrzcząsteczkowego „przełączenia” matrycy synteza kontynuowana jest na 3' końcu nici minus [47]. Liniowy DNA jest w ten sposób przekształcany w kolisty częściowo dwuniciowy. Specyficzną cechą procesu replikacji HBV, odpowiedzialną za unikalny charakter genomu jest więc zachodzące 3-krotnie w czasie jednego cyklu replikacyjnego „przełączania matrycy”: raz w trakcie syntezy nici minus [41, 44, 48] oraz dwa razy w trakcie syntezy nici plus [45, 47, 49].

Składanie wirionów (cząstek Dane'a) stanowi końcowy etap cyklu życiowego HBV. Białka powierzchniowe zawierają sekwencje sygnałowe, dzięki którym trafiają bezpośrednio po translacji do retikulum endoplazmatycznego [50]. Tam wiążą się one z dojrzałymi cząstkami nukleokapsydowymi i są wydzielane na zewnątrz hepatocytów przez konstytutywny szlak wydzielniczy [51]. Bezpośredni wpływ na morfogenezę cząstek HBV mają białka szoku cieplnego Hcs70, oddziałujące z powierzchniowym białkiem L [52]. Pozostała część białek powierzchniowych zbierana jest, a następnie wydzielana w postaci pustych, subwiralnych cząstek (HBsAg), których wysokie stężenia obserwuje się w surowicy zakażonych osób [53].

Poznanie mechanizmu formowania nukleokapsydu, a następnie opłaszczania i sekrecji cząstek wirusowych z zakażonego hepatocytu [54, 55] może stać się podstawą rozwinięcia metod hamowania tego złożonego procesu, a tym samym blokowania infekcji HBV.

III. Rola pośredniej formy replikacyjnej HBV-CCC DNA

W zakażonej cząstce wirusowej nici minus DNA, o długość ok. 3200 zasad, towarzyszy komplementarna nić plus, której długość stanowi 40-60% nici (-) DNA. Występowanie genomu wirusowego w tak niezwykłej, asymetrycznej formie wyjaśnić można ograniczoną podażą wolnych trifosforanów deoksynukleozydów wewnątrz nukleokapsydu podczas trwania procesu replikacji [56]. Ten niedobór wpływa hamująco na syntezę nici (+) DNA, prowadząc w efekcie do sekrecji wirionów wyposażonych w różnej długości nici (+). „Luka” w struktu-



Ryc. 2. Synteza nici DNA w cyklu replikacyjnym HBV: A, oddziaływanie wirusowej polimerazy (P) ze strukturą ϵ na 5' końcu pregenomowego RNA umożliwia utworzenie primera, składającego się z krótkiego oligonukleotydu połączonego z N-końcową resztą Tyr polimerazy; B, przeniesienie primera na komplementarną sekwencję DR1 na końcu 3' RNA, synteza nici (-) DNA odbywa się dzięki aktywności odwrotnej transkryptazy; C, wydłużanie nici (-) DNA z jednoczesną hydrolizą pregenomowego RNA (aktywność RNazy H); D, przeniesienie oligomeru RNA z 3' do komplementarnej sekwencji na 5' końcu nici (-) DNA; E, rozpoczęcie syntezy nici (+) wirusowego DNA; F, wydłużanie nici (+) DNA, utworzenie częściowo dwuniciowej, cyrkularnej struktury genomu charakterystycznej dla wirusów Hepadna.

rze genomu nie wywołuje żadnych konsekwencji w funkcjonowaniu genomu. Niemniej jednak do rozpoczęcia procesu replikacji niezbędne jest przekształcenie częściowo dwuniciowej kolistej formy genomu HBV (forma RC) w dwuniciową, kowalencyjnie zamkniętą kolistą formę DNA (CCC DNA).

Przekształcenie formy RC w formę CCC odbywa się bezpośrednio po wnikięciu genomu HBV do jądra hepatocytu. Synteza CCC DNA zachodzi dzięki aktywności wirusowej polimerazy DNA zależnej od DNA [26], choć nie wyklucza się udziału w tym procesie enzymów komórkowych [57]. Analiza cyklu replikacyjnego HBV sugeruje, że forma CCC DNA powstawać może w pierwszym etapie replikacji z wirionów, które wniknęły do hepatocytu z nowosyntetyzowanych cząstek nukleokapsydowych,

które poprzez wewnątrzkomórkowy szlak przekształceń kierowane są z cytoplazmy do jądra komórkowego. Obecność CCC DNA w surowicy sygnalizowana w pewnych doniesieniach [58] może być tłumaczona lizą hepatocytów następującą w wyniku ataku specyficznych cytotoksycznych komórek T [59]. Z drugiej strony na obecność formy CCC w surowicy wpływać może pozawątrobowa replikacja wirusa. Chociaż organem docelowym zakażenia HBV jest wątroba to w wielu badaniach wykazano obecność HBV DNA również w szpiku kostnym, śledzionie, nerkach, żołądku itd [60]. Nierozstrzygnięta pozostaje możliwość replikacji HBV w jednojądrzastych komórkach krwi (PBMC) [61, 62]. Ze względu na występujący przy zakażeniu HBV wysoki poziom wirerii we krwi, możliwe wydaje się przedostawa-

nie cząstek wirusa do tych komórek poprzez proces fagocytozy lub pinocytozy bez następującego po tym cyklu replikacyjnego [63].

III-1. CCC DNA w cyklu życiowym HBV

Forma CCC DNA odgrywa kluczową rolę w cyklu życiowym HBV jako jedyna matryca do syntezy wszystkich wirusowych transkryptów. Nie jest wykluczone, że aby do procesu transkrypcji doszło, wirus musi utworzyć strukturę nukleosomalną [64, 65], a następnie strukturę minichromosomu. Obecność takich złożonych struktur wykryto w jądrach kaczyc hepatocytów zakażonych przez DHBV [64]. Badania nad organizacją kompleksów CCC DNA z białkami w jądrze komórkowym ujawniły występowanie genomu DHBV w postaci minichromosomu złożonego z 20 nukleosomów. Jeżeli podobne kompleksy tworzone są przez genom HBV w ludzkich hepatocytach, to formowany minichromosom powinien składać się z 21 nukleosomów, ze względu na różnice w długości genomu HBV (jest o około 150 pzdłuższy od genomu DHBV). Dotychczasowe wyniki badań minichromosomów tworzonych w komórkach hepatoma zawierających zintegrowany genom HBV, wykazują obecność minichromosomów złożonych głównie z 18 nukleosomów [65].

Transkrypcyjna aktywność eukariotycznego jądrowego DNA jest zdeterminowana przez specyficzną organizację materiału genetycznego w postaci chromatyny i nie można wykluczyć, że także w przypadku genomu HBV odczytanie informacji genetycznej przez eukariotyczną RNA polimerazę II jest uwarunkowane przez nukleosomową „prezentację” CCC DNA w jądrach hepatocytów.

Podobna sytuacja występuje w przypadku cyklu replikacyjnego retrowirusów [66]. Dwuniciowe DNA, które powstaje z genomowego RNA w czasie odwrotnej transkrypcji retrowirusów nie stanowi substratu dla II polimerazy RNA gospodarza dopóki nie zostanie, dzięki działaniu integrazy wirusowej, włączone do genomu gospodarza (faza prowirusa).

Mimo że proces integracji HBV DNA lub jego części do ludzkiego DNA bardzo często towarzyszy przewlekłej postaci zakażenia HBV, to z pewnością proces ten nie stanowi niezbędnego etapu w cyklu życiowym wirusa. U żadnego z poznanych przedstawicieli hepadnawirusów nie stwierdzono obecności enzymów służących do integracji. Tworzenie minichromosomów przez hepadnawirusy może więc stanowić odpowiednik fazy integracji retrowirusów i bez którego nie możliwy jest proces transkrypcji genów wirusowych. Wyjaśnienie czy wirusowe CCC

DNA występuje w jądrach zakażonych hepatocytów w postaci kompleksów nukleosomalnych z białkami histonowymi i czy ich utworzenie jest niezbędnym etapem cyklu życiowego HBV stanowić może cenną wskazówkę w projektowaniu nowych strategii antywirusowych.

III-2. CCC DNA w mechanizmie przetrwania zakażenia

W czasie terapii antywirusowej dochodzi w wielu wypadkach do zahamowania procesu replikacji HBV. Jednak po zakończeniu leczenia u części pacjentów obserwuje się wznowienie replikacji wirusa. Trwałość i odporność cząstek CCC DNA zmagazynowanych w jądrach zakażonych hepatocytów może więc stanowić jeden z głównych powodów małej skuteczności terapii antywirusowej. Replikacja HBV zostaje ponownie „uruchomiona” poprzez produkcję wirusowego m-RNA na matrycy zgromadzonych w jądrach hepatocytów cząstek wirusowego CCC DNA.

Badania prowadzone na zwierzęcym modelu hepatotropowego wirusa zakażającego kaczki (DHBV), blisko „spokrewnionego” z ludzkim HBV wskazują, że wirusowa forma CCC DNA DHBV utrzymuje się mimo stosowania długotrwałej terapii zarówno z użyciem IFN α [67] jak i analogów nukleozydów [68]. Fakt ten można tłumaczyć dwojako. Po pierwsze w trakcie leczenia, na skutek obniżenia poziomu replikacji zmniejsza się ekspresja antygenów powierzchniowych wirusa, w tym preS1. Przy niedostatecznej podaży antygeny preS1, odpowiedzialnego za rozpoznanie specyficznego receptora na powierzchni hepatocytu, ograniczone zostaje tworzenie i wydzielanie nowych cząstek wirusowych na zewnątrz hepatocytu. W tej sytuacji nasila się wewnątrzkomórkowy szlak przekształceń [69], za sprawą którego nowotworzone cząstki nukleokapsydowe są ponownie kierowane do jądra komórkowego. Forma RC genomu wirusowego jest przekształcana w formę CCC DNA [13, 69]. W efekcie doprowadzić to może do zwiększenia ilości zmagazynowanych w jądrze hepatocytu cząstek CCC DNA, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu DNA HBV we krwi. W przypadku zakażenia DHBV, ilość CCC DNA w jądrze hepatocytu jest regulowana przez wirusowe białko preS1 [70] na zasadzie ujemnego sprzężenia. Wydaje się prawdopodobne, że wszelkie mutacje występujące w rejonie preS mające wpływ na ekspresję białka preS1 lub zmiany w jego budowie będą również wpływały na ilość CCC DNA „deponowanego” w jądrach zakażonych hepatocytów.

Utrzymywanie się formy CCC DNA w hepatocytach zależy od odporności tych cząstek na czynniki degradujące. Podtrzymywanie fizycznej i funkcjonalnej aktywności CCC DNA stwierdzone podczas wydłużonej terapii antywirusowej u kaczek zakażonych DHBV sugeruje, że cząstka CCC DHBV jest strukturalnie złożona, odporna na degradację i pozostaje funkcjonalna w postaci episomu przez długi okres [71]. Struktury wyższego rzędu (nukleosomy, minichromosomy) formowane przez genom wirusowy wykryto w przypadku innych wirusów takich jak: wirus Epsteina-Barra, wirus opryszczki czy wirus mozaiki kalafiorowej [72-74].

Nieznany jest do tej pory okres półtrwania cząstek CCC DNA w ludzkich hepatocytach. Nie wiadomo również jak szybko zachodzi rozpad wirusowego CCC DNA, kiedy na skutek zastosowanej terapii IFN α zostaje całkowicie zahamowana replikacja HBV oraz wewnątrzkomórkowy szlak przekształceń wirusowego DNA (formy RC w CCC). Wiele przesłanek wskazuje, że forma CCC wirusowego DNA ze względu na możliwość tworzenia nukleosomów jest bardzo odporna na działanie nukleaz czy czynników terapeutycznych przez co stanowić może w przypadkach niesprzyjających (np. terapia antywirusowa) formę „przetrwalnikową” wirusa [10].

Analiza roli formy CCC wirusowego DNA w cyklu życiowym HBV i mechanizmie przetrwania zakażenia wskazuje na znaczenie czynników terapeutycznych, które wpływały by na tworzenie i trwałość formy CCC DNA. W badaniach prowadzonych wykazano hamujące działanie na tworzenie CCC DNA interkalujących i nieinterkalujących inhibitorów topoizomerazy II oraz girazy [75, 76]. Podobne badania, wykonane *in vivo* na kaczym modelu zapalenia wątroby typu B, potwierdziły wpływ tych czynników na zmniejszanie ilości wirusowego CCC DNA, wykazując jednocześnie ich wysoką toksyczność [10].

IV. Uwagi końcowe

CCC DNA czyli kowalencyjnie zamknięte, kolistą cząstką genomu HBV powstają we wczesnym etapie cyklu replikacyjnego wirusa, a ich obecność jest charakterystyczna dla jąder komórkowych zakażonych hepatocytów. Badania prowadzone na zwierzęcych modelach wirusów hepatotropowych wskazują, że mechanizm przetrwania zakażenia może być bezpośrednio związany z formowaniem cząstek CCC DNA, które mają możliwość migracji do jądra hepatocytu i „przeczekania” terapii przeciwwirusowej. W podobny sposób może dochodzić do przetrwania zakażenia HBV u osób poddawanych

terapii antywirusowej, która hamując sam proces replikacji, nie prowadzi do eliminacji wirusowego CCC DNA.

Forma CCC DNA odgrywa kluczową rolę w cyklu życiowym HBV, gdyż jest jedyną matrycą do syntezy wszystkich wirusowych transkryptów łącznie z pregenomowym RNA. Tworzenie struktur wyższego rzędu przez wirusowe CCC DNA (nukleosomy, minichromosomy) stanowi prawdopodobnie „warunek konieczny” procesu transkrypcji, umożliwiając działanie polimerazy RNA II. Z drugiej strony obecność takich stabilnych struktur może zwiększać szansę przetrwania wirusa w organizmie w warunkach presji antywirusowej, prowadząc w efekcie do małej skuteczności stosowanych terapii.

Brak skutecznych czynników terapeutycznych oddziałujących bezpośrednio na formę CCC DNA jest w dalszym ciągu jednym z głównych ograniczeń w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu B. Wynika z tego, że terapia antywirusowa powinna zarówno blokować dostarczanie wewnątrzkomórkowych prekursorów potrzebnych do utworzenia cząstek CCC DNA przez zahamowanie replikacji wirusowej, jak i wpływać na destabilizację procesu formowania cząstek CCC DNA i na trwałość już istniejących. Pierwszy postulat realizowany jest obecnie przez stosowanie IFN α oraz analogów nukleozydów takich jak famcyklowir lub lamiwudyna. Bezpośredni wpływ na trwałość cząstek CCC DNA mają inhibitory topoizomeraz. Jednak kliniczna realizacja drugiego postulatu wydaje się być jeszcze odległa ze względu na silne efekty uboczne, które towarzyszą stosowaniu tych czynników. W najbliższej perspektywie badania interakcji formy CCC wirusowego DNA z białkami jądrowymi hepatocytów doprowadzić mogą do zaprojektowania nowej, skutecznej terapii przeciwwirusowej.

Podziękowanie

Powyższą pracę przygotowano w oparciu o projekt KBN nr 4.PO5A.15 oraz temat AM nr 502-11-491

Artykuł otrzymano 13 stycznia 2000 r.

Zaakceptowano do druku 30 października 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS (1981) *Lancet* 2 (8256): 1129-1133
2. Buendia MA (1992) *Semin Cancer Biol* 3 (5): 309-320
3. Di Bisceglie AM, Fong TL, Fried MW, Swain MG, Baker B, Korenman J, Bergasa NV, Waggoner JG, Park Y, Hoofnagle JH (1993) *Am J Gastroenterol* 88: 1887-1892

4. Mason WS (1993) *J Hepatol* 17 Suppl 3: S137-142
5. Shaw T, Amor P, Civitico G, Boyd M, Locarnini S (1994) *Antimicrob Agents Chemother* 38: 719-723
6. Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M (1995) *N Engl J Med* 333: 1657-1661
7. Lok AS (1994) *J Viral Hepat* 1: 105-124
8. Saracco G, Rizzetto M, Verme G (1994) *Antiviral Res* 24: 137-143
9. Liaw YF, Chien RN, Sheen IS, Lai MY, Chen DS (1995) *J Gastroenterol Hepatol* 10: 68
10. Luscombe CA, Locarnini SA (1996) *Viral Hepatitis Reviews* 2: 1-35
11. Zoulim F, Trepo C (1998) *J Hepatol* 29: 151-168
12. Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DLJ (1996) *Hepatology* 24: 714-717
13. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J (1986) *Cell* 47 (3): 451-460
14. Maynard JE, Berquist KR, Krushak DH, Purcell RH (1972) *Nature* 237: 514-515
15. Marion PL (1988) *Prog Med Virol* 35: 43-75
16. Sells MA, Chen ML, Acs G (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1005-1009
17. Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G, Murray K (1979) *Nature* 282: 575-579
18. Ganem D, Varmus HE (1987) *Annu Rev Biochem* 56: 651-693
19. Summers J, Mason WS (1982) *Cell* 29: 403-415
20. Budkowska A, Groh F, Maillard P, Possehl C, Pillot J (1996) *Mikrobiologia Medycyna* 4: 53-58
21. Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K (1986) *Cell* 46: 429-436
22. Pontisso P, Ruvoletto MG, Gerlich WH, Heermann KH, Bardini R, Alberti A (1989) *Virology* 173 (2): 522-530.
23. Klingmuller U, Schaller H (1993) *J Virol* 67: 7414-7422.
24. Eckart SG, Milich DR, McLachlan AD (1991) *J Virol* 65: 575-582.
25. Hantz O, Borel C, Trabaud C, Zoulim F, Dessolin J, Camplo M, Vlieghe P, Bouygues M, Trepo C, Kraus JL (1997) *Antimicrob Agents Chemother* 41 (11): 2579-2581
26. Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL, Robinson WS (1977) *J Virol* 21: 666-672
27. Kaplan PM, Gerin JL, Alter HJ (1974) *Nature* 249: 762-764
28. Loch T, Cianciara J (1992) *Pol Arch Med Wewn* 87: 345-51
29. Cattaneo R, Will H, Schaller H (1984) *EMBO J* 3 (9): 2191-2196
30. Yen TSB (1998) *Semin Virol* 8: 319-326
31. Schaller H, Fischer M (1991) *Curr Top Microbiol Immunol* 168: 21-39
32. Standring DN, Rutter WJ, Varmus HE, Ganem D (1984) *J Virol* 50 (2): 563-571
33. Twu JS, Robinson WS (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (6): 2046-2050
34. Sidorkiewicz M (1997) *Hepatology Polska* 4: 181-189
35. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C (1994) *J Virol* 68: 2026-2030.
36. zu Putlitz J, Wieland S, Blum HE, Wands JR (1998) *Gastroenterology* 115: 702-713.
37. Crowther RA, Kiselev NA, Bottecher B, Berri-man JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P (1994) *Cell* 77 (6): 943-950
38. Junker Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H (1990) *EMBO J* 9 (10): 3389-3396
39. Hirsch RC, Loeb DD, Pollack JR, Ganem D (1991) *J Virol* 65 (6): 3309-3316
40. Nassal M, Schaller H (1996) *J Viral Hepat* 3 (5): 217-226
41. Nassal M, Rieger A (1996) *J Virol* 70: 2764-2773
42. Pollack JR, Ganem D (1993) *J Virol* 67: 3254-3263
43. Knaus T, Nassal M (1993) *Nucleic Acids Res* 21: 3967-3975
44. Wang GH, Seeger C (1993) *J Virol* 67: 6507-6512
45. Lien JM, Aldrich CE, Mason WS (1986) *J Virol* 57 (1): 229-236
46. Loeb DD, Hirsch RC, Ganem D (1991) *EMBO J* 10 (11): 3533-3540
47. Loeb DD, Gulya KJ, Tian R (1997) *J Virol* 71 (1): 152-160
48. Tavis JE, Perri S, Ganem D (1994) *J Virol* 68: 3536-3543
49. Loeb DD, Tian R, Gulya KJ, Qualey AE (1998) *J Virol* 72 (8): 6565-6573
50. Eble BE, MacRae DR, Lingappa VR, Ganem D (1987) *Mol Cell Biol* 7: 3591-3601
51. Eble BE, Lingappa VR, Ganem D (1986) *Mol Cell Biol* 6 (5): 1454-1463
52. Prange R, Werr M, Loffler Mary H (1999) *Biol Chem* 380 (3): 305-314
53. Eble BE, Lingappa VR, Ganem D (1990) *J Virol* 64 (3): 1414-1419
54. Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G (1996) *Intervirol* 39: 23-31
55. Bruss V (1997) *J Virol* 71 (12): 9350-9357
56. Locarnini SA, Civitico GM, Newbold JE (1996) *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 7: 53-64
57. Kock J, Schlicht HJ (1993) *J Virol* 67: 4867-4874
58. Maillard P, Pillot J (1996) *Res Virol* 147: 5-16
59. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, Cavalli A, Petit MA, Fiaccadori F (1990) *J Immunol* 145: 3442-3449
60. Mason A, Wick M, White H, Perrillo R (1993) *Hepatology* 18: 781-789
61. Kock J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ (1996) *Hepatology* 23: 405-413
62. Repp R, Mance A, Keller C, Rhiel S, Gerlich WH, Lampert F (1992) *Arch Virol Suppl* 4: 50-53
63. Lamelin JP, Zoulim F, Trepo C (1995) *Int J Clin Lab Res* 25: 1-6
64. Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S (1995) *J Virol* 69 (6): 3350-3357
65. Bock CT, Schranz P, Schroder CH, Zentgraf H (1994) *Virus Genes* 8 (3): 215-229
66. Whitcomb JM, Hughes SH (1992) *Annu Rev Cell Biol* 8: 275-306
67. Yokosuka O, Omata M, Imazeki F, Okuda K, Summers J (1985) *Hepatology* 5 (5): 728-734
68. Wang Y, Bowden S, Shaw T, Civitico G, Qiao M, Locarnini S (1991) *Antivir Chem Chemother* 2: 107-114
69. Wu TT, Coates L, Aldrich CE, Summers J, Mason WS (1990) *Virology* 175 (1): 255-261
70. Lenhoff RJ, Summers J (1994) *J Virol* 68: 4565-4571
71. Mason WS, Cullen J, Saputelli J, Wu TT, Liu C, London WT, Lustbader E, Schaffer P, O'Connell AP, Fourel I, et al (1994) *Hepatology* 19 (2): 398-411
72. Deshmane SL, Fraser NW (1989) *J Virol* 63 (2): 943-947
73. Olszewski N, Hagen G, Guilfoyle TJ (1982) *Cell* 29 (2): 395-402
74. Shaw JE, Levinger LF, Carter CW, Jr (1979) *J Virol* 29 (2): 657-665
75. Civitico G, Wang YY, Luscombe C, Bishop N, Tachedjian G, Gust I, Locarnini S (1990) *J Med Virol* 31 (2): 90-97
76. Wang Y, Luscombe C, Bowden S, Shaw T, Locarnini S (1995) *Antimicrob Agents Chemother* 39 (2): 556-558

Czynnik transkrypcyjny Sp1

Sp1 transcription factor

MAŁGORZATA CZYŻ

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Sp1 i inne białka rodziny Sp/XKLF
 - II-1. Miejsca wiążące czynnik transkrypcyjny Sp1
 - II-2. Miejsca docelowe regulacji transkrypcji z udziałem Sp1
- III. Sp1 uczestniczy w regulacji ekspresji genów tkankowo-specyficznych
- IV. Sp1 a metylacja DNA
- V. Znaczenie fizjologiczne białka Sp1
- VI. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: AP-1 — czynnik transkrypcyjny, białko aktywatorowe 1 (ang. *activator protein 1*); AP-2rep — czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel będący represorem transkrypcji białka AP-2; BTEB1,2 — czynniki transkrypcyjne z rodziny Krüppel, białka wiążące podstawowy element transkrypcyjny 1,2 (ang. *basic transcription element binding protein 1,2*); CD11b — podjednostka receptora integrynowego; CD14 — podjednostka receptora integrynowego; C2H2 — rodzaj białkowej domeny wiążącej się z DNA, w której dwie cysteiny i dwie histydyny tworzą kompleks z jonami cynku czyli tzw. palec cynkowy; CPBP — czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel (ang. *core promoter binding protein*); C-koniec — koniec karboksylowy białka; CREB — czynnik transkrypcyjny, białko wiążące się z sekwencją CRE (ang. *cyclic AMP-responsive element binding protein*); CRSP — białko uczestniczące w aktywacji transkrypcji z udziałem czynnika transkrypcyjnego Sp1 (ang. *cofactor required for Sp1 activation*); CTC — sekwencja regulatorowa zawierająca kilkukrotne powtórzenie sekwencji: cytozyna-tymina-cytozyna (ang. *CTC repeats*); DNA — kwas deoksyrybonukleinowy; E2F — czynniki transkrypcyjne zaangażowane w kontrolę poziomu proliferacji (ang. *E2 factors*); EKLF — czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel znaleziony w komórkach erytrocytów; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*); EGR- α — czynnik transkrypcyjny, izoforma czynnika transkrypcyjnego TIEG1; Ets-1 — czynnik transkrypcyjny (ang. *E-twenty six virus*); FKLF — czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel znaleziony w komórkach płodowych (ang. *fetal*); GATA-1,-2,-3 — czynniki transkrypcyjne wiążące się z sekwencjami guanina-adenina-ty-

Contents:

- I. Introduction
- II. Sp1 and other proteins of Sp/XKLF family
 - II-1. Binding sites for Sp1
 - II-2. Target sites for Sp1 driven regulation of transcription
- III. Sp1 regulates expression of tissue-specific genes
- IV. Sp1 and DNA methylation
- V. Physiological function of Sp1 protein
- VI. Concluding remarks

mina-adenina (GATA) w regionach regulatorowych genów; GBF — czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel (ang. *GC-rich binding factor*); GC-box — sekwencja regulatorowa genu bogata w guaninę i tyminę zbliżona lub identyczna z sekwencją GGGGCGGG; GKLF — czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel znaleziony w komórkach nabłonkowych jelita (ang. *gut*); GT-box — sekwencja regulatorowa genu bogata w guaninę i tyminę zbliżona lub identyczna z sekwencją GGTGTGGGG; HeLa — linia ludzkich komórek nowotworowych pozyskana po raz pierwszy od p. Helen Lane; HL-60 — linia komórkowa ludzkich limfocytów; HNF4 — czynnik transkrypcyjny (ang. *hepatocyte nuclear factor 4*); *housekeeping genes* — określane terminem angielskim geny, których ekspresja daje białka niezbędne do utrzymania metabolizmu komórkowego np. geny kodujące białka rybosomalne czy enzymy cyklu Krebsa; IKLF — czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel znaleziony w jelicie (ang. *intestine*); K_d — stała dysocjacji; kD — masa cząsteczkowa wyrażona w kilodaltonach; KDR — kinaza tyrozynowa komórek śródbłonna (ang. *kinase domain receptor*); LKLF — czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel znaleziony w płucach (ang. *lung*); MeCP2 — białko wiążące się z fragmentami DNA zawierającymi zmetylowane cytozyny w sekwencji cytozyna-guanina (ang. *methyl-CpG binding protein*); MyoD — czynnik transkrypcyjny istotny w różnicowaniu fibroblastów w komórki mięśniowe; NF- κ B — czynnik transkrypcyjny (ang. *nuclear factor of kappa chain B cells*); N-koniec — koniec aminokwasowy białka; p53 — czynnik transkrypcyjny; PAI-1 — inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*); RNA — kwas rybonukleinowy; Sp1,2,3,4 — czynniki transkrypcyjne (ang. *specificity protein 1,2,3,4*); SV-40 — mały wirus 40 (ang. *simian virus 40*); TAF_{II} — podjednostka czynnika transkrypcyjnego TFIID (ang. *TBP-associated factor II*); TATA — sekwencja tymina-adenina-tymina-adenina w regionie promotorowym genu odpowiedzialna za wiązanie podjednostki TBP ogólnego czynnika

Dr, Zakład Chemii Ogólnej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź; e-mail: mczyk@psk2.am.lodz.pl

transkrypcyjnego TFIID; TBP — podjednostka czynnika transkrypcyjnego TFIID wiążąca się z sekwencją TATA (ang. *TATA binding protein*); TIEG1,2 — czynniki transkrypcyjne indukowane przez TGFβ; TFIID — ogólny czynnik transkrypcyjny, składnik kompleksu inicjującego transkrypcję z udziałem polimerazy RNA II (ang. *transcription factor II D*); TGFβ — transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor β*); UKLF - czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel (ang. *ubiquitous*); XKLF — czynniki transkrypcyjne podobne do czynnika Krüppel (ang. *Krüppel like factors*), literę X zastępuje pierwsza litera angielskiej nazwy tkanki lub organu, z którego dany czynnik został wyizolowany; Zf9 czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel (ang. *zinc finger9*); ZNF741 czynnik transkrypcyjny z rodziny Krüppel (ang. *zinc finger protein741*).

I. Wstęp

Ekspresja genów eukariotycznych wymaga złożonych mechanizmów kontroli. Istotną rolę w regulacji ekspresji genów odgrywają białka regulatorowe nazywane czynnikami transkrypcyjnymi. Jednym z pierwszych odkrytych czynników transkrypcyjnych było białko Sp1. Początkowo uznano je za konstytutywny czynnik transkrypcyjny wiążący się w regionach promotorowych genów z sekwencjami bogatymi w guaniny i cytozyny i odpowiedzialny za ekspresję na stałym poziomie genów kodujących białka niezbędne do utrzymania metabolizmu komórkowego (ang. *housekeeping genes*). Żadna część tej definicji nie wytrzymała próby czasu. Ponad 2600 publikacji przynosi informacje na temat struktury i funkcji białka Sp1. Wynika z nich, że chociaż obecny w każdej komórce, czynnik transkrypcyjny Sp1 odgrywa istotną rolę nie tylko w ekspresji genów transkrybowanych na stałym poziomie w każdej tkance, ale również genów tkankowo-specyficznych lub indukowanych w pewnych tylko warunkach fizjologicznych lub etapach rozwoju organizmu. Sp1 jest pierwszym odkrytym, ale nie jedynym białkiem, którego domena wiążąca DNA składa się z trzech palców cynkowych. Za pomocą drugiego i trzeciego palca wiąże się w regionach promotorowych z sekwencjami bogatymi w guaniny i cytozyny (ang. *GC-box*) lub guaniny i tyminy (ang. *GT-box*), ale wykazuje również duże powinowactwo do sekwencji zawierających powtórzenia cytozyna-tymina-cytozyna (ang. *CTC repeats*). Analiza publikacji dotyczących sposobu działania i biologicznych funkcji czynnika transkrypcyjnego Sp1 daje obraz złożoności mechanizmów regulacji transkrypcji.

II. Sp1 i inne białka rodziny Sp/XKLF

Sp1 (*Specificity protein 1*) został zidentyfikowany jako czynnik transkrypcyjny wiążący się w regionie

promotorowym wirusa SV40 [1, 2] oraz genu kodującego kinazę tymidynową [3]. cDNA białka Sp1 otrzymano z komórek HeLa [4]. Do chwili obecnej odkryto 15 czynników transkrypcyjnych spokrewnionych z białkiem Sp1 (Tabela 1). Objęto je wspólną nazwą czynniki transkrypcyjne Sp/XKLF. Każdy z nich zawiera co najmniej dwie odrębne domeny, z których jedna służy do wiązania się z DNA, druga do transaktywacji czyli do oddziaływania z innymi elementami aparatu transkrypcyjnego (Ryc. 1). Domena wiążąca się z DNA znajduje się w regionie C-końcowym cząsteczki i jest wspólnym elementem budowy wszystkich białek rodziny Sp/XKLF. Domena ta ma we wszystkich przypadkach tę samą długość i prawie identyczną sekwencję. Zawiera trzy palce cynkowe typu C2H2 (ang. *zinc fingers*), w których jon cynku tworzy kompleks z dwiema cysteinami i dwiema histydynami. W białkach Sp1, Sp3, Sp4, BTEB1, TIEG1 i TIEG2 w każdym z trzech palców cynkowych występują trójki identycznych aminokwasów, prawdopodobnie odpowiedzialne za kontakt z DNA: w pierwszym są to lizyna-histydyna-alanina (KHA), w drugim arginina-kwas glutaminowy-arginina (RER) i w trzecim palcu cynkowym arginina-histydyna-lizyna (RHK). Pomiędzy poszczególnymi białkami istnieją niewielkie różnice w sekwencji aminokwasowej elementów łączących palce cynkowe. Znaczne różnice w składzie aminokwasowym występują natomiast w środkowych i N-końcowych fragmentach cząsteczek czyli w domenach odpowiedzialnych za aktywację bądź represję transkrypcji. Philipsen i Suske [5] na podstawie tych różnic zaproponowali następującą klasyfikację:

- (i) czynniki transkrypcyjne Sp: Sp1, Sp2, Sp3 i Sp4 zawierające bogate w glutaminę regiony aktywujące transkrypcję;
- (ii) czynniki transkrypcyjne BTEB1, TIEG1 i TIEG2, których domeny represorowe bogate są w prolinę lub aminokwasy kwaśne;
- (iii) czynniki transkrypcyjne XKLF (ang. *Krüppel-like factors*): EKLF, GKLF, LKLF, IKLF, BKLF, UKLF, ZNF741, ZF9 i AP-2rep o bardzo zróżnicowanej budowie domen aktywujących i hamujących transkrypcję.

Białka Sp mają bardzo podobną strukturę (Ryc. 1). Podobnie rozmieszczone są domeny bogate w glutaminę i domeny serynowo-treoninowe. Sp2 różni się od pozostałych białek Sp jednym aminokwasem w pierwszym palcu cynkowym: histydyna jest zastąpiona przez leucynę. W każdej komórce obecne są czynnik transkrypcyjny Sp1 oraz przynajmniej jedna z trzech izoform czynnika transkrypcyjnego

Sp3. Białko Sp1 pełni rolę aktywatora transkrypcji, natomiast białko Sp3 może zarówno aktywować jak i hamować transkrypcję. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Sp4 jest ograniczona do kilku tkanek. Wysoki poziom tego białka stwierdzono w mózgu. Niewiele jest wiadomo na temat białka Sp2. Obecność regionu bogatego w glutaminę wskazuje na udział tego czynnika w aktywacji transkrypcji.

Czynnik transkrypcyjny BTEB1 (*basic transcription element binding protein 1*), zawierający krótką domenę bogatą w aminokwasy kwaśne, wiąże tzw. podstawowy element transkrypcyjny w promotorze genu kodującego cytochrom P-4501A1 [6]. Charakterystyczne dla obu białek TIEG, TIEG1 i TIEG2, są fragmenty bogate w prolinę chociaż czynnik transkrypcyjny TIEG2, poza domeną wiążącą DNA, jest

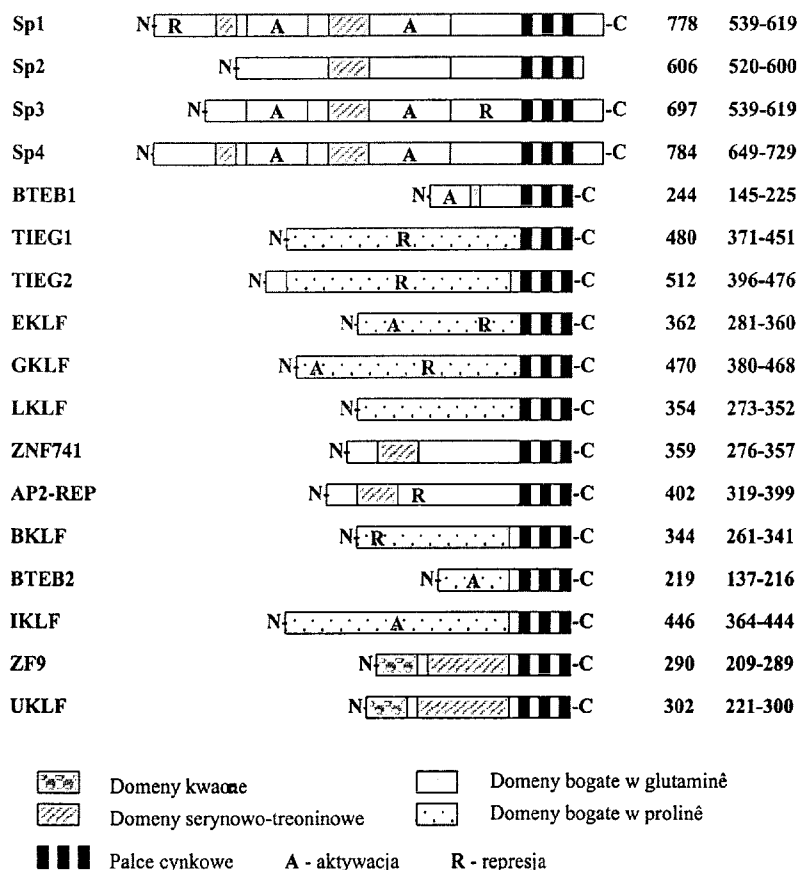
Tabela 1

Charakterystyka białek rodziny Sp/XKLF

| Czynnik transkrypcyjny | Numer w bazie danych | Lokalizacja w genomie | Miejsce ekspresji | Uwagi | Piśmiennictwo |
|------------------------|----------------------|-----------------------|--|---|---------------|
| Sp1 | J03133 | 12q13 | w każdej komórce | patrz Tabela 2 | 1-5, 26-91 |
| Sp2 | M97190 D28588 | 17q21.3-q22 | w liniach komórkowych; w tkankach nie stwierdzono | nie wiąże się z sekwencją GC; bogata w glutaminę domena aktywująca transkrypcję | 92 |
| Sp3 | X68560 S52144 | 2q31 | w każdej komórce | aktywator lub represor transkrypcji w zależności od typu komórki i sekwencji w promotorze; bogata w glutaminę domena aktywująca transkrypcję; trzy izoformy | 69-74, 93 |
| Sp4 | X68561 S50516 | 7p15.3-p21 | głównie w mózgu; także w nabłonkach, jądrze | bogata w glutaminę domena aktywująca transkrypcję | 94 |
| BTEB1 | D31716 | 9q13 | na poziomie mRNA w każdej komórce, na poziomie białka w wątrobie i mózgu | poziom białka regulowany potranskrypcyjnie; aktywuje ekspresję AP-2 α ; | 6 |
| TIEG1 | U21847 S82439 | 8q22.2 | wysoki poziom w osteoblastach, mięśniach i trzustce | N-koniec bogaty w prolinę; białko indukowane TGF β ; wysoka ekspresja wywołuje apoptozę w komórkach nabłonkowych trzustki; aktywator transkrypcji; hamuje syntezę DNA | 7-13 |
| TIEG2 | AF028008 | | w każdej komórce; wysoki poziom w trzustce i mięśniach | białko indukowane TGF β ; represor transkrypcji | 7, 11-13 |
| EKLF | U65404 | 19p13.2 | komórki erytroidalne | fosforylowany i acetylowany; N-koniec bogaty w prolinę; istotny dla ekspresji genu dla β -globiny | 14, 15 |
| GKLF | U70663 | 9q31 | jelito, łożysko, fibroblasty | negatywny regulator podziałów komórkowych w jelicie | 16 |
| LKLF | U25096 (mysi) | 19p13.11-p13.13 | płuca, naczynia krwionośne, komórki hematopoetyczne | istotny dla spoczynkowych komórek T | 18 |
| BKLF | U36340 (mysi) | | w każdej komórce; wysoki poziom w mózgu i komórkach hematopoetycznych | aktywator lub represor; kontrola na poziomie translacji; negatywny regulator podziałów komórek szpiku; oddziaływanie z represorem mCtBP2 | 20 |
| UKLF | AB015132 | 2q32 | w każdej komórce | aktywator transkrypcji | 25 |
| ZF9 | AB017493 | 10p15 | w każdej komórce; wysoki w łożysku, mięśniach, wątrobie i limfocytach | aktywator transkrypcji | 23, 24 |
| BTEB2 | D14520 | | łożysko, nabłonek jelita | wysoki poziom w proliferujących komórkach nabłonka jelita; aktywator transkrypcji | 22 |
| AP-2rep | Y14295 (mysi) | | mózg, nerka, wątroba, płuca | negatywny regulator ekspresji AP-2; podwyższony poziom podczas rozwoju nerki | 21 |

tylko w 44% podobny do białka TIEG1 [7]. TIEG1 (*TGFβ-inducible early gene*) został sklonowany w linii komórkowej ludzkich osteoblastów po stymulacji TGFβ [8]. Ten sam gen, ale z innego promotora ulega w linii komórek prostaty ekspresji zależnej od androgenów jako białko o nazwie EGRα [9]. TIEG1 różni się od EGRα zaledwie 11 aminokwasami w N-końcowym fragmencie cząsteczki [10]. Ekspresja czynników transkrypcyjnych TIEG ulega zwiększeniu w odpowiedzi na czynnik wzrostu TGFβ [11], EGF i estrogeny [12, 13].

sadowe (ang. *basic*) [20], AP-2rep jako represor transkrypcji białka AP-2 [21], BTEB2 od ang. *basic transcription element binding protein 2* [22], ZNF741 od ang. *zinc finger protein 741*, Zf9 od ang. *zinc finger protein 9* [23], również nazywany CPBP od ang. *core promoter binding protein* lub GBF od *GC-rich binding factor* [24]. To ostatnie białko jest bardzo podobne w swojej strukturze do UKLF (ang. *ubiquitous*) [25]. Na N-końcu znajdują się bogate w aminokwasy kwaśne domeny odpowiedzialne za transaktywację, przy czym sekwencja pierwszych



Ryc. 1. Cechy strukturalne białek rodziny Sp/XKLF. Czarne prostokąty oznaczają palce cynkowe; A — domenę białka odpowiedzialną za aktywację; R — za represję. Zaznaczono fragmenty cząsteczki z przewagą określonego typu aminokwasów. Wielkość białek podana po prawej stronie odpowiada liczbie aminokwasów w białkach ludzkich, za wyjątkiem LKLF, AP-rep, BKLF i IKLF, które dotyczą białek myszy. W ostatniej kolumnie podano pozycję palców cynkowych w cząsteczce białka.

Czynniki transkrypcyjne XKLF rozpoznane zostały jako białka specyficzne dla określonych tkanek. Nazwy większości z nich powstały przez zastąpienie litery X pierwszą literą angielskiej nazwy tkanki lub organu, z którego zostały wyizolowane. I tak: EKLF znaleziono w komórkach erytrocytów [14, 15], GKLF w komórkach nabłonkowych jelita (ang. *gut*) [16], IKLF w jelicie (ang. *intestine*) [17], LKLF w płucach (ang. *lung*) [18] lub FKLF w komórkach płodowych (ang. *fetal*) [19]. Nazwy pozostałych białek XKLF tworzone w różny sposób: BKLF ponieważ posiada N-końiec bogaty w aminokwasy za-

47 aminokwasów jest prawie identyczna w przypadku obu białek.

Z powyższego opisu wynika, że wszystkie białka Sp/XKLF posiadają prawie identyczne domeny wiążące się z DNA i różne domeny transaktywacji. Ponadto, część z omawianych czynników transkrypcyjnych np. Sp1, Sp3 czy UKLF to czynniki konstytutywne, obecne w każdej komórce. Inne, np. LKLF czy Sp4 są specyficzne dla określonych tkanek. Stwarza to możliwości wielopoziomowej regulacji transkrypcji z udziałem tych czynników. Z jednej strony określone zestawy czynników transkrypcyj-

nych, konstytutywnych i specyficznych, współzawodniczą o podobne miejsca wiązania w regionach regulatorowych genów. Z drugiej strony, „wygrywający” to współzawodnictwo czynnik transkrypcyjny za pośrednictwem charakterystycznej domeny transaktywacji może oddziaływać tylko z określonymi składnikami wielobiałkowego kompleksu transkrypcyjnego, uczestnicząc w aktywacji bądź hamowaniu transkrypcji danego genu.

cach od $4,1 \times 10^{-10}$ do $5,3 \times 10^{-10}$ [29]. O tym, który z czynników rodziny Sp/XKLF zostanie związany z promotorem danego genu decyduje rodzaj sekwencji DNA (element GC, element GT, powtórzenie CTC), jej dostępność wynikająca ze struktury chromatyny, sekwencje sąsiadujące z miejscem wiązania umożliwiające synergistyczne lub antagonistyczne oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, oraz poziom ekspresji danego białka regulatorowego

Tabela 2

Struktura białka Sp1

| Pozycja w sekwencji aminokwasowej | Budowa/funkcja | Piśmiennictwo |
|-----------------------------------|--|---------------|
| 57-162 | Domena A; bogata w glutaminę; konieczna do aktywacji synergistycznej | 33, 89 |
| 263-405 | Domena B; bogata w glutaminę; ważna dla multimeryzacji | 33 |
| 304-485 | Ważna dla bezpośredniego oddziaływania z białkiem Oct-1 | 90 |
| 471-537 | Ważna dla synergistycznego wiązania razem z SREBP-1 | 89 |
| 539-561 | Palec cynkowy 1 | |
| 569-591 | Palec cynkowy 2; odpowiedzialny za kontakt z DNA | |
| 599-619 | Palec cynkowy 3; odpowiedzialny za kontakt z DNA | |
| 612-678 | Region ulegający fosforylacji | 91 |
| 620-696 | Domena D; wymagana dla aktywacji synergistycznej | 89 |

Opracowano na podstawie informacji zawartych na stronach <http://transfac.gbf-braunschweig>

II-1. Miejsca wiążące czynnik Sp1

Regiony regulatorowe genów zawierają szereg sekwencji, które są miejscami wiążącymi specyficzne czynniki transkrypcyjne. Białka rodziny Sp/XKLF posiadając prawie identyczną domenę wiążącą DNA wykazują powinowactwo do podobnych sekwencji nukleotydowych. Czynniki transkrypcyjne Sp1 został rozpoznany najpierw jako białko wiążące sekwencję promotorową bogatą w guaninę tzw. element GC (GGGGCGGG) a później GT (GGTGTGGG). Stwierdzono, że białko Sp1, podobnie jak inne białka Sp ma większe powinowactwo do sekwencji GC niż GT [26]. Czynniki transkrypcyjne XKLF wykazują natomiast preferencje do sekwencji bogatych w GT [20, 25, 27]. Ostatnio ukazały się prace wskazujące, że oprócz sekwencji GC i GT również sekwencje zawierające powtórzenia CTC mogą być wiązane przez białko Sp1 i inne czynniki transkrypcyjne tej rodziny [28]. Wartość K_d kompleksu Sp1 z sekwencją CT-CCTCCTCCT wynosi $3,8 \times 10^{-10}$, natomiast kompleksu Sp3 z tą samą sekwencją wynosi $2,7 \times 10^{-10}$ [28]. Dla porównania, wartości K_d kompleksów Sp1 z sekwencjami bogatymi w GC mieszczą się w grani-

uwarunkowany przez swoiste przekaźniki wtórne. Dowodów na specyficzność promotorową dostarczyły m.in. doświadczenia z białkami EKLF i Sp1. Po fuzji z białkiem Gal4 czynnik transkrypcyjny EKLF aktywuje właściwy sobie promotor genu dla β -globiny znacznie wydajniej niż czynnik transkrypcyjny Sp1 [30].

II-2. Miejsca docelowe regulacji transkrypcji z udziałem Sp1

Każdy czynnik transkrypcyjny wiążący się w regionie regulatorowym genu oddziałuje pośrednio lub bezpośrednio z ogólnymi czynnikami transkrypcyjnymi towarzyszącymi polimerazie RNA II. Stwierdzono, że bogata w glutaminę domena aktywacyjna białka Sp1 wchodzi w interakcje z białkiem TAF_{II}, które jest podjednostką czynnika TFIID wiążącego się za pośrednictwem TBP (ang. *TATA binding protein*) z sekwencją TATA w regionie promotorowym genu [31]. Ponadto, Tj i a n i wsp. dowiedli, że aktywacja transkrypcji z udziałem Sp1 wymaga utworzenia kompleksu ze zbudowanym z dziewięciu podjednostek białkiem CRSP (ang. *cofactor*

required for *Sp1* activation) [32]. Nie wiadomo, z którymi elementami kompleksu inicjującego transkrypcję wchodzi w interakcje pozostałe białka rodziny Sp/XKLF. Na podstawie różnic w budowie N-końcowych regionów tych białek można oczekiwać różnic w sposobie oddziaływania z ogólnymi czynnikami transkrypcyjnymi, a więc i efektu końcowego: aktywacji, jej poziomu, bądź represji transkrypcji określonego genu.

III. Sp1 uczestniczy w regulacji ekspresji genów tkankowo-specyficznych

Rola białka Sp1 w regulacji ekspresji genów komórkowych i wirusowych jest dobrze udokumentowana [33]. W ciągu ostatnich kilku lat pojawiło się wiele prac wskazujących na istotny udział białka Sp1 w procesach takich jak proliferacja czy różnicowanie. Stwierdzono, że poprzez oddziaływanie z sekwencjami GC/GT czynnik transkrypcyjny Sp1 uczestniczy w regulacji szeregu procesów komórkowych od włączania genów tzw. *housekeeping* do włączania genów specyficznych dla określonych tkanek, od regulacji cyklu komórkowego do utrzymywania określonego wzoru metylacji DNA [34, 35]. Tak więc, chociaż obecny w każdej komórce, czynnik transkrypcyjny Sp1 może uczestniczyć w ekspresji genów specyficznych dla poszczególnych tkanek. Po pierwsze, odbywa się to poprzez zmiany w ilości białka Sp1 w jądrze komórkowym. Takie zmiany odnotowano np. w czasie różnicowania komórek układu krwiotwórczego, przy czym zmiany te były połączone z podwyższoną ekspresją określonych genów [36]. I tak, od poziomu białka Sp1 zależy m.in. specyficzna dla megakariocytów ekspresja podjednostek receptorów integrynowych: CD11b [37] i CD14 [38]. Poziom białka Sp1 i/lub jego aktywność może ulec podwyższeniu na skutek zwiększonej ekspresji onkogenów [39-41], czynników wzrostu [42-44] lub cytokin [45, 46]. Innym mechanizmem, poprzez który Sp1 uczestniczy w tkankowo-specyficznej ekspresji określonych genów, jest oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi, które są obecne tylko w pewnych typach tkanek. W przypadku ekspresji wielu genów obecność czynnika transkrypcyjnego Sp1 jest bowiem warunkiem koniecznym, ale niewystarczającym. Na przykład, gen receptora erytropoetyny ulega ekspresji w komórkach erytroidalnych, jeśli w jego regionie regulatorowym wiąże się czynnik Sp1 oraz specyficzny dla komórek erytroidalnych czynnik transkrypcyjny GATA-1 [47]. Oddziaływania tego rodzaju występują między Sp1 i następującymi czynnikami tran-

skrypcyjnymi: GATA-1 [36, 47, 48], GATA-2 i GATA-3 [48, 49], HNF4 [50], Ets-1 [51, 52], MyoD [53] oraz receptory estrogenowe [54]. Wykazano również, że białko Sp1 może oddziaływać synergistycznie z czynnikami transkrypcyjnymi pojawiającymi się w jądrze po zadziałaniu określonego bodźca. Takie interakcje obserwowano z czynnikami transkrypcyjnymi NF- κ B [55, 56] czy AP1 [57]. Transkrypcja z udziałem Sp1 może być także modulowana przez supresorowe białko Rb (retinoblastoma), które wiążąc inhibitor białka Sp1 o masie 20 kD (Sp1-I) uwalnia aktywne cząsteczki Sp1 [58]. Inne białko inhibitorowe uwalniane jest z kompleksu z czynnikiem Sp1 związanym z regionem promotorowym genu PAI-1, jeśli wzrośnie poziom glukozy w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych [59].

Zdolność białka Sp1 do wiązania z DNA i transaktywacji jest także modulowana poprzez modyfikacje potranslacyjne takie jak: glikozylacja [60, 61] czy fosforylacja [62, 63]. Fosforylacja białka Sp1 może zarówno wpływać na aktywność wiążącą DNA jak i na zdolność do transaktywacji [64-67]. Badania *in vitro* wykazały, że traktowanie ekstraktów jądrowych fosfatazą znacznie obniża aktywność wiążącą DNA wykazywaną przez białko Sp1 obecne w ekstraktach [62]. *In vivo*, w czasie ostatecznego różnicowania komórek wątroby, zdolność białka Sp1 do wiązania DNA maleje na skutek fosforylacji [65, 66]. Natomiast aktywacja kinazy białkowej A w komórkach HL-60 opornych na dokсорubicynę prowadzi do zwiększonej fosforylacji białka Sp1 i w konsekwencji do wzrostu aktywności wiążącej DNA i zdolności do transaktywacji [68]. Aktywność białka Sp1 może być również regulowana poprzez współzawodnictwo pomiędzy Sp1 i innym czynnikiem transkrypcyjnym o to samo miejsce wiązania w regionie promotorowym określonego genu. Na przykład, ekspresja kinazy tyrozynowej specyficznej dla komórek śródbłonna (KDR; ang. *kinase domain receptor*) jest indukowana przez wiązanie Sp1 i obniżana przez wiązanie izoformy białka Sp3 o aktywności represora z tą samą sekwencją nukleotydową w promotorze genu [69, 70]. Pozwala to na specyficzną dla komórek śródbłonna ekspresję KDR zależną od poziomu białka Sp1 [71], gdyż w komórkach śródbłonna stosunek Sp1/Sp3 jest znacznie wyższy niż w innych rodzajach komórek. W komórkach prekursorowych keratynocytów natomiast poziom Sp3 jest wyższy niż Sp1. W czasie różnicowania *in vitro* stosunek Sp3/Sp1 ulega odwróceniu [72] co sugerowałoby, że względna ilość białek Sp1 i Sp3 jest istotna dla ekspresji genów związanych z różnicowaniem. Zmiany

w poziomie białek Sp1 i Sp3 obserwowano również w komórkach mięśni hodowanych w warunkach niedotlenienia. Obniżenie zawartości tlenu powoduje spadek poziomu Sp3 przy niezmięnionej ilości białka Sp1 [73]. Stwierdzono, że spadek poziomu Sp3, a tym samym poziomu represji, uaktywnia geny kodujące enzymy glikolizy aktywne w warunkach niedotlenienia np. β -enolazę. Innym przykładem współzawodnictwa jest wiązanie poszczególnych białek rodziny Sp w różnych pozycjach regionu regulatorowego jednego genu. W promotorze genu dla podjednostki integrynowej β_5 znajdują się trzy miejsca wiążące białka Sp1 lub Sp3, każde o innej aktywności. Pierwsze z nich działa jak słaby wzmacniacz, drugie silnie aktywuje ekspresję, natomiast trzecie ją hamuje, przy czym udział każdego z tych miejsc wiązania Sp1/Sp3 w ekspresji genu β_5 zależy od rodzaju komórek [74].

Poza rolę białka Sp1 w regulacji transkrypcji szeregu prac wskazuje na potencjalny udział tego białka w regulacji cyklu komórkowego. Odnotowano bowiem oddziaływanie Sp1 z takimi białkami regulatorowymi jak p53 [75], retinoblastoma (Rb) [76-78] czy cykliny [79].

IV. Sp1 a metylacja DNA

Metylacja DNA w genomie ssaków występuje w pozycji 5 cytozyny głównie w sekwencji CpG. Czynniki transkrypcyjne, których miejsca wiązania zawierają przynajmniej jeden dinukleotyd CpG zostały podzielone na dwie grupy: wrażliwe i niewrażliwe na metylację. Podziału dokonano na podstawie zmian w powinowactwie do metylowanego DNA w porównaniu z DNA nie zawierającym grup metylo wych w cytozynie [80]. Do czynników wrażliwych na metylację zalicza się m.in. CREB [81] i E2F [82]. Białko Sp1 wydawało się być jednym z czynników transkrypcyjnych, których powinowactwo do DNA nie zmienia się nawet jeśli cytozyna w sekwencji CpG jest zmetylowana [83]. Clark i wsp. wykazali jednak, że w komórkach ssaków cytozyna może być metylowana w sekwencji CpNpG plazmidowego DNA [84]. Takie miejsca metylacji są obecne w regionach promotorowych genów eukariotycznych m.in. w jednym z miejsc wiążącym Sp1 (5'-CCGCC). Wykazano w badaniach *in vitro*, że metylacja typu ^mCp^mCpG hamuje wiązanie Sp1. Również z mniejszą wydajnością białko Sp1 wiąże się z DNA, który jest częścią struktur nukleosomalnych [85]. Nie wiadomo jednak, czy jest to spowodowane samą metylacją DNA czy też obecnością dużego kompleksu białkowego, w skład którego wchodzi

m.in. białko zwane MeCP2 (ang. *methyl-CpG binding protein*), które z kolei oddziałuje z deacetylazą histonu. Prowadzi to do wyciszenia ekspresji genów na poziomie chromatyny być może również dlatego, że ograniczony jest dostęp do miejsc wiązania Sp1 lub innych czynników transkrypcyjnych.

V. Znaczenie fizjologiczne białka Sp1

Zdecydowana większość regionów regulatorowych genów zawiera jedno lub więcej miejsc wiążących czynnik transkrypcyjny Sp1. Na przykład, spośród 12 scharakteryzowanych regionów regulatorowych podjednostek receptorów integrynowych tylko jedna, β_7 , nie posiada miejsca wiążącego Sp1 [86]. Biorąc pod uwagę jak wiele funkcji spełnia białko Sp1 uczestnicząc w aktywacji genów transkrybowanych w każdej komórce (ang. *housekeeping genes*) jak i specyficznych dla poszczególnych tkanek i faz różnicowania komórki, a także uczestnicząc w utrzymywaniu określonego wzoru metylacji DNA, można byłoby przypuszczać, że brak *Sp1* jest dla komórki mutacją letalną. Tymczasem stwierdzono, że zarodkowe komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*) pozbawione genu *Sp1* dzielą się normalnie i można wywołać ich różnicowanie podobnie jak komórek dzikich [87]. Sp1 jest jednak potrzebny dla normalnego rozwoju zarodkowego. Mysie zarodki pozbawione genu *Sp1* giną w 11 dniu ciąży. Wydaje się więc, że czynnik transkrypcyjny Sp1 jest niezbędny dla różnicujących się komórek po 10 dniu rozwoju zarodka. Niezależnie od poważnych defektów we wczesnym rozwoju zarodkowym stwierdzono, że ekspresja szeregu genów uważanych za aktywowane przez Sp1 występuje na normalnym poziomie. Jak dotąd udało się wykazać, że dwa geny transkrybowane są z mniejszą wydajnością w zarodkach pozbawionych *Sp1*. Są to geny kinazy tymidynowej i białka wiążącego zmetylowane CpG (MeCP2) [87]. Stwierdzono duże podobieństwa fenotypów zarodków z delecją genu *Sp1* i zarodków z delecją genu *MeCP2* [88]. Mogłoby to wskazywać na znaczący udział białka Sp1 w ekspresji MeCP2.

Doświadczenia z usuwaniem z genomu myszy genu kodującego białko Sp1 (ang. *knock-out experiments*) wykazały, że czynnik transkrypcyjny Sp1 nie jest konieczny dla ekspresji szeregu genów, których ekspresja w doświadczeniach opartych o transfekcje komórek wydawała się być zależna od obecności białka Sp1 w jądrze komórkowym. Być może inne białko z rodziny Sp/XKLF może chociaż częściowo kompensować brak Sp1. Dobrym kandydatem jest jedna z izoform białka Sp3 posiadająca zdolność ak-

tywacji transkrypcji. Ponadto, ponieważ delecja genu *Sp1* jest letalna w 11 dniu rozwoju zarodkowego, trudno jest na tej podstawie wnioskować o funkcji tego białka w całkowicie zróżnicowanych tkankach.

VI. Uwagi końcowe

Postęp badań w biochemii i biologii molekularnej wskazuje na złożoność procesów regulacyjnych odpowiedzialnych za ekspresję genów eukariotycznych. Od badań, które koncentrowały się głównie wokół aktywności genów na poziomie interakcji DNA-czynniki transkrypcyjne przechodzi się do stosowania biologii strukturalnej w celu definiowania wielobiałkowych kompleksów. Istotnym stało się nie tylko gromadzenie informacji o obecności specyficznych białek regulatorowych, ale również poznanie związków pomiędzy poszczególnymi składnikami kompleksów białkowych w inicjacji i elongacji transkrypcji. Wiele elementów maszynierii białkowej zaangażowanej w ekspresję genów zbudowanych jest z domen o różnych aktywnościach, a więc muszą być one rozpatrywane z jednej strony jako białka posiadające powinowactwo do określonych sekwencji DNA, z drugiej strony jako czynniki posiadające zdolność wchodzenia w interakcje z innymi białkami jądrowymi. Wzrost zainteresowania funkcją chromatyny jako całością w ekspresji genów oraz szybki rozwój nowych technik typu „DNA *microchip arrays*”, powinny przynieść odpowiedzi na wiele nierozstrzygniętych dotąd pytań.

Podziękowanie

Autorka dziękuje prof. dr hab. Markowi Gniazdowskiemu za uwagi dotyczące przygotowywanego artykułu.

Praca finansowana z grantu nr 4 PO5F 021 19 z Komitetu Badań Naukowych.

Artykuł otrzymano 12 października 2000 r.

Zaakceptowano do druku 28 grudnia 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Dynan W S, Tjian R (1983) *Cell* 35: 79-87
2. Gidoni D, Dynan W S, Tjian R (1984) *Nature* 312: 409-413
3. Jones K A, Yamamoto K R, Tjian R (1985) *Cell* 42: 559-572
4. Kadonaga J T, Carner K R, Masiarz F R, Tjian R (1987) *Cell* 51: 1079-1090
5. Philipsen S, Susk G (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 2991-3000
6. Imataka H, Sogawa K, Yasumoto K, Kikuchi Y, Sasano K, Kobayashi A, Hayami M, Fujii-Kuriyama Y (1992) *EMBO J* 11: 3663-3671
7. Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R (1998) *J Biol Chem* 273: 25929-25936
8. Subramaniam M, Harris S A, Oursler MJ, Rasmussen K, Riggs B L, Spelsberg T C (1995) *Nucleic Acids Res* 23: 4907-4912
9. Blok L J, Kumar M V, Tindall D J (1995) *Prostate* 26: 213-224
10. Fautsch M P, Vrabel A, Subramaniam M, Hefferen T E, Spelsberg T C, Wieben E D (1998) *Genomics* 51: 408-416
11. Yajima S, Lammers C H, Lee S H, Hara Y, Mizumo K, Mouradian M M (1997) *J Neurosci* 17: 8657-8666
12. Blok L J, Grossmann M E, Perry J E, Tindall D J (1995) *Mol Endocrinol* 9: 1610-1620
13. Tau K R, Hefferen T E, Waters K M, Robinson J A, Subramaniam M, Riggs B L, Spelsberg T C (1998) *Endocrinology* 139: 1346-1353
14. Miller I J, Bieker J J (1993) *Mol Cell Biol* 13: 2776-2786
15. Southwood C M, Downs K M, Bieker J J (1996) *Dev Dyn* 206: 248-259
16. Shields J M, Christy R J, Yang V W (1996) *J Biol Chem* 271: 20009-20017
17. Conkright M D, Wani M A, Anderson K P, Lingrel J B (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 1263-1270
18. Anderson K P, Kern C B, Crable S C, Lingrel J B (1995) *Mol Cell Biol* 15: 5957-5965
19. Asano H, Li X S, Stamatoyannopoulos G (1999) *Mol Cell Biol* 19: 3571-3579
20. Crossley M, Whitelaw E, Perkins A, Williams G, Fujiwara Y, Orkin S H (1996) *Mol Cell Biol* 16: 1695-1705
21. Imhof A, Schuierer M, Werner O, Moser M, Roth C, Bauer R, Buettner R (1999) *Mol Cell Biol* 19: 194-204
22. Sogawa K, Imataka H, Yamasaki Y, Kusume H, Abe H, Fujii-Kuriyama Y (1993) *Nucleic Acids Res* 21: 1527-1532
23. Ratzliff V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman S L (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9500-9505
24. Suzuki T, Yamamoto T, Kurabayashi M, Nagai R, Yazaki Y, Horikoshi M (1998) *J Biochem (Tokyo)* 124: 389-395
25. Matsumoto N, Laub F, Aldabe R, Zhang W, Ramirez F, Yoshida T, Terada M (1998) *J Biol Chem* 273: 28229-28237
26. Thiesen H J, Bach C (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 3203-3209
27. Feng W C, Southwood C M, Bieker J J (1994) *J Biol Chem* 269: 1493-1500.
28. Czyż M, Cierniewski C S (1999) *Eur J Biochem* 265: 638-644
29. Letovsky J, Dynan W S (1989) *Nucleic Acids Res* 17: 2639-2653
30. Bieker J J, Southwood C M (1995) *Mol Cell Biol* 15: 852-860
31. Hoey T (1993) *Cell* 72: 247-260
32. Ryu S, Zhou S, Ladurner A G, Tjian R (1999) *Nature* 397: 446-450
33. Courey A J, Tjian R (1992) w *Transcriptional Regulation*; red: McKnight S L, Yamamoto K R; Cold Spring Harbor Laboratory Press, str.743-769
34. Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird A P (1994) *Genes Dev* 8: 2282-2292
35. Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelson M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H (1994) *Nature* 371: 435-438
36. Minie M E, Kimura T, Felsenfeld, G (1992) *Development* 115: 1149-1164

37. Chen H.-M, Pahl H L, Scheibe R J, Zhang D-E, Tenen D G (1993) *J Biol Chem* **268**: 8230-8239
38. Zhang D-E, Hetherington C J, Tan S, Dziennis S E, Gonzales D A, Chen H-M, Tenen D G (1994) *J Biol Chem* **269**: 11425-11434
39. Saffer J D, Jackson S P, Thurston S J (1990) *Genes Dev* **4**: 659-666
40. Sif S, Capobianco A J, Gilmore T D (1993) *Oncogene* **8**: 2501-2509
41. Miltenberger R J, Farnham P J, Smith D E, Stommel J M, Cornwell M M (1995) *Cell Growth Diff* **6**: 549-556
42. Alemany J, Borrás T, De Pablo F (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3353-3357
43. Borrellini F, Glazer R I (1993) *J Biol Chem* **268**: 7923-7928
44. Inagaki Y, Truter S, Ramirez F (1994) *J Biol Chem* **269**: 14828-14834
45. Hamanaka R, Kohno K, Seguchi T, Okamura K, Morimoto A, Ono M, Ogata J, Kuwano M (1992) *J Biol Chem* **267**: 13160-13165
46. Sanceau J, Kaisho T, Hirano T, Wietzerbin J (1995) *J Biol Chem* **270**: 27920-27931
47. Chin K, Oda N, Shen K, Noguchi CT (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 3041-3049
48. Merika M, Orkin S H (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2437-2447.
49. Oosterwegel M, Timmermann J, Leiden J, Clevers H (1992) *Dev Immunol* **3**: 1-11.
50. Talianidis I, Tambakaki A, Toursounova J, Zannis V I (1995) *Biochemistry* **34**: 10298-10309
51. Gegonne A, Bosselut R, Bailly R-A, Ghysdael J (1993) *EMBO J* **12**: 1169-1178
52. Youn B-S, Kim K-K, Kwon B S (1996) *J Immunology* **157**: 3499-3509
53. Sartorelli V, Webster K A, Kedes L (1990) *Genes Dev* **4**: 1811-1822
54. Krishnam V, Wang X, Safe S (1994) *J Biol Chem* **269**: 15912-15917
55. Perkins N, Edwards N L, Duckett C S, Agranoff A B, Schmid R M, Nabel G J (1993) *EMBO J* **12**: 3551-3558
56. Perkins N, Agranoff A B, Pascal E, Nabel G J (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 6570-6583
57. Noti J D, Reinemann B C, Petrus M N (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 2940-2950
58. Chen L I, Nishinaka T, Kwan K, Kitabayashi I, Yokoyama K, Fu Y H, Grunwald S, Chiu R (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 4380-4389
59. Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JM, Vovughan DE (1998) *J Biol Chem* **273**: 8225-8231
60. Schufele F, West B L, Reudelhuber T L (1990) *J Biol Chem* **265**: 17189-17196
61. Jackson S P, Tijan R (1988) *Cell* **55**: 125-133.
62. Kumar A P, Butler A P (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 517-523
63. Jackson S P, MacDonald J J, Lees-Miller S, Tijan R (1990) *Cell* **63**: 155-165
64. Vlach J, Garcia A, Jacque J-M, Rodriguez M S, Michelson S, Virelizier J-L (1995) *Virology* **208**: 753-761
65. Leggett R W, Armstrong S A, Barry D, Mueller C R (1995) *J Biol Chem* **270**: 25879-25884
66. Armstrong S A, Barry D A, Leggett R W, Mueller C R (1997) *J Biol Chem* **272**: 13489-13495
67. Lee Y I, Lee S, Lee Y, Bong Y S, Hyun S W, Yoo Y D, Kim S, Kim Y w, Poo H R (1998) *Oncogene* **16**: 2367-2380
68. Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J, Glazer R I (1997) *J Biol Chem* **272**: 21137-21141
69. Kumar A P, Butler A P (1997) *J Biol Chem* **272**: 2012-2019
70. Hagen G, Mueller S, Beato M, Suske G (1994) *EMBO J* **13**: 3843-3851
71. Hata Y, Duh E, Zhang K, Robinson G S, Aiello L P (1998) *J Biol Chem* **273**: 19294-19303
72. Apt D, Watts R M, Suske G, Bernard H U (1996) *Virology* **224**: 281-291
73. Discher D J, Bishopric N H, Wu X, Peterson C A, Webster K A (1998) *J Biol Chem* **273**: 26087-26093
74. Feng X, Teitelbaum S L, Quiroz M E, Cheng S-L, Lai C-F, Avioli L V, Ross F P (2000) *J Biol Chem* **275**: 8331-8340
75. Gualberto A, Baldwin A S Jr (1995) *J Biol Chem* **270**: 19680-19683
76. Udvardia A J, Rogers K T, Higgins P D R, Murata Y, Martin K H, Humphrey P A, Horowitz J M (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3265-3269
77. Udvardia A J, Templeton D J, Horowitz J M (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3953-3957
78. Kim S-J, Onwuta U S, Lee Y I, Li R, Botchan M R, Robbins P D (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 2455-2463
79. Shao Z, Robbins P D (1995) *Oncogene* **10**: 221-228
80. Ehrlich M, Ehrlich K C (1993) W: Jost J-P, Saluz H P (red) *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, str 145-168
81. Iguchi-Arigo S M M, Schaffner W (1989) *Genes Dev* **3**: 612-619
82. Kovédi I, Reichel R, Nevins J R (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2180-2184
83. Radtke F, Hug M, Georgiev O, Matsuo K, Schaffner W (1996) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **377**: 47-56.
84. Clark S J, Harrison J, Molloy P L (1997) *Gene* **195**: 67-71
85. Li B, Adams C C, Workman J L (1994) *J Biol Chem* **269**: 7756-7763
86. Czyż M (2000) *Acta Haematol Pol* **31**: 17-23
87. Martin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipson S (1997) *Cell* **89**: 619-628
88. Tate P, Skarnes W, Bird A (1996) *Nat Genet* **12**: 205-208
89. Yieh L, Sanchez H B, Osborne T F (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6102-6106
90. Stroem A-C, Forsberg M, Lillhager P, Westin G (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 1981-1986
91. Black A R, Jensen D, Lin S Y, Azizkhan J C (1999) *J Biol Chem* **274**: 1207-1215
92. Scohy S, Van Vooren P, Szpirer C, Szpirer J (1998) *Cytogenet Cell Genet* **81**: 273-274
93. Kalff-Suske M, Kunz J, Grzeschik K-H, Suske G (1996) *Genomics* **37**: 410-412
94. Kalff-Suske M, Kunz J, Grzeschik K-H, Suske G (1995) *Genomics* **26**: 631-633

Struktura rybosomu prokariotycznego

Structure of procaryotic ribosome

BEATA DUDZIŃSKA¹, TOMASZ TWARDOWSKI²

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Wzajemne oddziaływanie podjednostek rybosomalnych
- III. Oddziaływania rRNA z białkami rybosomalnymi
- IV. Modele wiązania tRNA w rybosomie podczas etapu elongacji
- V. Oddziaływanie tRNA i mRNA w miejscach A, P i E z komponentami podjednostek
- VI. Oddziaływanie rRNA z czynnikami elongacyjnymi
- VII. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Ribosomal subunits interactions
- III. Interactions of rRNA with ribosomal proteins
- IV. tRNAs binding on ribosome during elongation of polypeptide
- V. Interactions of tRNA and mRNA on A, P and E site with subunits components
- VI. Interactions of rRNA with elongation factors
- VII. Conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: AA-tRNA – aminoacylo-tRNA; D-tRNA – deacylowany tRNA; miejsce A — miejsce wiązania aminoacylo-tRNA; miejsce E — miejsce wiązania deacylowanego tRNA; miejsce P — miejsce wiązania peptydylo-tRNA; P-tRNA — peptydylo-tRNA; PRE — stan pretranslokacyjny rybosomu; POST — stan posttranslokacyjny rybosomu; tRNA — dowolna cząsteczka tRNA bez rozróżnienia na formy.

I. Wprowadzenie

Rybosom jest rybonukleoproteiną o ciężarze cząsteczkowym 3-4 miliony daltonów, która realizuje tylko jedną funkcję: syntezę łańcucha polipeptydowego. Badania nad tym makrokompleksem trwają już wiele lat i dotyczą różnych zagadnień, przede wszystkim korelacji między strukturą i funkcją [por. nasze wcześniejsze opracowania w *Postęпах Biochemii*: 1, 2 i prace tam cytowane]. W artykule tym chcemy przedstawić najnowsze dane dotyczące budowy rybosomu prokariotycznego, a w szczególności rolę rybosomalnych kwasów nukleinowych w procesie elongacji łańcucha polipeptydowego. Proces biosyntezy polipeptydu charakteryzuje bardzo wysoka wydajność, którą najlepiej opisują dwa parametry: minimalna liczba błędów (10^{-4}) oraz szybkość syntezy polipeptydu (10^2 aminokwasów na mi-

nutę). Kluczem do wyjaśnienia i zrozumienia mechanizmu działania rybosomu jest poznanie jego złożonej struktury.

Istniało wiele koncepcji stereochemicznej lokalizacji tRNA i mRNA na rybosomie. W latach sześćdziesiątych Watson i Lipmann postulowali mechanizm biosyntezy peptydu oparty na istnieniu dwóch miejsc* wiążących tRNA: peptydylo-tRNA (ang. *P-site*) i aminoacylo-tRNA (ang. *A-site*). Ten klasyczny model dwóch miejsc wiążących przewidywał, że rybosom w stanie pretranslokacyjnym (ang. *PRE state*) zawiera dwie cząsteczki aminoacylo-tRNA (względnie aminoacylo-tRNA i peptydylo-tRNA) odpowiednio w miejscu A i P, a w stanie posttranslokacyjnym (ang. *POST state*) tylko jeden peptydylo-tRNA w miejscu P. W 1968 roku H a e n n i i L u c a s - L e n a r d zaproponowali model rybosomu, który wiązałby jednocześnie trzy cząsteczki tRNA, podobny trójmiejskowy model postulował w 1978 roku Kirillov bez wyjaśnienia lokalizacji tych cząsteczek na rybosomie. W latach osiemdziesiątych zaproponowano istnienie trzeciego, oprócz miejsc A i P, rybosomalnego miejsca wiążącego: AA-tRNA (aminoacylo-tRNA) jako miejsce wstępnego rozpoznania (*R-site*, od terminu ang.

¹Mgr, ²prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN; Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, tel. 061 8528-503 w. 133, 134, e-mail: twardows@ibch.poznan.pl

*Nazwy: "miejsce", "obszar" i "region" używane w opisach modeli wiązania tRNA na rybosomie podczas etapu elongacji, zastosowano wg oryginalnego nazewnictwa.

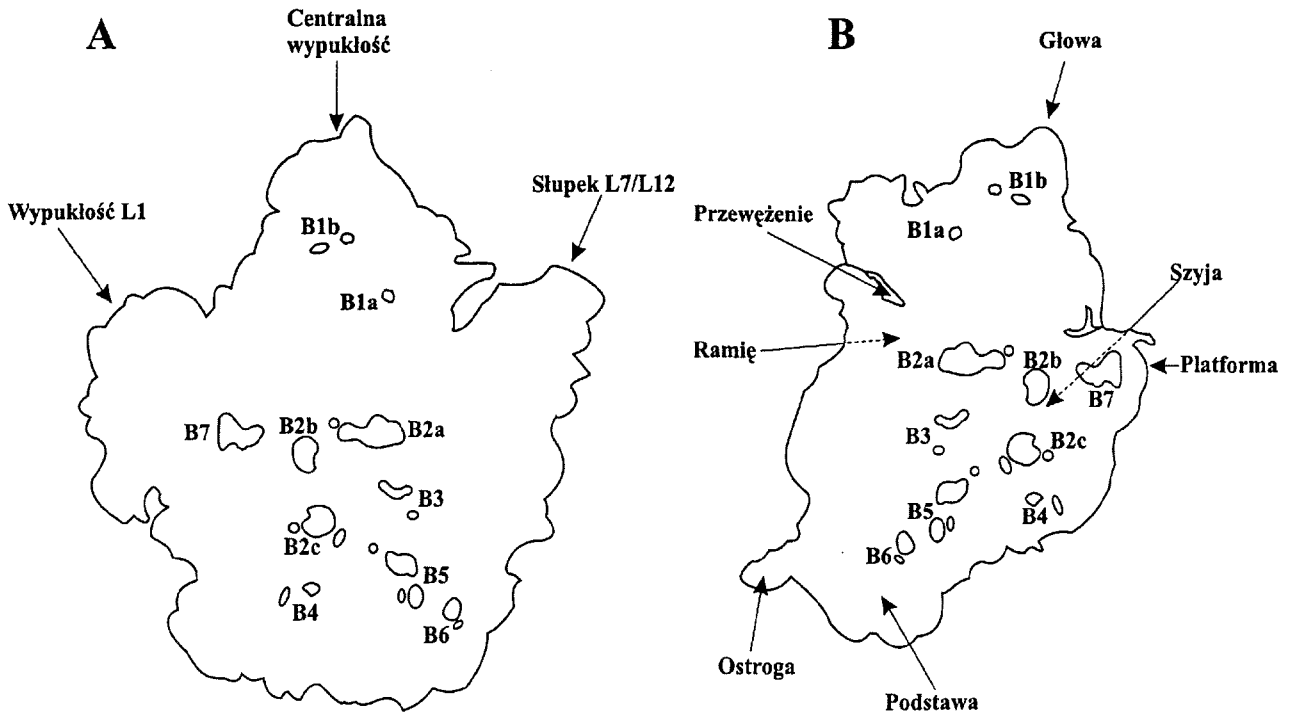
recognition — rozpoznawanie); model ten proponowany przez L a k e ' a nie został zweryfikowany eksperymentalnie [3]. D-tRNA (deacylowany-tRNA), nowy region, nazwany miejscem E od angielskiego terminu *exit* (wyjście), miał wiązać wyłącznie deacylowany tRNA. Obecność trzech miejsc wiążących tRNA została potwierdzona w rybosomach pochodzących z *Escherichia coli* [4], jak również w rybosomach z archebakterii *Halobacterium halobium* [5], drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [6], rybosomów pochodzących z wątroby królika [7] i rybosomów ludzkich [8]. Przyjmuje się, że trzy miejsca wiążące tRNA na rybosomie są uniwersalną cechą rybosomów.

II. Wzajemne oddziaływanie podjednostek rybosomalnych

W 1999 roku rozwiązano metodami rentgenograficznymi strukturę rybosomu 70S z *Thermus thermophilus* [9]. Badania te w znacznym stopniu przyczyniły się do określenia wzajemnych oddziaływań między podjednostkami rybosomu. W obrębie małej podjednostki 30S (Ryc. 1A), która zbudowana jest z

stające w bliskim kontakcie z wierzchołkiem podjednostki, tworząc szczelinę między tymi elementami; oddziaływanie to jest niezbędne dla stabilności rybosomu [10]. Stwierdzono również dwa dodatkowe połączenia między wierzchołkiem i platformą: pierwsze od strony zewnętrznej w pobliżu przewężenia, drugie od strony wierzchołka na końcu platformy. Na dole po prawej stronie podstawy znajduje się wystająca helisa RNA nazwana ostrogą (*spur*).

Duża podjednostka 50S (Ryc. 1B), która zbudowana jest z 23S rRNA (Ryc. 3A), 5S rRNA i 34 białek (L1 – L34), składa się z czterech podstawowych elementów: podstawy (*body*), stanowiącej dolną część podjednostki oraz trzech wypukłości w górnej części, wypukłości L1 (*L1 protuberance*), centralnej wypukłości (*central protuberance*) i słupka L7/L12 (*L7/L12 stalk*). Stwierdzono, że słupek L7/L12 ma budowę elastyczną, co jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania rybosomu [11]. Podjednostki rybosomu po zasocjowaniu tworzą wewnętrzną przestrzeń (wnękę), która zawiera miejsca wiązania D-tRNA, AA-tRNA, peptydylotRNA oraz czynników EF-Tu i EF-G. Dno wnęki jest utworzone przez wiele mostków łączących pod-



Ryc. 1. Schemat podjednostek rybosomu 70S, na podstawie [9]. A — podjednostka 50S z wyróżnionymi elementami strukturalnymi, B — podjednostka 30S z wyróżnionymi elementami strukturalnymi.

16S rRNA (Ryc. 2A) i 21 białek (S1–S21), wyróżniono wierzchołek (*head*), który połączony jest z podstawą (*body*) przez przewężenie (*neck*) w pobliżu platformy (*platform*). Po prawej stronie podstawy znajduje się niewielkie ramię (*shoulder*), pozo-

stawę i platformę podjednostki 30S z przednią częścią podjednostki 50S [9]. Powyżej wnęki dodatkowy mostek łączy wierzchołek 30S z centralną wypukłością i palcem miejsca A (*A-site finger*) 50S. Mostki między podjednostkami zbudowane są za-

również z oddziaływań RNA-RNA jak i RNA-białko. Pierwsze z nich, RNA-RNA, występują w centralnej części obszaru wzajemnego oddziaływania podjednostek (obszary te są określane jako: B2a, B2c, B3, B5, B7), natomiast drugie, RNA-białko, umiejscowione są peryferyjnie (odpowiednio nazwane: B1a, B1b, B4, B6).

Cztery elementy 16S rRNA tworzą mostki RNA-RNA z podjednostką 50S [9, 12], natomiast mostki RNA-białko powstały zarówno dzięki oddziaływaniom białek z małej jak i dużej podjednostki [9] (Tabela 1).

Tabela 1

Mostki łączące małą i dużą podjednostkę rybosomalną

| Rodzaj mostka | Region RNA | Położenie regionu RNA | Oddziaływanie (RNA lub białko) | Oznaczenie | Rysunek |
|---------------|--|--|--|----------------|----------------------------|
| RNA-RNA | Helisa 790 16S rRNA | Platforma | | B2b | 1A i B 2A i C |
| | Helisa 690 16S rRNA | Platforma | | B7 | 1A i B 2A i C |
| | Czteronukleotydo- wa pętla 900 16S rRNA | Centrum podjednostki, w pobliżu połączenie trzech głównych domen 16S rRNA | <ul style="list-style-type: none"> •Od strony podjednostki 30S oddziałuje z wyźłobieniem utworzonym przez helisę 790 16S rRNA •Od strony podjednostki 50S łączy się prawdopodobnie z helisą 1700 23S rRNA, która charakteryzuje się fragmentem oddziaływań niekanonicznych [13]. | B2c | 1A i B 2A i C 3A i B |
| | Przedostatnia heli- sa 16S rRNA (1400-1490) | Pionowy rowek przebie- gający przez całą długość podstawy podjednostki 30S | <ul style="list-style-type: none"> •Oddziałuje z dużą podjednostką w trzech miejscach przypadających na skręt helisy; •Most B2a łączy koniec łodygi tej helisy z helisą 1910 domeny IV 23S rRNA | B2a, B3, B5 | 1A i B 2A i B 3A |
| RNA-białko | Palec miejsca A (helisa RNA) | Górna część podjednostki 50S | Białko pochodzące z wierzchołka podjednostki 30S | B1a | 1A i B |
| | Element RNA | Centralna wypukłość pod- jednostki 50S | α -helisa białka z wierzchołka podjednostki 30S | B1b | 1A i B |
| | Przedostatnia heli- sa 16S rRNA, re- gion oddziaływań niekanonicznych | Pionowy rowek przebie- gający przez całą długość podstawy podjednostki 30S | Białko położone w dolnej części podstawy podjednostki 50S | B6 | 1A i B |
| | Helisa 715 II do- meny 23S rRNA | | Białko S15, położone w dolnej części platfor- my podjednostki 30S | B4 | 1A i B 3A i C |

W odniesieniu do mostka B4 przeprowadzono badania w celu uściślenia miejsc oddziaływania między rRNA i białkiem [14]. Miejsce na 23S rRNA, które mogłoby oddziaływać z białkiem S15, oznaczono na drodze hydrolizy wolnymi rodnikami. Zmodyfikowana żelazem dwuwartościowym cysteina została włączona do białka S15 przez bezpośrednią mutagenezę w pozycjach 12, 36, 46 i 70. Następnie zrekonstruowaną małą podjednostkę z żelazowymi pochodnymi cysteiny, zasocjowano z dużą

podjednostką do formy rybosomu 70S. Okazało się, że wolne rodniki generowane przez żelazo (II), cięty 23S rRNA w pętli domeny II (715, 716). W celu potwierdzenia, że białko S15 oddziałuje z sekwencją zgodną z sekwencją pętli domeny II 23S rRNA, zasocjowano białko S15 z pętlą domeny IIA U2 snRNA, która ma sekwencję identyczną z sekwencją domeny II 23S rRNA *E. coli*, ale różniącą się dwoma nukleotydami w pętli od sekwencji tej samej domeny *T. thermophilus*. Na podstawie tych eksperymentów można sugerować, że niezwykle ważne dla oddziaływania białka S15-23S rRNA, jest obecność pu-

ryny w pozycji 715 i 716 pętli domeny II 23S rRNA.

III. Oddziaływanie rRNA z białkami rybosomalnymi

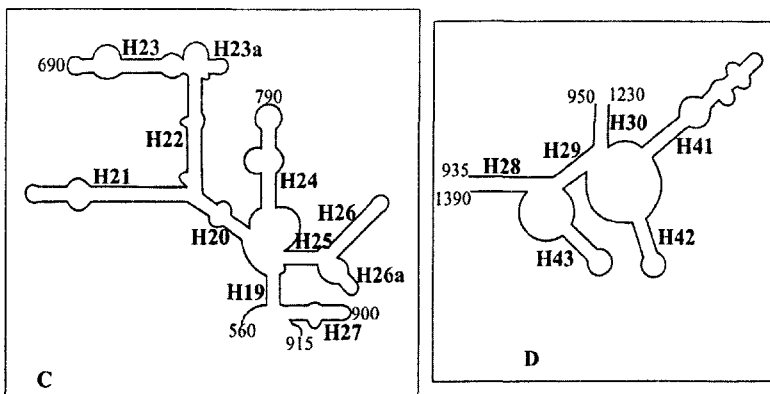
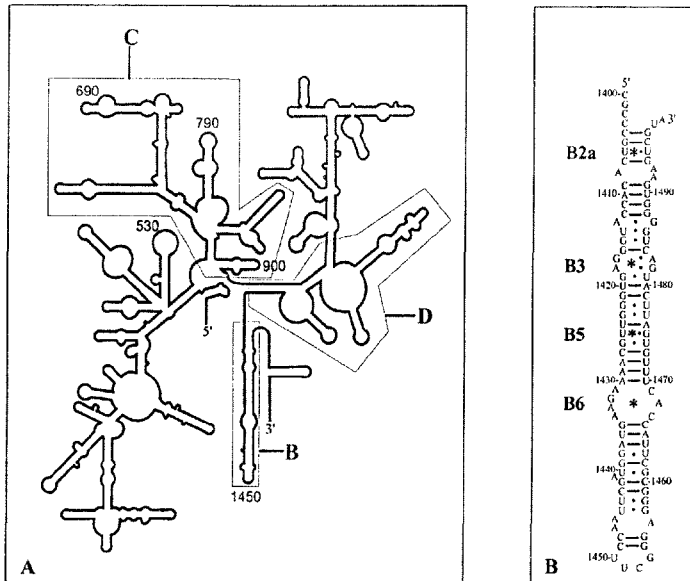
Rybosomy są kompleksami białek i kwasów rybonukleinowych. Białka oddziałując z RNA stabilizują strukturę rybosomów. Jednocześnie oddziaływania te chronią sekwencje istotne dla aktywności rybosomu i stymulują zmiany konformacyjne, a dosko-

nałym przykładem takich interakcji jest domena α -sarcyny. Zmiany konformacyjne tej domeny odgrywają zasadniczą rolę w cyklu przekształceń konformacyjnych rybosomu przy przejściach ze stanu pre- do posttranslokacyjnego [15, 16 i prace tam cytowane].

W małej podjednostce rybosomalnej w organizmach prokariotycznych znajdują się białka, których połączenie z rRNA jest funkcjonalnie ważne, ponie-

nalnie region — helisa H27, który jest istotny dla przekształceń konformacyjnych rybosomu podczas procesu translacji, a w jego pobliżu znajduje się białko S5.

Większość białek znajduje się na zewnętrznej stronie oraz z boku podstawy podjednostki 30S, jednakże dwa białka: S7 i S12, umiejscowione są na małej podjednostce po stronie obszaru wzajemnego oddziaływania podjednostek [17]. Na



Ryc. 2. Struktura II-rzędowa 16S rRNA, na podstawie [9, 17, 18]. A — zaznaczone są fragmenty struktury dyskutowane w tekście; rysunki B, C i D korelują z odpowiednimi zaciemnionymi obszarami; B — przedostatnia domena 16S rRNA (1400-1500); gwiazdkami zaznaczono mostki RNA-RNA między podjednostkami, w kolejności zaczynając od pętli: B6, B5, B3, B2a — na końcu łodygi; C — centralna domena 16S rRNA; D — obszar oddziaływania białka S7 z 16S rRNA

waż na powierzchni podjednostki 30S znajdują się miejsca A, P i E, tj. miejsca, w których oddziałują ze sobą mRNA i tRNA. Centralna domena 16S rRNA zawiera nukleotydy 565-885 (Ryc. 2C). Ten fragment rRNA, wraz z asocjowanymi białkami, kształtuje platformę i część podstawy podjednostki 30S. Na podstawie badań stwierdzono, że wewnętrzna struktura trzeciorzędowa centralnej domeny 16S rRNA — to wiele krótkich helis wspólnie upakowanych [17]. Labilna struktura platformy zawiera domeny 690 i 790, które zidentyfikowano jako elementy o decydującym znaczeniu dla wiązania tRNA w miejscu P oraz asocjacji podjednostek. Na końcu 3' domeny centralnej znajduje się inny ważny funkcjo-

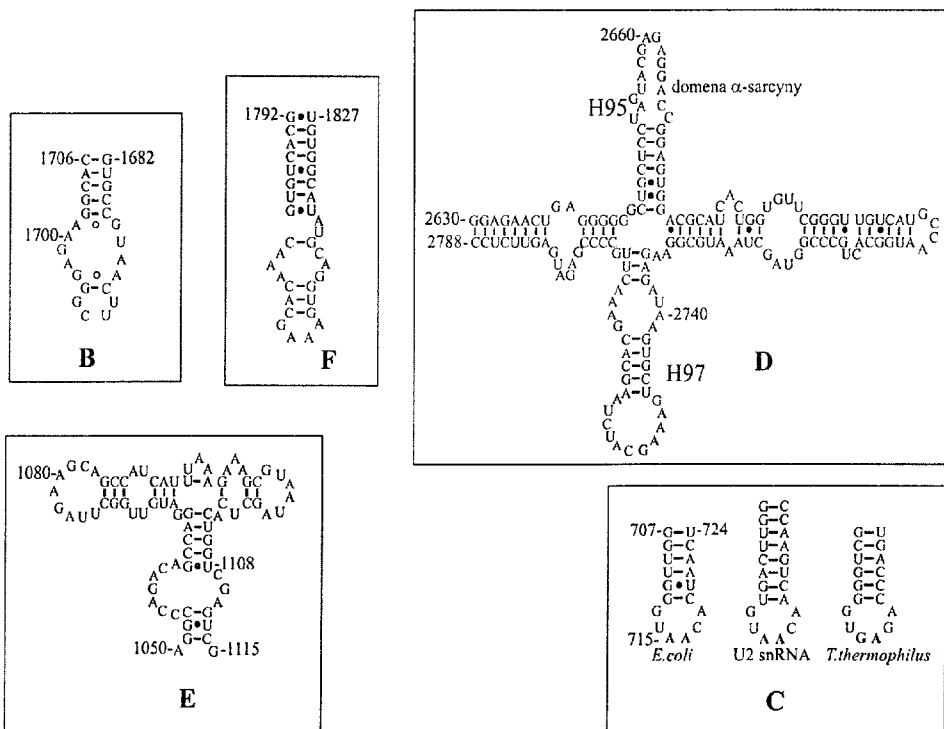
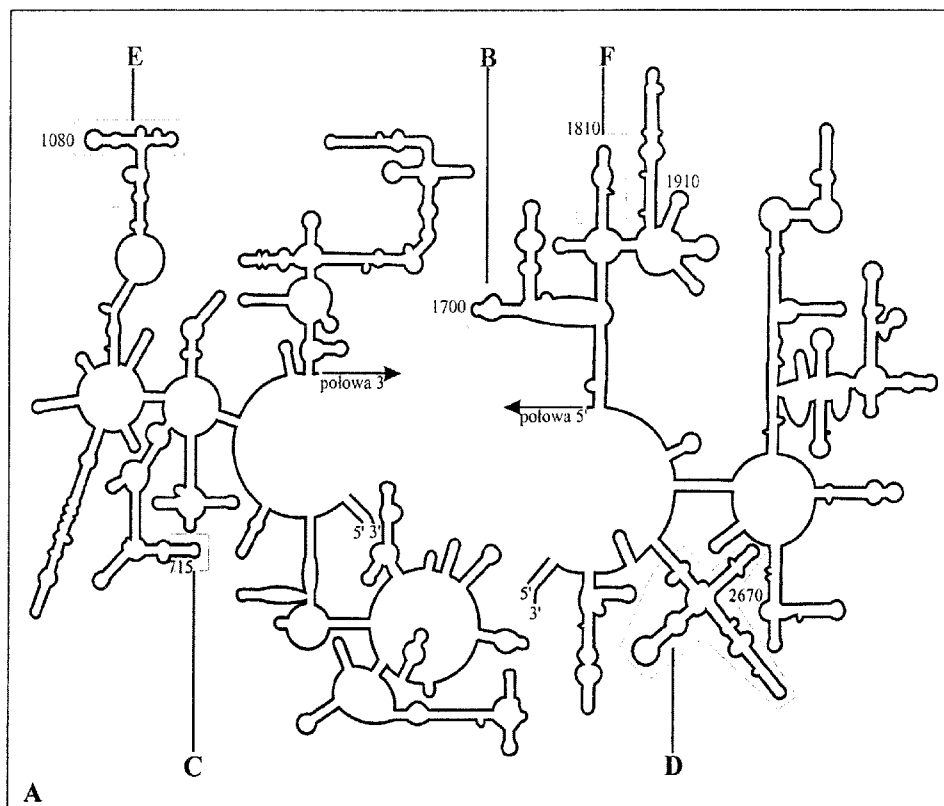
podstawie wyników tych eksperymentów można postawić tezę, że fragmenty 16S rRNA znajdujące się w obszarze wzajemnego oddziaływania podjednostek zaangażowane są także w inne procesy, a mianowicie interakcje między podjednostkami. Inne oddziaływania białek rybosomalnych wewnątrz podjednostek przedstawione są w Tabeli 2.

Synteza wiązania peptydowego zachodzi na dnie tunelu w podjednostce 50S. Aminokwas na zaminoacylowanym końcu CCA tRNA jest przenoszony na następny aminokwas razem z przemieszczeniem się peptydylo-tRNA do odpowiedniego regionu na tej podjednostce [24].

Przypuszczać można, że wydłużający się polipeptyd przechodzi przez tunel, przez środek podjednostki 50S [25]. Rozwiązanie struktury dużej podjednostki

pochodzących z kilku różnych regionów 23S rRNA.

W dużej podjednostce znajduje się także centrum GTPazowe, odpowiedzialne za przyłączenie czynni-



Ryc. 3. Struktura II-rzędowa 23S rRNA, na podstawie [9, 13, 14, 19-22]. A — zaznaczone są fragmenty struktury dyskutowane w tekście; rysunki B, C, D, E i F korelują z odpowiednimi zaciemnionymi obszarami; B — domena 1700, kółkami zaznaczono obszar oddziaływań niekanonicznych; C — domena 715 z *E. coli* i odpowiednio pętla domeny II U2 snRNA i pętla z *T. thermophilus* korespondująca z helisą 715 z *E. coli*; wyluszczoneym drukiem zaznaczono nukleotydy oddziałujące z białkiem S15; D — domeny: H95 (domena α -sarcyny) i H97, miejsce oddziaływania z białkiem L6; E — fragment 23S rRNA (1051-1108) oddziałujący z białkiem L11; F — domena 23S rRNA (1794-1825) oddziałujący z białkiem L2

rybosomalnej [26] pozwoliło określić w jaki sposób zbudowany jest tunel, w którym zachodzi elongacja łańcucha polipeptydowego. Okazało się, że brzoży tego tunelu składają się w dużej mierze z długich, prostych dupleksów RNA, powstałych na skutek nagromadzenia się podwójnie skręconych helis RNA,

ków elongacyjnych EF-G i EF-Tu oraz czynnika inicjującego IF2 i czynnika terminującego RF3. Ten region zawiera białka L6, L11, L14 i słupek L7/L12, jak również domenę α -sarcyny i region 1055-1080 23S rRNA [27].

IV. Modele wiązania tRNA na rybosomie podczas etapu elongacji

Translacja jest procesem składającym się z trzech etapów: inicjacji, elongacji i terminacji biosyntezy białka. W rybosomie, podczas wydłużania łańcucha polipeptydowego, zachodzą trzy zasadnicze procesy:

1. utworzenie dupleksu kodon-antykodon między mRNA i tRNA;
2. synteza wiązania peptydowego;
3. przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu.

Rozważane są trzy zasadnicze modele etapu elongacji na rybosomie:

cząsteczki (w tym przypadku fragmentu rybosomu) powodująca zmianę powinowactwa do ligan-du, czyli do transferowego RNA. Zgodnie z tą definicją AA-tRNA przyłączony w miejscu A powoduje zmianę struktury rybosomu obniżając powinowactwo deacylowanego tRNA do miejsca E i odwrotnie, jeżeli miejsce E obsadzone jest przez deacylowany tRNA to miejsce A posiada obniżone powinowactwo do AA-tRNA [28]. Oba stany konformacyjne rybosomu oddzielone są barierą energetyczną równą w przybliżeniu 120 kJ/mol [29]. W jej obniżeniu zasadniczą rolę odgrywają czynniki elongacyjne: EF-Tu i EF-G. Czynniki elongacyjne obniżając energię aktywa-

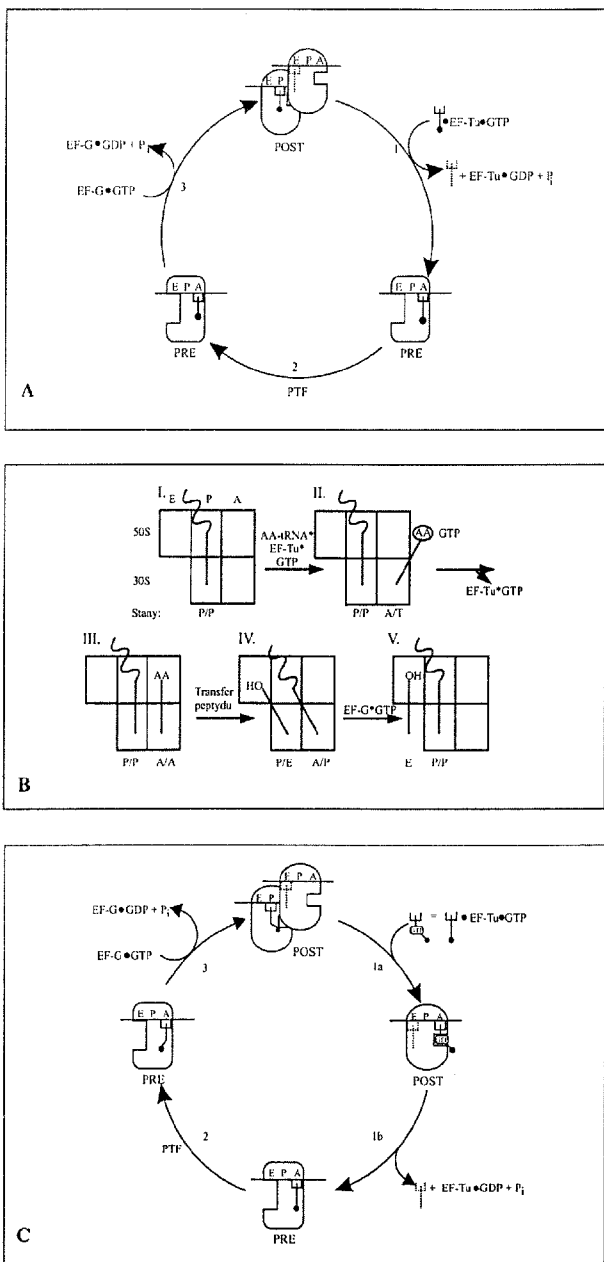
Tabela 2

Oddziaływania białek rybosomalnych z komponentami podjednostek rybosomalnych

| Rodzaj oddziaływania | Białko | Oddziaływanie i położenie | Rysunek |
|----------------------|-----------------------|--|---------|
| białko-RNA | S7 | <ul style="list-style-type: none"> •bliski kontakt z pętlą antykodonową tRNA w obszarze miejsca P i mRNA w regionie dekodującym •znajduje się wewnątrz helis H28-H30 i H41-H43 16S rRNA, które położone są w części głowy małej podjednostki [18] | 2D |
| | S6, S8, S11, S15, S18 | <ul style="list-style-type: none"> •centralna domena 16S rRNA, obszar połączenia helis: H20, H21 i H22 [17] •białko S15 związane jest do małego rowka utworzonego przez helisy H20 i H22, przy czym górna część tego białka znajduje się blisko helisy H21 i miejsca połączenia tych trzech helis •w białku S8 lizyna w pozycji 55 wiąże się z nukleotydem U653, a helisa na końcu aminowym ma kontakt z małym rowkiem helisy H25 •białko S17 znajduje się blisko helisy H21, gdzie lizyna w pozycji 29 wiąże się z nukleotydem U632 | 2C |
| | L6 | wiąże się z helisami H95 (domena α -sarcyny) i H97 znajdującymi się w domenie VI 23S rRNA [19] | 3D |
| | L11 | łączy się z fragmentem 58 nukleotydów 23S rRNA (1051-1108) [20,21] | 3E |
| | L2 | znajduje się blisko centrum transferazy peptydylowej; oddziałuje ono z krótką domeną (1794-1825) 23S rRNA [22] | 3F |
| białko-białko | S4, S5, S8 | <ul style="list-style-type: none"> •helikalna domena S4 oddziałuje z przednią częścią białka S5 [17] •struktura β7 (aminokwasy 90-96) domeny końca karboksylowego białka S8 tworzy wiązania wodorowe ze strukturą β białka S5, także na końcu karboksylowym [23] •wyeksponowany fragment β2 (aminokwasy 50-54) na końcu aminowym białka S8 jest zaangażowany w wiązanie z innym blisko położonym białkiem, prawdopodobnie S12 [17] | |

— **Allosteryczny model trójmiejscowy** (ang. *allosteric three-site model*). Rybosom w myśl tego modelu ma trzy miejsca wiążące tRNA, jednakże na rybosomie znajdują się zawsze dwie cząsteczki spośród: AA-tRNA (aminoacylo-tRNA), P-tRNA (peptydylo-tRNA) i D-tRNA (deacylowanego tRNA). Jego główną cechą jest allosteryczne oddziaływanie między miejscami A i E. Termin allosteria definiowany jest jako zmiana struktury

przyspieszają proces translacji, a przekształcając rybosomy z jednego stanu w drugi określają kierunek reakcji [30]. Zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 4A rybosomy znajdują się w stanie POST, kiedy P-tRNA związany jest w miejscu P, a D-tRNA w miejscu E i mają niskie powinowactwo do znajdującego się w pobliżu trójskładnikowego kompleksu AA-tRNA·EF-Tu·GTP. Utworzenie prawidłowe-



Ryc. 4. Modele wiązania tRNA na rybosomie podczas etapu elongacji, na podstawie [29]; A — model allosteryczny; B — model hybrydowy; C — model α - ϵ .

go wiązania kodon-antykonon między tym kompleksem a mRNA jest sygnałem dla rybosomu do allosterycznego przejścia ze stanu POST do stanu PRE. W konsekwencji następuje uwolnienie D-tRNA z miejsca E i równoczesne silne związanie kompleksu AA-tRNA·EF-Tu·GTP z miejscem A. GTP ulega hydrolizie i kompleks EF-Tu·GDP opuszcza rybosom. Ten stan z AA-tRNA w miejscu A i P-tRNA w miejscu P jest krótkotrwały, ponieważ następuje utworzenie nowego wiązania peptydowego, tj. peptydu z aminoacylo-tRNA. P-tRNA, wydłużone o jeden aminokwas, pozostaje przyłączone do miejsca A, natomiast utworzony D-tRNA pozostaje w miejscu P. Rybosomy w

stanie PRE są substratem dla kompleksu EF-G·GTP, którego przyłączenie wywołuje reakcje translokacji. P-tRNA przesuwa się z miejsca A do P, a D-tRNA z miejsca P do E. GTP ulega hydrolizie i kompleks EF-Tu·GDP opuszcza rybosom będący już w stanie POST. Wyjątkiem od tego schematu jest pierwszy cykl elongacyjny, tuż po przyłączeniu fMet-tRNA_i w cyklu inicjacyjnym. Wówczas miejsce A jest zajęte przez trójskładnikowy kompleks [AA-tRNA·EF-Tu·GTP]. Każdy następny cykl rozpoczyna się na rybosomach w stanie POST z zajęтым miejscem E [29].

— **Model stanu hybrydowego** (ang. *hybrid-site model*). Badania nad umiejscowieniem tRNA na rybosomie z zastosowaniem chemicznej metody *footprinting* doprowadziły do odkrycia pewnych stanów pośrednich, w których dwa końce tRNA mogą znajdować się w różnych miejscach na obu podjednostkach rybosomu. Oznacza to, że tRNA może równocześnie zajmować na przykład miejsce A w podjednostce 30S i miejsce P podjednostki 50S [31]. Taki stan może powstać na skutek przechylenia się cząsteczek tRNA lub ruchu podjednostki 50S względem podjednostki 30S. Interpretacją tych eksperymentów jest model stanów hybrydowych, przedstawiony na rycinie 4B, który ukazuje przynajmniej sześć stanów wiązających tRNA (A/T, A/A, A/P, P/P, P/E i E) [32]. Stan POST rybosomu podczas cyklu elongacyjnego w modelu hybrydowym, charakteryzuje się obecnością P-tRNA w stanie P/P, odpowiadający klasycznemu miejscu P (Ryc. 4BI). Oznacza to, że jeden jego koniec zakotwiczony jest w miejscu P podjednostki 30S, a drugi w miejscu P podjednostki 50S. Przejście rybosomu w stan pretranslokacyjny następuje po związaniu kompleksu AA-tRNA·EF-Tu·GTP w stanie A/T (Ryc. 4BII), tj. antykonon tRNA oddziałuje z kodonem mRNA w miejscu A małej podjednostki, podczas gdy koniec akceptorowy znajduje się w miejscu T. Miejsce T określa położenie nowo związanego AA-tRNA, kiedy ten jest jeszcze utrzymywany przez faktor EF-Tu [33, 34]. Po hydrolizie GTP i uwolnieniu kompleksu EF-Tu·GDP, AA-tRNA przesuwa się na rybosomie zajmując stan A/A, który jest odpowiednikiem klasycznego miejsca A (Ryc. 4BIII). Po utworzeniu wiązania peptydowego, oba tRNA przechodzą przez hybrydowe stany wiążące (Ryc. 4BIV). P-tRNA, wydłużony o jeden aminokwas, znajduje się w stanie A/P czyli jego koniec antykononowy jest w miejscu A podjednostki 30S, podczas gdy koniec akceptorowy związany

jest z miejscem P podjednostki 50S. D-tRNA w tym samym momencie znajduje się w stanie P/E co oznacza, że jego koniec antykodonowy jest w podjednostce 30S w miejscu P, a koniec akceptorowy w podjednostce 50S w miejscu E. Przesunięcie to jest spontaniczne i ma miejsce niezależnie od czynnika EF-G i GTP. Podczas translokacji oba tRNA i mRNA, synchronicznie przesuwa się z pretranslokacyjnych do pośrednich posttranslokacyjnych pozycji (Ryc. 4BV) [35]. P-tRNA znajduje się w stanie P/P, a w miejsce E przesuwa się D-tRNA. Ostatni etap translokacji obejmuje dysocjację D-tRNA z miejsca E i powrót rybosomu do stanu, w którym jest gotowy do przyjęcia AA-tRNA w kolejnym cyklu elongacyjnym (Ryc.4BI). P-tRNA zajmuje wówczas pozycję P (stan P/P), podczas gdy miejsca A i E są wolne [33, 35]. Zasadniczą rolę w translokacji odgrywa czynnik elongacyjny G. W ogólnie akceptowanym modelu zakłada się, że EF-G-GTP wiąże się z rybosomami w stanie PRE i indukuje ich konformacyjną zmianę pozwalającą na translokację. Białkowy czynnik G hydrolizuje GTP i dzięki obniżonemu powinowactwu do GDP, oddysocjuje od rybosomu. Model ten jest oparty na obserwacji, że EF-G w obecności GMPCP, czyli analogu nieulegającego hydrolizie, nadal wzmacnia (przyspiesza) translokację w stosunku do reakcji spontanicznej, ale ogranicza ją do pojedynczego cyklu [35].

- **Model α - ϵ** [36]. Zasadniczą cechą tego modelu jest obecność dwóch ruchomych obszarów, mocno wiążących tRNA w trakcie ich translokacji i przekształcających się razem z nimi z miejsca A i P odpowiednio w miejsce P i E. Obszar rybosomu, z którym oddziałuje AA-tRNA w miejscu A przed translokacją został nazwany „ α ”. Natomiast obszar rybosomu, z którym oddziałuje D-tRNA w miejscu E po translokacji nosi miano „ ϵ ”. W regionie P w stanie pretranslokacyjnym znajduje się obszar ϵ , natomiast w stanie posttranslokacyjnym obszar α . W tym ujęciu miejsca A, P i E są raczej regionami, w których w zależności od stanu translokacyjnego pojawiają się obszary α i ϵ . W modelu tym do programowanych rybosomów mogą przyłączyć się maksymalnie trzy cząsteczki tRNA i na rybosomie znajdują się trzy obszary wiązania tRNA. Dwa, wykazujące się wysokim powinowactwem do tRNA, czyli obszary α i ϵ , odpowiednio w regionie P i E oraz trzeci obszar, tzw. centrum dekodujące δ (ang. *decoding center* δ) o niskim powinowactwie do tRNA. Znajduje się ono w regionie A, oddzielnym w stanie POST od ob-

szaru α - ϵ , ale zalegającym się z obszarem α w stanie PRE [2, 29]. Zgodnie ze schematem cyklu elongacji (Ryc. 4C) zajmowanie regionu A jest rozdzielone dwoma etapami. Podczas procesu rozpoznania (reakcja 1a) rybosomy znajdują się w stanie POST czyli obszary α i ϵ mieszczą się w pozycjach P i E. Pętla antykodonowa AA-tRNA, będącego w kompleksie z EF-Tu i GTP, oddziałuje z centrum δ i na rybosomie zostają związane trzy cząsteczki tRNA. Prawidłowe oddziaływanie kodon-antykodon indukują zmianę konformacji rybosomu. Ma miejsce uwolnienie kompleksu EF-Tu-GDP, jak również D-tRNA z regionu E na skutek przesunięcia obszaru α - ϵ z pozycji P-E w pozycję A-P (reakcja 1b). Kolejnym etapem jest przeniesienie łańcucha peptydowego na AA-tRNA z utworzeniem wiązania peptydowego (reakcja 2) oraz translokacja (reakcja 3) polegająca na przesunięciu obszaru α - ϵ razem z dwoma tRNA i mRNA, które są z nią silnie połączone zarówno przed, w trakcie, jak i po reakcji translokacji. W ten sposób otrzymuje się stan POST rybosomów, które są gotowe do kolejnego cyklu elongacyjnego. Z badań termodynamicznych wynika, że translokacji towarzyszy zmiana konformacji kompleksu rybosomalnego [37]. W modelu α - ϵ krytycznym momentem jest reakcja 1b (por. Ryc. 4C) obsadzenia regionu A, a nie translokacja, jak miało to miejsce we wcześniejszych modelach. Reakcja 1b jest charakteryzowana przez zależności pomiędzy kompleksem (tRNA)₂-mRNA a rybosomem, co jest zgodne z obserwacjami, że proces zajmowania regionu A jest czynnikiem limitującym przebieg cyklu elongacyjnego w tym modelu [37, 38].

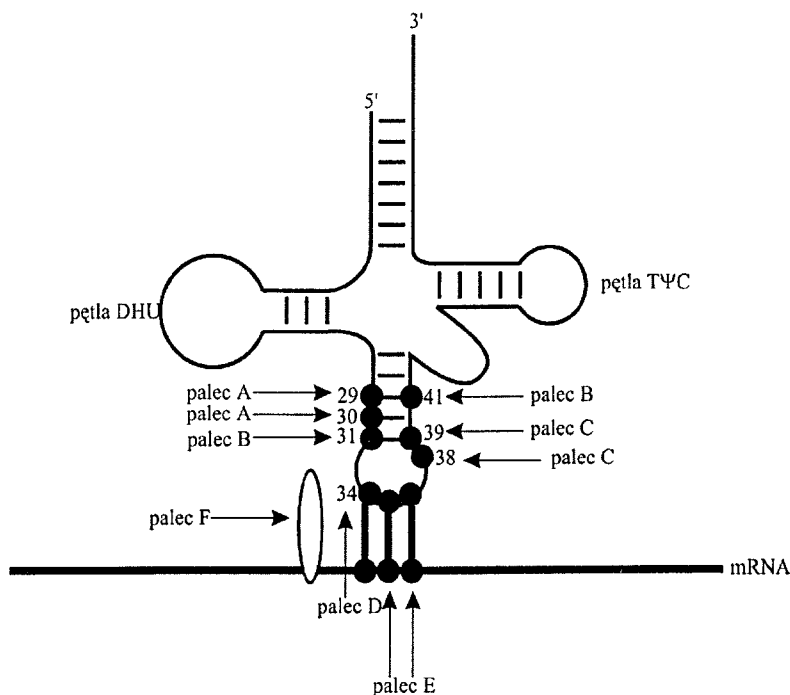
Trzy przedstawione modele funkcjonowania rybosomu w trakcie procesu elongacji, mimo pozornych podobieństw są zasadniczo odmienne. Istota różnicy polega na dynamice zmian konformacyjnych, które determinują szybkość i bezbłądność syntezy wiązania peptydowego. Zrozumienie mechanizmu syntezy kolejnego wiązania peptydowego winno zbliżyć nas do poznania podstaw molekularnego rozpoznania przez rybosom tego jedynego właściwego AA-tRNA zgodnego z kodonem spośród 64 innych AA-tRNA, w tym bardzo podobnych (jak izoakceptorowe AA-tRNA).

V. Oddziaływanie tRNA i mRNA w miejscach A, P, E z komponentami podjednostek

Podczas biosyntezy białka tRNA zajmuje na rybosomie trzy różne pozycje: miejsca A, P i E. Koniec

CCA cząsteczki tRNA w miejscu P jest skrecony i stabilny, dzięki czemu łatwo widoczny w opisanej strukturze rybosomu [9]. Ramię CCA, a właściwie ultrakonserwatywny nukleotyd C74, paruje z zasadą G2252 23S rRNA. Nukleotyd A76 skierowany jest w stronę tunelu, którym polipeptyd opuszcza rybosom [26]. W przypadku nie obsadzonego miejsca A, P-tRNA oddziałuje z rybosomem w miejscu P. Stwierdzono, że w małej podjednostce głównym obszarem łączenia P-tRNA z komponentami podjednostki 30S, jest pętla antykodonowa związana z mRNA. Oprócz połączenia kodon-antykonon istnieje sześć innych obszarów wiązania tRNA i mRNA do rybosomu w miejscu P (Ryc.5). Trzy z nich (oznaczone na rysunku 5 jako palce A, B i C) tworzą molekularną zwrotnicę kierującą łodygę pętli antykodonowej we właściwe położenie:

- palec A wiąże się wokół nukleotydów 29 i 30 łodygi domeny antykodonowej tRNA;
- palec B oddziałuje w pobliżu nukleotydów 31 i 41 łodygi domeny antykodonowej tRNA;
- po przeciwnej stronie łodygi, palec C wiąże się w pobliżu nukleotydów 38 i 39 domeny antykodonowej tRNA.



Ryc. 5. Schemat oddziaływań tRNA z komponentami podjednostki, oznaczonymi jako palce A, B, C, D i E, w miejscu P na rybosomie.

Kolejne trzy obszary wiązania tRNA i mRNA do rybosomu prowadzących do wytworzenia centrum syntezy polipeptydu to:

- palec D, oddziałujący w pobliżu nukleotydu 34 w pętli antykodonowej tRNA;
- palec E, który wchodzi w interakcje z mRNA w małym rowku, przy pozycji pierwszej i drugiej kodonu. Te wymienione palce pomagają stabilizować parowanie kodon-antykonon;

— palec F ma zupełnie inny charakter w porównaniu z wymienionymi połączeniami, które oddziałują z helisą kodon-antykonon w pobliżu jej końca. Jego specyfika polega na stabilizacji parowania potrójnego dupleksu kodon-antykonon. Stanowi on przedłużenie tego układu, w konsekwencji czego powstaje czwarte ramię kompleksu. Palec F pomaga również w odpowiednim ułożeniu mRNA w miejscu A.

Na podstawie badań krystalograficznych [9] postuluje się minimalne oddziaływania mRNA z rybosomem w przypadku nie obsadzonego miejsca A. Prawdopodobnie konieczna jest pewna elastyczność miejsca A, aby mogło zajść przemieszczenie AA-tRNA, opuszczenie rybosomu przez EF-Tu i parowanie kodon-antykonon. Stwierdzono również, że koniec mRNA położony jest wewnątrz szczeliny utworzonej między wierzchołkiem i podstawą podjednostki 30S. AA-tRNA związane w miejscu A, a w szczególności nukleotyd N1 z końca 5' cząsteczki tRNA jest związany z A1492 i A1493 16S rRNA. Nukleotyd N1 położony jest 15Å dalej niż kompleks mRNA-tRNA i umiejscowiony po przeciwnej stronie podjednostki 50S w pobliżu mostka B2a.

D-tRNA w miejscu E oddziałuje w trzech obszarach struktury rybosomu z jego komponentami:

- 3' koniec CCA znajduje się w szczelinie między słupkiem L1 i centralnym wybrzuszeniem podjednostki 50S;
- pętla TΨC oddziałuje z białkiem L1;
- pętla antykodonowa wiąże się ze szczeliną między platformą i wierzchołkiem 30S, w sąsiedztwie miejsca P.

VI. Oddziaływanie rRNA z czynnikami elongacyjnymi

Biosynteza białka rozpoczyna się, gdy kompleks składający się z: podjednostki 30S, czynników inicjujących, fMet-tRNA_i i mRNA przyłącza się do podjednostki 50S. W ten sposób powstaje aktywny kompleks inicjujący, w którym fMet-tRNA_i zajmuje miejsce P. Kolejnym etapem jest przyłączenie się AA-tRNA do miejsca A na rybosomie razem z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu, zależnym od hydrolizy GTP. EF-Tu ochrania wiązanie estrowe zacylowanego AA-tRNA przed hydrolizą pod wpływem wody oraz jest zaangażowany w dostarczenie AA-tRNA do właściwego miejsca na rybosomie. Hydroliza GTP do GDP znacznie zmniejsza powinowactwo tego czynnika do AA-tRNA i powoduje oddysocjowanie EF-Tu od rybosomu. Ramię akceptorowe AA-tRNA połączone jest z EF-Tu, podczas gdy czynnik ten oddziałuje z podstawą słupek L7/L12 podjednostki 50S. W tym miejscu na dużej podjednostce znajdują się również białka L10 i L11 oraz domena α -sarcyny 23S rRNA [39]. W pracach eksperymentalnych wykazano, że wiązanie EF-Tu do rybosomu ochrania cztery nukleotydy znajdujące się w domenie α -sarcyny przed działaniem wolnych rodników: G2655, A2660, G2661 i A2665 [40]. Miejsce wiązania EF-Tu, pokrywa się częściowo z obszarem interakcji innego czynnika elongacyjnego EF-G.

Czynnik elongacyjny EF-Tu oddziałuje z małą podjednostką w pobliżu regionu dekodującego. W miejscu tym znajdują się białka S4, S5 i S12 oraz oddziałująca z nimi domena 530 16S rRNA (Rys. 2A). Okazało się, że ten fragment 16S rRNA spina szczelinę między białkiem S12 i regionem dekodującym [41].

Kolejnym czynnikiem elongacyjnym, zależnym od hydrolizy GTP, jest EF-G, który odpowiedzialny jest za translokację tRNA odpowiednio z miejsc A i P do P i E, czemu towarzyszy przesunięcie mRNA o jeden kodon. Struktura tego czynnika składa się z pięciu domen, w tym domena I zbudowana jest z dwóch poddomen: G — wiążącą GTP i dodatkową G', której funkcja nie jest jeszcze poznana [11]. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wnioskuje się, że hydroliza GTP jest konieczna zarówno do związania wszystkich domen EF-G do kompleksu pretranslokacyjnego jak i do ułatwienia reakcji translokacji, a w obydwu rybosomalnych podjednostkach (30S i 50S) konformacyjne zmiany znacząco wpływają na wiązanie EF-G i hydrolizę GTP. Wiązanie EF-G wpływa na konformację trzonu L7/L12 poprzez wniesienie i rozwinięcie go oraz powoduje wy-

sunięcie się podstawy słupek, co przyczynia się do powstania połączenia z EF-G, określanego przez autorów [10] jako „łukowate”. W przeciwieństwie do stanu EF-G-GDP, zauważono, że dla formy EF-G-GTP istnieją różnice w konformacji rybosomu:

- formowane jest „niełukowate” połączenie pomiędzy podstawą słupek L7/L12, a domeną G' EF-G;
- słupek L7/L12 wydłuża się i przechodzi w dwie rozszczipione subdomeny.

Region małej podjednostki oddziałujący z domeną II EF-G oraz obszar interakcji pętli antykodonowej tRNA w miejscu A lub alternatywnie szczytu domeny IV EF-G, są, jak się okazuje najbardziej elastycznymi miejscami podjednostki 30S. Uwidoczniono różnice konformacyjne rybosomu w stanie EF-G-GTP i EF-G-GDP. Po związaniu EF-G do rybosomu głowa podjednostki 30S przemieszcza się o około 10 Å w kierunku białka L1 podjednostki 50S, podczas gdy ostroga (*spur*) obraca się ku górze, w kierunku ramienia, o kąt około 20°. Zdolność głowy (*head*) do niezależnego przemieszczania się jest możliwa, ponieważ jest ona związana z resztą podjednostki tylko poprzez pojedynczą helisę 16S rRNA.

VII. Podsumowanie

Rybosom jest specyficzną organellą komórkową. Pomimo intensywnych prac badawczych trwających już kilkadziesiąt lat nadal wiemy niewiele, a istotne pytania pozostają bez wyjaśnień. Przykładowo struktura i skład rybosomu nie ulegają zmianie w trakcie procesu starzenia się organizmu, ale szybkość biosyntezy białka ulega zasadniczemu obniżeniu. Podobnie, na podstawie proponowanych obecnie trzech skomplikowanych mechanizmów wydłużania łańcucha polipeptydowego i towarzyszących temu procesowi przemian konformacyjnych rybosomu w trakcie wydłużania łańcucha polipeptydowego nadal nie można wyjaśnić w sposób zadowalający dynamiki, przemian energetycznych czy też niewielkiej liczby błędów tego procesu. Pojawiają się również nowe koncepcje dotyczące funkcji rybosomów, jak sugestie, że tunel przez który peptyd opuszcza rybosom determinuje konformację białka [42]; są to jednakże raczej spekulacje, a nie udokumentowane hipotezy naukowe.

Z pewnością tak istotne osiągnięcia jak określenie struktury rybosomu z rozdzielczością 7.8 Å [9] stanowią istotny krok w zrozumieniu tych zasadniczych procesów.

W 2000 roku rozwiązano strukturę podjednostki 50S rybosomu prokariotycznego przy rozdzielczości

2.4 Å [43]. Wyniki te pozwoliły uszczegółowić strukturę i oddziaływania poszczególnych komponentów podjednostki. Okazało się, między innymi, że w tym modelu rybosomu pętla C 5S rRNA nie oddziałuje przestrzennie z pętlą D, jak sądzono dotychczas [44]. Oprócz tego opracowano mechanizm syntezy wiązania peptydowego [45] i wysunięto tezę, że rybosom jest rybozymem zależnym od strukturalnego „wsparcia” ze strony komponentów białkowych. Przekonującym argumentem tej hipotezy może być aspekt chemiczny: substratem rybosomów są AA-tRNA i mRNA, które szczególnie dobrze dopasowują się specyficznym rozpoznawanych innych RNA przez tworzenie par zasad i trypleksów. Ponadto RNA jest dostosowany do zmian konformacyjnych, które przecież zachodzą podczas biosyntezy białka [45].*

Artykuł otrzymano 10 kwietnia 2000 r.
Zaakceptowano do druku 8 stycznia 2001 r.

Piśmiennictwo

- Bohun E, Twardowski T (1994) *Post Biochem* **40**: 18-21
- Sobkiewicz A, Twardowski T (1998) *Post Biochem* **44**: 55-63
- Lake JA (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 1903-1907
- Lill R, Robertson J, Wintermeyer W (1984) *Biochemistry* **23**: 6710-6717
- Saruyama H, Nierhaus KH (1986) *Mol. Gen. Genet.* **204**: 221-228
- Triana-Alonso FJ, Chakraborty K, Nierhaus KH (1995) *J Biol Chem* **270**: 20743-20748
- El'skaya AV, Ovcharenko GV, Palchevskii SS, Petrushenko ZM, Triana-Alonso FJ, Nierhaus KH (1997) *Biochemistry* **34**: 10492-10497
- Graifer DM, Nekhai SYu, Mundus DA, Fedorova OS, Karpova GG (1992) *Biochem Biophys Acta* **1171**: 56-67
- Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZh, Earnest TN, Noller HR (1999) *Science* **285**: 2095-2104
- Gabashvili IS, Agrawal RK, Grassucci R, Frank J (1999) *J Mol Biol* **286**: 1285-1291
- Agrawal RK, Heagle AB, Penczek P, Grassucci R, Frank J (1999) *Nature Struct Biol* **6**: 643-647
- Merryman Ch, Moazed D, McWhirter J, Noller HF (1999) *J Mol Biol* **285**: 97-105
- Merryman Ch, Moazed D, Daubresse G, Noller HF (1999) *J Mol Biol* **285**: 107-113
- Culver GM, Cate JH, Yusupova GZh, Yusupov MM, Noller HR (1999) *Science* **285**: 2133-2135
- Nierhaus KH, Schilling-Bartetzko S, Twardowski T (1992) *Biochimie* **74**: 403-410
- Meyer HA, Triana-Alonso F, Spahn ChMT, Twardowski T, Sobkiewicz A, Nierhaus KH (1996) *NAR* **24**: 3996-4002
- Clemons Jr WM, May JLC, Wimberly BT, McCutcheon JP, Capel MS, Ramakrishnan V (1999) *Nature* **400**: 833-840
- Tanaka I, Nakagawa A, Hosaka H, Wakatsuki S, Mueller F, Brimacombe R (1998) *RNA* **4**: 542-550
- Uchiumi T, Sato N, Wada A, Hachimori A (1999) *J Biol Chem* **274**: 681-686
- Wimberly BT, Guymon R, McCutcheon JP, White SW, Ramakrishnan V (1999) *Cell* **97**: 491-502
- Conn GL, Draper De, Lattman EE, Gittis AG (1999) *Science* **284**: 1171-1173
- Nakagawa A, Nakashima T, Taniguchi M., Hosaka H, Kimura M., Tanaka I (1999) *EMBO J* **18**: 1459-1467
- Nevskaya N, Tishchenko S, Nikulin A, Al.-Karadaghi s, Liljas A, Ehresmann B, Ehresmann Ch, Garber M., Nikonov S (1998) *J Mol Biol* **279**: 233-244
- Stark H, Orlova EV, Rinke-Appel J, Jünke N, Mueller F, Rodina M, Wintermeyer W, Brimacombe R, van Heel M (1997) *Cell* **88**: 19-28
- Beckmann R, Bubeck D, Grassucci R, Penczek P., Verschoor A, Blobel G, Frank J (1997) *Science* **278**: 2123-2128
- Ban N, Nissen P., Hansen J, Capel M, Moors PB, Steitz TA (1999) *Nature* **400**: 841-847
- Liljas A (1990) W: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR (red) *The Ribosome: Structure, Function & Evolution* American Society for Microbiology, Washington, D.C., str. 309-317
- Rheinberger H-J, Nierhaus KH (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 4213-4217
- Spahn Ch, Nierhaus KH (1998) *Biol Chem* **379**: 753-772
- Nierhaus KH (1990) *Biochemistry* **29**: 4997-5008
- Moazed D, Noller HF (1989) *Nature* **342**: 142-148
- Noller HF, Moazed D, Stern S, Powers T, Allen PN, Robertson JM, Weiser B, Triman K (1990) W: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR (red) *The Ribosome: Structure, Function & Evolution* American Society for Microbiology, Washington, D.C., str. 73-92
- Wilson KS, Noller HF (1998) *Cell* **92**: 337-349
- Yarus M., Smith D (1995) W: Söll D, RajBhandary U (red) *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function* American Society for Microbiology, Washington, D.C., str. 443-469
- Rodina MV, Savelsbergh A, Katunin VI, Wintermeyer W (1997) *Nature* **385**: 37-41
- Dąbrowski M., Spahn CMT, Nierhaus KH (1995) *EMBO J* **14**: 4872-4882
- Schilling-Bartetzko S, Bartetzko A, Nierhaus KH (1992) *J Biol Chem* **267**: 4703-4712
- Schilling-Bartetzko S, Franceschi F, Sternbach H, Nierhaus KH (1992) *J Biol Chem* **267**: 4693-4702
- Stark H, Rodina M., Rinke-Appel J (1997) *Nature* **389**: 403-406
- Miller SP, Bodley JW (1991) *NAR* **19**: 1657-1660
- Müller F, Brimacombe RJ (1997) *J Mol Biol* **271**: 524-544
- Hardesty B, Tsalkova T, Kramer G (1999) *Curr Opin Struct Biol* **9**: 111-114
- Ban N, Niesen P, Hansen J, Moore PB, Staitz TA (2000) *Science* **289**: 905-920
- Correll CC, Freeborn B, Moore PB, Steitz TA (2000) *Cell* **91**: 705-712
- Ban N, Niesen P, Hansen J, Moore PB, Staitz TA (2000) *Science* **289**: 920-929
- Cech TR (2000) *Science* **289**: 878-879

*Zagadnienia te są przedmiotem osobnego artykułu złożonego w Redakcji „Postępów Biochemii”.

Rola białek GreA i GreB w elongacji transkrypcji bakteryjnej

A role of the GreA and GreB factors in bacterial transcription elongation

BEATA NOWICKA-SANS¹, KRYSZYNA I. WOLSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Elongacja transkrypcji
- III. Białka GreA i GreB *Escherichia coli*
 - III-1. Rola w transkrypcji
 - III-2. Struktura
 - III-3. Bakteryjne homologi i eukariotyczne analogi białek Gre
 - III-4. Mechanizm działania białek GreA i GreB
- IV. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: pol. RNA — polimeraza RNA, NTD — domena aminoterminalna (ang. *N-terminal domain*), CTD — domena karboksyterminalna (ang. *C-terminal domain*), pz — pary zasad, aa — aminokwas.

I. Wstęp

Niezakłócony przebieg transkrypcji, pierwszego etapu wyrażania się informacji genetycznej, decyduje o prawidłowym funkcjonowaniu, adaptacji do środowiska oraz różnicowaniu i rozwoju komórki.

Zasadniczą rolę w tym procesie odgrywa DNA-zależna polimeraza RNA. W komórkach prokariotycznych występuje tylko jeden rodzaj tego enzymu [1]. Polimeraza RNA (pol. RNA) izolowana z bakterii właściwych w formie tzw. holoenzymu składa się z dwóch części podstawowych: rdzenia złożonego z 4 podjednostek (2α , β i β') oraz z czynnika σ . Eksperymenty polegające na rekonstrukcji enzymu wykazały funkcjonalną równocześnieść poszczególnych podjednostek izolowanych z różnych gatunków bakterii [2]. Struktura pol. RNA *Escheri-*

Contents:

- I. Introduction
- II. Transcription elongation
- III. *Escherichia coli* GreA and GreB proteins
 - III-1. Role in transcription
 - III-2. Structure
 - III-3. Bacterial homologs and eukaryotic analogs of GreA and GreB
 - III-4. Mechanism of GreA and GreB activity
- IV. Concluding remarks

chia coli jest dobrze poznana. Wzajemne topograficzne ułożenie poszczególnych podjednostek w obrębie cząsteczki enzymu zostało określone wieloma metodami chemicznymi i genetycznymi, jak również za pomocą krystalografii [3, 4].

Transkrypcję dzieli się tradycyjnie na trzy etapy: inicjację, elongację i terminację. Cały proces podlega precyzyjnym mechanizmom regulacyjnym mającym zasięg globalny lub ograniczającym się do kontroli jednego operonu. Kontrola transkrypcji jest zjawiskiem bardzo złożonym [5-8]. Każdy z etapów regulowany jest zarówno przez sygnały genetyczne działające na poziomie DNA lub RNA, jak i przez liczne białka regulacyjne [9-11].

Początkowo uważano, że kontrola transkrypcji dotyczy jedynie etapu inicjacji. W latach 70-tych opisano liczne mechanizmy kontroli terminacji. Z początkiem lat 90-tych zaczęły się natomiast pojawiać doniesienia świadczące o regulacji również na poziomie elongacji. Obaliło to zatem powszechne przekonanie o niezakłóconym przebiegu syntezy RNA, jednostajnym od promotora do sekwencji terminatorowej lub inaczej — od rozpoczęcia polimeryzacji aż do rozpadu kompleksu transkrypcyjnego.

W przedstawianym artykule czytelnik znajdzie przegląd danych dotyczących kontroli elongacji transkrypcji bakteryjnej ze szczegółowym uwzględ-

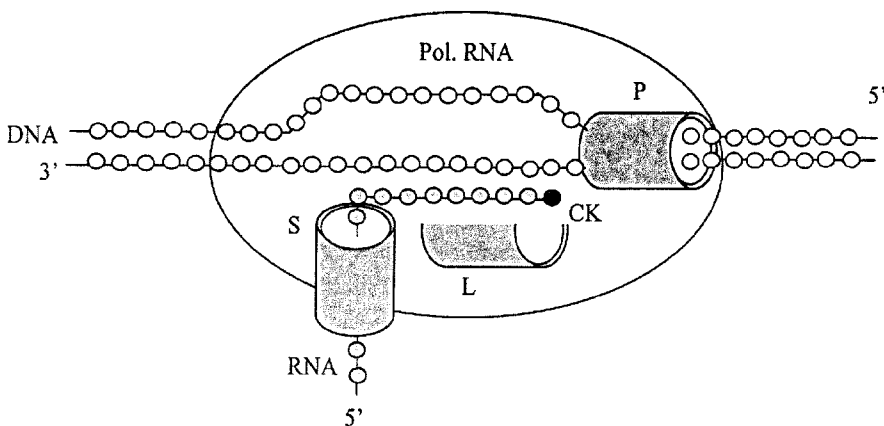
¹Dr, Department of Microbiology, Health Center, University of Connecticut, Farmington, CT 06032, USA; e-mail: b.nowicka@neuron.uchc.edu; ²dr hab., Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: izabelaw@biol.uw.edu.pl.

nieniem roli białek GreA i GreB (ang. *growth regulator*) w tym procesie.

II. Elongacja transkrypcji

Holoenzym pol. RNA (rdzeń w kompleksie z podjednostką σ) wiąże się początkowo z dowolną sekwencją DNA. Podjednostka σ umożliwia przesuwanie się enzymu po matrycy w poszukiwaniu sekwencji promotorowych. Związanie holoenzymu z promotorem prowadzi do wytworzenia tzw. dwuskładnikowego kompleksu zamkniętego (DNA + pol. RNA), który po denaturacji przynajmniej 11 pz w regionie promotora przechodzi w tzw. kompleks otwarty. Oddziaływania holoenzymu z matrycą są dość luźne i zwiększają się dopiero po oddysocjowaniu podjednostki σ .

Oddysocjowanie czynnika σ od kompleksu i opuszczenie promotora przez rdzeń pol. RNA definiuje rozpoczęcie elongacji [12, 13]. Etap ten związany jest z przesuwaniem się enzymu po matrycowej nici DNA w kierunku $3' \rightarrow 5'$, od sekwencji promotora do sekwencji terminatora i prowadzi do wydłużenia krótkiego transkryptu powstałego w sekwencji promotora podczas inicjacji. Transkrypcyjny kompleks elongacyjny przedstawiony na Ryc. 1,



Ryc. 1. Model transkrypcyjnego kompleksu elongacyjnego. CK — centrum katalityczne, Pol. RNA — polimeraza RNA, P — przedni koniec miejsca wiążącego DNA, L — miejsce luźnego wiązania RNA (także miejsce wiązania heterodupleksu DNA:RNA), Ś — miejsce ścisłego wiązania RNA. Wg Nowickiej-Sans [66]. Opis w tekście.

złożony z enzymu, DNA i nowo syntetyzowanego RNA jest bardzo stabilny (nawet w dużym stężeniu soli) i rozpada się dopiero w miejscach terminatorowych [14, 15]. Trwałość i aktywność kompleksu elongacyjnego uwarunkowane są istnieniem kilku miejsc oddziaływań pol. RNA z kwasami nukleinowymi. Enzym zawiera dwa miejsca wiążące RNA i dwa miejsca wiążące DNA [16-20]. Opublikowana ostatnio struktura krystaliczna rdzenia pol. RNA Taq (*Thermus aquaticus*) umożliwiła, po zastosowaniu techniki wiązań krzyżowych (ang. *crosslinking*), dokładniejszą analizę tych oddziaływań [21].

powstaje po osiągnięciu przez transkrypt długości co najmniej 8-9 nukleotydów [16, 19, 21].

Obecnie uważa się, że centrum katalityczne polimerazy przetwarza energię chemiczną w energię kinetyczną cząsteczki. Przy każdym rybonukleotydzie wbudowanym do transkryptu, polimeraza przesuwa się do przodu, włączając kolejny nukleotyd z matrycy DNA do heterodupleksu i przedniego miejsca wiązania DNA. Następuje elongacja, będąca wynikiem kinetycznych zależności między procesem wbudowywania rybonukleotydu, przesuwania się kompleksu do przodu, topnienia dupleksu DNA i

przepchnięcia transkryptu przez miejsce ścisłego wiązania RNA. Wszystkie te zdarzenia wymagają koordynacji oddziaływań różnych miejsc w centrum katalitycznym. Oczywiście jest więc, że wszelkie zakłócenia w tych zależnościach mogą prowadzić do przerwania elongacji [5, 10, 25].

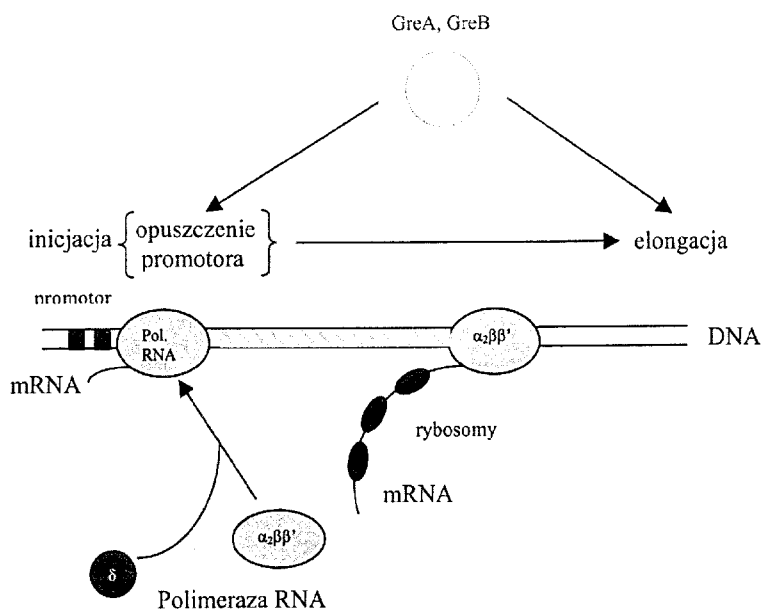
Przerwanie elongacji związane jest z oddysocjowaniem końca 3' transkryptu od centrum katalitycznego polimerazy. Stan taki, o ile jest przejściowy i mija samoistnie, nazywamy zatrzymaniem transkrypcji (ang. *pausing*). W bakteriach jelitowych sygnały zatrzymujące transkrypcję należące do tzw. klasy I odnajdywane są często w odcinkach liderowych operonów biosyntezy aminokwasów. Różnią się one od sygnałów zatrzymujących transkrypcję u organizmów wyższych [25a]. Czasami dochodzi jednak do tzw. zablokowania transkrypcji (ang. *arrest*). Przerwaniu elongacji w tym wypadku towarzyszy cofanie się polimerazy po matrycy DNA (ang. *back-tracking*) pod wpływem dysocjacji heterodupleksu DNA:RNA, na wzór rozsuwania się zamka błyskawicznego [19, 26, 27]. Wprawdzie cofająca się polimeraza RNA powoduje denaturację DNA w odwrotnym kierunku, utrzymując tym samym matrycową nić w heterodupleksie. Stan taki jest trwały i jego

III. Białka GreA i GreB *E. coli*

W poprzednim rozdziale wykazano, że elongacja transkrypcji jest procesem nieciągłym, a wszelkie jej zakłócenia mają negatywny wpływ na syntezę RNA. Zniesienie lub nawet zapobieganie takim zakłóceniom transkrypcyjnym możliwe jest jednak dzięki współdziałaniu dwóch dodatkowych czynników elongacyjnych, GreA i GreB. Oba białka pełnią rolę pozytywnych regulatorów transkrypcji działających zarówno na etapie elongacji jak inicjacji (opuszczenia promotora).

III-1. Rola w transkrypcji

Badania lat ostatnich dostarczyły dowodów, że GreA i GreB pełnią różnorodne funkcje w transkrypcji. Etapy transkrypcji kontrolowane przez GreA i GreB przedstawiono schematycznie na Ryc. 2. Do nich należą: 1) uwolnienie polimerazy ze stanu zablokowania elongacyjnego [23, 24], 2) kontrola dokładności transkrypcji [28] oraz 3) supresja inicjacji poronnej, a przez to stymulacja elongacji i nowej inicjacji [29]. Wszystkie te funkcje możliwe są dzięki istnieniu oddziaływań między białkami GreA i



Ryc. 2. Etapy transkrypcji kontrolowane przez GreA i GreB.

zniesienie wymaga udziału dodatkowych czynników transkrypcyjnych.

Dotychczas nie znana jest żadna stała sekwencja determinująca przerwy w elongacji. Wiadomo jednak, że zablokowanie transkrypcji i cofanie się kompleksu elongacyjnego występuje często w pozycjach bogatych w pary A-U [20, 26, 27].

GreB a pol. RNA, co wykazano w badaniach genetycznych i biochemicznych.

Gen *greA* został zidentyfikowany jako supresor temperaturowrażliwej mutacji w podjednostce β pol. RNA [30] i zlokalizowany w 69,2 min mapy genetycznej *E. coli* [31]. Badania biochemiczne nad zjawiskiem zablokowania transkrypcji doprowadziły natomiast do izolacji białek GreA [22] i GreB [23]. Zauważono bowiem, że kompleks sztucznie zatrzy-

many w czasie transkrypcji *in vitro* posiadał aktywność endonukleolityczną [32]. Krótkie produkty trawienia od końca 3' nowo syntetyzowanego RNA pojawiały się nawet w trakcie inicjacji, gdy podjednostka σ była jeszcze związana z polimerazą. Trawienie umożliwiało kontynuację elongacji, poczynając od nowo utworzonego końca 3'. Na podstawie tych obserwacji założono, że trawienie jest wynikiem zanieczyszczenia preparatu polimerazy RNA innym białkiem i w ten sposób, izolując aktywność endonukleolityczną, otrzymano oba czynniki Gre [23, 24].

Dalsze badania wykazały, że rola czynników Gre w trawieniu transkryptu jest pośrednia. Trawienie jest w istocie wynikiem wewnętrznej aktywności endonukleolitycznej pol. RNA [33], a białka Gre działają jedynie jako wzmacniacze (ang. *enhancers*) stymulujące tę aktywność. Wyizolowane białka GreA i GreB nie przejawiają żadnej aktywności nukleolitycznej względem RNA i heterodupleksu RNA:DNA. Trawienie obserwuje się tylko w obecności pol. RNA. Ponadto wolna od czynników Gre polimeraza, odtworzona przez zmieszanie indywidualnych podjednostek, wykazuje pozostałości aktywności nukleolitycznej po wydłużeniu czasu inkubacji zatrzymanego kompleksu transkrypcyjnego [23, 34]. Silnym argumentem wspierającym hipotezę o istnieniu nukleolitycznej aktywności enzymu jest również fakt, że trawienie w nieobecności czynników Gre jest zwiększone w pH alkalicznym [33]. Normalna aktywność enzymatyczna pol. RNA waha się od 100% do 13% w pH rzędu 6,0-10,0, z optimum 7,8-8,2. W warunkach optymalnych dla polimeryzacji (pH 7,5) i pirofosforolizy (pH 6,5) aktywność nukleolityczna polimerazy jest hamowana. Można ją indukować eksperymentalnie przez podniesienie pH powyżej 8,0. W pH 8,0-9,5 przeważa trawienie typu A (krótkie fragmenty), zaś w pH 10,0 trawienie typu B (dłuższe fragmenty), co odpowiednio zapobiega wejściu w stan zablokowania lub umożliwia wyjście z tego stanu. Ostatnie badania wykazały obecność nukleolitycznej aktywności GreA i GreB w komórkach bakteryjnych [34a]. Udział białek Gre w indukcji aktywności nukleolitycznej pol. RNA zostanie dokładniej omówiony w dalszym rozdziale.

Ocenia się, że częstość błędów popełnianych przez pol. RNA *E. coli* jest około 1000 razy mniejsza niż to szacowano na podstawie różnic w ilości energii swobodnej przy tworzeniu się poprawnych i błędnych par zasad [35]. Różnica jest wynikiem naprawy błędów transkrypcyjnych, w której uczestniczą także białka GreA i GreB stymulujące hydrolizę końca 3' transkryptu w nieaktywnych stanach kompleksu elongacyjnego, podobnie jak to czynią czynniki tran-

skrypcyjne Eukaryota [28, 33, 36-40]. Istnieją dane wskazujące, że tempo hydrolizy RNA zależnej od czynników Gre jest znacznie mniejsze od szybkości elongacji. Zmniejsza to zatem prawdopodobieństwo zajścia hydrolizy po inkorporacji właściwego nukleotydu. Podstawienie błędnego nukleotydu wydłuża natomiast czas jego przyłączenia z milisekund do minut, co umożliwia hydrolizę w miejscach błędnej inkorporacji i w konsekwencji resyntezę usuniętego fragmentu [28, 41, 42].

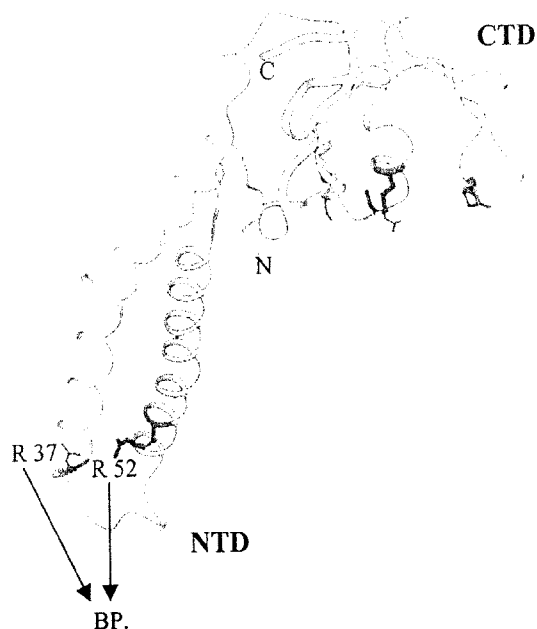
Jak już wspomniano poprzednio, pozytywna rola GreA i GreB w procesie elongacji polega również na supresji inicjacji poronnych. Podczas inicjacji poronnej pol. RNA zatrzymuje się lub zostaje zablokowana w jednym lub nawet kilku miejscach przed opuszczeniem promotora, cofa się po matrycy DNA bez oddysocjowania i rozpoczyna nową rundę syntezy. Taki cykl może powtarzać się wielokrotnie, doprowadzając do uwalniania krótkich (poronnych) transkryptów długości rzędu 2-9 nukleotydów [43-46]. Zjawisko to jest wprawdzie powszechnie obserwowane *in vitro* u bakterii [47], bakteriofagów [48] i Eukaryota [49], ale jego rola w procesie opuszczania promotora (ang. *promoter clearance*) jest jeszcze słabo poznana. Wiadomo na przykład, że zmiany w sekwencji regionu rozpoznawania promotora w znaczny sposób zmieniają zdolność pol. RNA do jego opuszczenia [45, 50]. Przypuszcza się ponadto, że zatrzymanie pol. RNA w obrębie promotora jest konsekwencją wiązania represorów transkrypcji [51-54].

Bakteryjne białka Gre ułatwiają opuszczenie promotora przez transkrybujący enzym, zapobiegając inicjacji poronnej. W ten sposób stymulują wydajną elongację i nowe rundy inicjacji. Ich rola polega prawdopodobnie na utrzymaniu końca 3' RNA w centrum katalitycznym polimerazy, a w wypadku oddysocjowania końca 3' transkryptu od centrum katalitycznego i cofnięcia się kompleksu transkrypcyjnego – na indukcji trawienia nukleolitycznego warunkującego dalszą elongację [29].

III-2. Struktura

Białko GreA *E. coli* zostało ostatnio skrytalizowane, co pozwoliło na dokładną analizę jego struktury [55, 56]. GreA jest białkiem złożonym ze 158 aa (17,63 kDa), zbudowanym z dwóch wyraźnych domen, z których każda obejmuje w przybliżeniu połowę cząsteczki (Ryc. 3). Domena aminoterminalna (NTD), której długość wynosi 63 Å, stanowi dimer wytworzony przez antyrównoległe zwinienie α -heliksu (pozycje 1-75 aa). Kilka miejsc NTD jest

szczególnie interesujących. Na wyróżnienie zasługuje tu między innymi charakterystyczne wybrzuszenie przy walinie w pozycji 24 i zwiniecie przy prolinie w pozycji 27. Superzwinięta struktura NTD jest stabilizowana przez liczne wiązania wodorowe, mostki jonowe i krótką równoległą strukturę β .



Ryc. 3. Model struktury GreA opracowany przez analizę komputerową. Zaznaczono miejsce zasadowe (BP ang. basic patch) = nukleotydy R37 i R52. Opis w tekście.

Domena karboksyterminalna (CTD) stanowi przestrzennie krótsze ramię cząsteczki GreA (pozycje 76 – 158). Jej długość wynosi 35 Å i łączy się ona z NTD za pośrednictwem 12-aminokwasowej pętli. Łącznik ten opisuje się często jako szczelinę łatwo dostępną dla cząsteczek wody. CTD składa się zasadniczo z jednego heliksu α otoczonego przez 5-łańcuchową strukturę β .

Wyraźna asymetria w strukturze GreA przejawia się również w sposobie rozłożenia ładunków na powierzchni tego białka. Jedna jego strona jest silnie kwasowa, podczas gdy strona przeciwna jest obojętna, z wyjątkiem niewielkiego regionu zasadowego, BP (ang. basic patch), utworzonego głównie przez argininę w pozycji 52. Ten dodatkowo naładowany aminokwas jest konserwowany ewolucyjnie. Obojętna powierzchnia GreA zawiera ponadto wyeksponowany region hydrofobowy, także konserwowany ewolucyjnie.

NTD białka GreA, chociaż nieco krótsza, swoją strukturą przypomina syntetazę serylo-tRNA. Spiralnie zwinięte ramię tego białka także odgrywa pewną rolę w oddziaływaniach z RNA, co zostało

wykazane u *Thermus thermophilus* za pomocą krystalizacji z tRNA^{Ser} [55].

Wprawdzie białko GreB nie zostało jeszcze skrytalizowane, ale jego hipotetyczna struktura trójwymiarowa została opracowana przy użyciu technik komputerowych w oparciu o dużą homologię z białkiem GreA. Oba białka wykazują spore podobieństwo zarówno w konformacji jak i w rozłożeniu ładunków powierzchniowych. Jedyną istotną różnicą dotyczy regionu zasadowego w NTD. Jest on znacznie większy w białku GreB, ale także jest w stanie kontaktować się z końcem 3' transkryptu, jak to zostało wykazane poprzednio dla GreB przy pomocy techniki wiązań krzyżowych [34].

III-3. Bakteryjne homologii i eukariotyczne analogi GreA i GreB

GreA i GreB *E. coli*, ze względu na tę samą wielkość i homologię w sekwencji aminokwasowej stanowią interesujący przykład ewolucyjnej dywergencji funkcji. Ostatnie lata przyniosły ponadto wiele doniesień o innych bakteryjnych homologach tych dwóch czynników transkrypcyjnych. W *Rickettsia prowazekii* wykryto białko składające się z 162 aa (18,23 kDa), które wykazuje 50,3% homologii aminokwasowej z GreA [56]. Podobieństwo to jest szczególnie wyraźne w regionie między 34 a 64 aa, gdzie sięga 83%.

Ogólnie, geny kodujące GreA i GreB zidentyfikowano i zsekwencjonowano dotychczas już w ponad 30 gatunkach bakteryjnych, m. in. *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium leprae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis* [57]. Powszechność występowania obu czynników sugeruje ich duże znaczenie biologiczne. Gen *greA* jest obecny nawet w chromosomie *Mycoplasma genitalium*, najmniejszym znanym genomie wolno żyjącego organizmu [34, 59].

Funkcjonalnie GreA i GreB przypominają eukariotyczny czynnik elongacyjny SII, chociaż nie wykryto tutaj żadnej homologii sekwencji aminokwasowej [36, 39, 60].

W komórkach eukariotycznych zidentyfikowano dwie klasy czynników elongacyjnych oddziałujących z kompleksem transkrypcyjnym pol. II RNA i przez to zwiększających wydajność transkrypcji [61]. Przedstawicielem pierwszej klasy jest białko TFIIF pochodzące z hodowli komórek HeLa. Zwiększa ono częstość kolejnych rund transkrypcji, ale nie jest w stanie uwolnić polimerazy ze stanu zablokowania [62]. Drugą kategorię czynników elongacyjnych reprezentują białka nazywane ogólnie czynnikiem SII. Czynniki te wyizolowane z hodow-

li komórek wielu przedstawicieli Eukaryota, z człowiekiem włącznie, jest białkiem wielkości 35-38 kDa zdolnym do wiązania pol. RNA II. Związanie czynnika stymuluje rybonukleolityczną aktywność kompleksu elongacyjnego, powodując supresję przerw i stanów zablokowania transkrypcji. Obserwowano dwa rodzaje produktów trawienia — długie (do 14 nukleotydów) i krótkie (7-9 nukleotydów), co przypomina działanie GreB. Przypuszcza się, że wiązanie białka SII wywołuje zmiany w konformacji centrum katalitycznego pol. II RNA i może powodować wytwarzanie nietypowych naprężeń w RNA prowadzących do trawienia. Podobne wewnętrzne właściwości nukleolityczne polimeraz zostały już uprzednio stwierdzone dla polimeraz DNA, odwrotnych transkryptaz oraz polimerazy RNA I i III Eukaryota [39, 63, 64].

III-4. Mechanizm działania białek GreA i GreB

Rola czynników GreA i GreB jako pozytywnych regulatorów transkrypcji ma u swych podstaw dwa różne mechanizmy. Przejawia się to wyraźnie w wielkości produktów trawienia transkryptu, które są krótkie (2-3-nukleotydowe) w wypadku działania GreA (typ trawienia A) i dłuższe (2-18-nukleotydowe) w wypadku GreB (typ trawienia B) [24, 65]. GreB zapobiega wejściu w stan zablokowania, ale przede wszystkim bezpośrednio atakuje zablokowany kompleks, indukuje trawienie i umożliwia powtórzenie syntezy usuniętego fragmentu. GreA zaś nie jest w stanie znieść już istniejącego bloku transkrypcyjnego, może natomiast zapobiec jego wytworzeniu, co nie zawsze musi się wiązać z indukcją trawienia. Możliwe jest, że w tym wypadku GreA zapobiega jedynie tworzeniu przez pol. RNA konformacji charakterystycznej dla stanu zablokowania transkrypcji [24].

Dalsze badania fizyko-chemiczne i biochemiczne umożliwiły głębsze zrozumienie mechanizmu działania czynników Gre. Wykazano mianowicie nie tylko możliwość oddziaływania obojętnej powierzchni białek Gre z kompleksem transkrypcyjnym, ale także możliwość oddziaływania aminokwasów zasadowych (BP) w NTD z końcem 3' mRNA uwięzionym w kompleksie [34, 56]. Analiza białek hybrydowych GreA:GreB, utworzonych przez połączenie NTD jednego białka z CTD drugiego białka wykazała, że wprawdzie obie domeny uczestniczą w wiązaniu z kompleksem transkrypcyjnym i decydują o kompletnej aktywności białek, ale supresja bloku transkrypcyjnego oraz typ trawienia (A lub B) zależy wyłącznie od NTD [34]. Jak wspomniano

uprzednio, NTD czynników Gre posiada na swej powierzchni obszary zasadowe — małe w wypadku GreA i większe w wypadku GreB. Ich rola w funkcjonowaniu obu białek została ostatnio bliżej wyjaśniona [58]. Za pomocą mutagenyzy ukierunkowanej wprowadzono w geny *greA* i *greB* szereg mutacji, których efektem są zmiany w wielkości i rozłożeniu obszarów zasadowych w NTD. Takie białka poddano badaniom biochemicznym i genetycznym. Uzyskane wyniki wykazały, że analizowane aminokwasy nie uczestniczą bezpośrednio w indukcji trawienia nukleolitycznego, a jedynie wiążą koniec 3' RNA i utrzymują go we właściwym położeniu w kompleksie transkrypcyjnym, co ułatwia zajście reakcji trawienia. Jednocześnie sugeruje się, że omawiane domeny zasadowe mogą pełnić rolę „linijki molekularnej” (ang. *molecular ruler*), wyznaczającej długość odcinanego fragmentu RNA, a tym samym typ trawienia A lub B. Zgodnie z tym modelem, dłuższe produkty trawienia stymulowanego przez GreB wynikałyby z obecności większego obszaru zasadowego w NTD tego białka.

Reasumując, funkcja NTD polega na stymulacji aktywności nukleolitycznej polimerazy. CTD, choć nie wykazuje takiej aktywności, wzmacnia działanie NTD, a więc obie domeny są niezbędne do uzyskania maksimum aktywności czynników Gre.

Obecnie wiadomo, że CTD jest domeną odpowiedzialną za wiązanie się białek Gre z pol. RNA w miejscu, które zostało niedawno zlokalizowane w sposób pośredni. Rolę CTD w funkcjonowaniu czynników Gre wyjaśniono w oparciu o badania z zastosowaniem indywidualnie wyizolowanych obu domen GreA i obserwację zjawiska konkurencji między CTD a czynnikami Gre o to samo miejsce na polimerazie [66].

Podobne obserwacje przyniosła również mikroskopia elektronowa, w której obiektem badań były dwuwymiarowe kryształy kompleksów pol. RNA z CTD, NTD lub kompletnym białkiem GreB. Region CTD odpowiedzialny za wiązanie polimerazy RNA i determinujący aktywność transkrypcyjną GreA zidentyfikowano natomiast dzięki badaniom genetycznym [67]. Wyizolowano bowiem mutanty GreA pozbawione nie tylko zdolności wiązania z pol. RNA *in vitro*, ale również wszystkich znanych funkcji *in vivo*. Zidentyfikowany region zawiera aminokwasy konserwowane ewolucyjnie u pozostałych znanych czynników Gre i, jak ostatnio wykazano, pokrywa się z regionem wiązania pol. RNA w CTD białka GreB *E. coli* [68].

Biochemiczne cechy domen Gre przypominają analogiczne białka eukariotyczne mimo braku homo-

logii ich sekwencji [69, 70]. Pełna aktywność białek eukariotycznych zależy także od obu funkcjonalnych domen, z których jedna odpowiedzialna jest za wiązanie z polimerazą, druga zaś bierze udział w specyficznych interakcjach z mRNA i w stymulacji reakcji nukleolitycznej w kompleksie elongacyjnym [38, 71, 72]. Sugeruje się, że czynniki transkrypcyjne Pro- i Eukaryota mają ten sam molekularny mechanizm działania, co wyraźnie oznacza, że trawienie w kompleksie transkrypcyjnym jest funkcją konserwowaną ewolucyjnie [59].

IV. Uwagi końcowe

W niedawno odkrytej kontroli elongacji transkrypcji istotną rolę odgrywają białka *E. coli*, GreA i GreB. Istnienie bakteryjnych homologów i eukariotycznych analogów tych białek zdaje się świadczyć zarówno o ich ewolucyjnej konserwacji, jak i fizjologicznym znaczeniu. W związku z powyższym, zastanawiający jest fakt, że pozbawienie komórki tych białek, jak to ma miejsce w mutancie $\Delta greAgreB$, nie pociąga za sobą globalnego defektu w ekspresji genów [Newlands i Das, praca w przygotowaniu], chociaż mutant ten nie jest zdolny do wzrostu w temperaturze 42°C. Sugeruje to, że białka Gre mogą być wymagane do ekspresji specyficznych genów, których produkty byłyby istotne do wzrostu w podwyższonych temperaturach.

Wstępna analiza produktów kilku genów pozytywnie regulowanych przez GreA i GreB wykazała jednak, że niekoniecznie muszą być one krytyczne dla wzrostu [Newlands i Das, praca w przygotowaniu, 67]. Dopiero izolacja mutantów supresorowych, przywracających przeżywalność mutantu $\Delta greAgreB$ w 42°C, a tym samym zasadnicze funkcje GreA i GreB, umożliwiła identyfikację loci związanych ze wzrostem komórek i odpowiedzią na stres, sugerując jednocześnie istnienie dodatkowych, poza czynnikami GreA i GreB, regulatorów zaangażowanych w kontrolę wzrostu bakterii. Supresorowe mutacje $\Delta greAgreB$ mapują się między 82 a 92 minutą genomu *E. coli*, w co najmniej czterech różnych pozycjach, z których jedna zlokalizowana jest w genach *rpoBC* kodujących podjednostki β i β' polimerazy RNA [67].

Podziękowanie

Autorki dziękują mgr Annie Grudniak za pomoc w wykonaniu rycin.

Artykuł otrzymano 26 czerwca 2000 r.
Zaakceptowano do druku 1 lutego 2001 r.

Piśmiennictwo

- Kumar S A. (1981) *Prog Biophys Molec Biol* **38**: 165-210
- Lill HR, Hartman GR (1975) *Eur J Biochem* **54**: 45-53
- Darst S A., Kubalek E W, Kornberg R D (1989) *Nature* **340**: 730-732
- Grachev M A, Kolocheva T I, Lukhtanov E A, Mustaev A A (1987) *Eur J Biochem* **163**: 113-121
- Chamberlin M J (1994) *Harvey Lect* **88**: 1-21
- Kustu S, North A K, Weiss D S (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 397-402
- McClure W (1985) *Annu Rev Biochem* **54**: 171-204
- Yager T D, von Hippel P H (1987) W: Neidhardt N C, Ingraham J I, Low K B, Magasanik B, Schaechter M, Umberger H E (red) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Cellular and Molecular Biology*, Am Soc Microbiol, Washington DC, str 1241-1275
- Adhya S, Gottesman M (1978) *Annu Rev Biochem* **47**: 967-996
- Das A (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 893-930
- Record M J Jr, Reznikoff W S, Craig M I, McQuade K I, Schlux P J (1996) W: Neidhardt N C, Curtiss III R., Ingraham J L, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E (red) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Cellular and Molecular Biology*, Am Soc Microbiol, Washington DC, str 792-820
- Greenblatt J, Li J (1981) *Cell* **24**: 421-428
- Hansen U, McClure W (1980) *J Biol Chem* **225**: 9564-9570
- Rhodes G, Chamberlin M J (1974) *J Biol Chem* **20**: 6675-6683
- Roe J H, Burgess R R, Record M T (1984) *J Mol Biol* **176**: 495-521
- Allman C, Solow-Cordero D, Chamberlin M (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3784-3788
- Nudler E, Avetisova E, Markovstov V, Goldfarb A (1996) *Science* **273**: 211-217
- Nudler E, Goldfarb A, Kashlev M (1994) *Science* **265**: 793-796
- Nudler E, Gusarov I, Avetisova E, Kozlov M, Goldfarb A (1998) *Science* **281**: 424-428
- Nudler E, Mustaev A, Lukhtanov E, Goldfarb A (1997) *Cell* **89**: 33-41
- Korzheva N, Mustaev A, Kozlov M, Malhotra A, Niki forov V, Goldfarb A, Darst S A. (2000) *Science* **289**: 619-625
- Sidorenkov I, Komissarova N, Kashlev M, (1998) *Mol Cell* **2**: 55-64
- Borukhov S, Polyakov A, Niki forov V, Goldfarb A (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8899-8902
- Borukhov S, Sagitov V, Goldfarb A (1993) *Cell* **72**: 459-466
- Chan C L, Landick R L (1994) W: Conaway R, Conaway J (red) *Transcription: Mechanism and Regulation*, Raven Press, New York, str 297-230
- Artsimovich I, Landick R (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7090-7095
- Komissarova N, Kashlev M (1997a) *J Biol Chem* **272**: 15329-15338
- Komissarova N, Kashlev M (1997b) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1755-1760
- Eric D A, Hajiseyedjavadi O, Young M C, von Hippel P H (1993) *Science* **262**: 867-873
- Hsu L, Vo N, Chamberlin M (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11582-11588
- Sparkowski J, Das A (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 6643
- Sparkowski J, Das A (1991) *J Bacteriol* **173**: 5256-5257

32. Surrat CK, Milan SC, Chamberlin MJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7983-7987
33. Orlova M, Newland J, Das A, Goldfarb A, Borukhov S (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4596-4600
34. Koulich D, Orlova M, Malhorta A, Sali A, Darst S, Borukhov S (1997) *J Biol Chem* **272**: 7201-7210
- 34a. Toulmé F, Mosrin-Huaman C, Sparkowski J, Das A, Leng M, Rahmouni AR (2000) *EMBO J* **19**: 6853-6859
35. Libby RT, Gallant JA (1991) *Mol Microbiol* **5**: 999-1004
36. Izban MG, Luse DS (1992) *Genes Dev* **6**: 1342-1256
37. Jeon C, Agraval K (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13677-13682
38. Jeon C, Yoon H, Agraval K (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9106-9110
39. Reines D (1992) *J Biol Chem* **267**: 3795-3800
40. Wang D, Hawley DK (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 843-847
41. Kasavetis GA, Geiduschek EP (1993) *Science* **259**: 944-945
42. Uptain SM, Kane CM, Chamberlin MJ (1997) *Annu Rev Biochem* **66**: 117-172
43. Brosius J (1984) *Gene* **27**: 151-160
44. Carposius A, Gralla J (1980) *Biochemistry* **19**: 3245-3253
45. Ellinger T, Behnke D, Bujard H, Gralla JD (1994) *J Mol Biol* **239**: 455-465
46. Krummel B, Chamberlin MJ (1989) *Biochemistry* **28**: 7829-7842
47. Gralla JD, Carposius AJ, Stefano JE (1980) *Biochemistry* **19**: 5864-5869
48. Ling ML, Risman SS, Klement JF, McGraw N, McAllister WT (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 1605-1618
49. Goodrich JA, Tijan R (1994) *Cell* **77**: 145-156
50. Jin DJ, Turnbough CL Jr (1994) *J Mol Biol* **236**: 72-80
51. Reznikoff WS, Maquat LE, Munson LM, Johnson RC, Mandecki W (1982) W: Rodriguez RL, Chamberlin MJ (red) *Promoters: Structure and Function*, Praeger, New York, str. 80-95
52. DiLauro R, Tauguchi T, Musso R, de Crombrughe B (1979) *Nature* **279**: 494-500
53. Lee J, Goldfarb A (1991) *Cell* **66**: 793-798
54. Straney SB, Crothers DM (1987) *Cell* **51**: 699-701
55. Darst SA, Stebbins CE, Borukhov S, Orlova M, Feng G, Landick R, Goldfarb A (1994) *J Mol Biol* **242**: 582-585
56. Stebbins C, Borukhov S, Orlova M, Polyakov A, Goldfarb A, Darst SA (1995) *Nature* **373**: 636-640
57. Marks GL, Wood DO (1992) *Nucl Acids Res* **20**: 3785
58. Kulish D, Lee J, Lomakin J, Nowicka B, Das A, Darst S, Normet K, Borukhov S (2000) *J Biol Chem* **275**: 12789-12798
59. Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelly JM (1995) *Science* **270**: 397-403
60. Hirashima S, Hirai H, Nakanishi Y, Natori S (1988) *J Biol Chem* **263**: 3858-3863
61. Izban MG, Luse DS (1993) *J Biol Chem* **268**: 12864-12873
62. Cipres-Palacin G, Kane CM (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8087-8091
63. Hagler J, Shuman S (1993) *J Biol Chem* **268**: 2166-2173
64. Whitehall SK, Bardeleben C, Kassavetis GA (1994) *J Biol Chem* **269**: 2299-2306
65. Krummel B, Chamberlin MJ (1992) *J Mol Biol* **225**: 239-250
66. Koulich D, Nikiiforov V, Borukhov S (1998) *J Mol Biol* **276**: 379-389
67. Nowicka-Sans B (1999) Praca doktorska, Uniwersytet Warszawski
68. Loizos N, Darst SA (1999) *J Biol Chem* **274**: 23378-23386
69. Gu W, Reines D (1995) *J Biol Chem* **270**: 30441-30447
70. Powell W, Bartholomev B, Reines D (1996) *J Biol Chem* **271**: 22301-22304
71. Agarwal K, Baek KH, Jeon CJ, Miyamoto K, Ueno A, Yoon HS (1991) *Biochemistry* **30**: 7842-7851
72. Cipres-Palacin G, Kane CM (1995) *Biochemistry* **34**: 15375-15380

Naprawa DNA w komórkach ssaków: mechanizm rekombinacji homologicznej

DNA repair in mammalian cells: mechanisms of homologous recombination

ANDRZEJ TRZECIAK¹, JANUSZ BŁASIAK²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Rekombinacja homologiczna u *Escherichia coli*
- III. Białka naprawy DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków
- IV. Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków
 - IV-1. Kompleks MRE11/RAD50
 - IV-2. Białka koordynujące działanie kompleksów rekombinacyjnych MRE11/RAD50 i RAD51
 - IV-3. RAD51
 - IV-4. RPA i RAD52
 - IV-5. Inne białka uczestniczące w wymianie nici
 - IV-6. Białka końcowych etapów rekombinacji homologicznej
- V. Udział białek rekombinacji homologicznej w naprawie DNA przez dopasowywanie pojedynczych nici
- VI. Uwagi końcowe

Konwencja zapisu genów eukariotycznych: *rad51* — gen eukariotów; *Rad51* — gen zwierząt; *RAD51* — gen człowieka; zapis genów *RPA1*, *RPA2*, *RPA3*, *Ku70*, *Ku80* jest identyczny u wszystkich eukariotów.

Wykaz stosowanych skrótów: BLM — białko związane z występowaniem syndromu Blooma; BRCA1 — ludzkie białko związane z występowaniem raka sutka; DNA-PK — kinaza białkowa zależna od DNA; DMC1 — ludzki homolog białka związanego z występowaniem zaburzonej mejozy u drożdży; Ku70 i Ku80 — podjednostki antygenu Ku; MRE11 — ludzki homolog białka mre11 drożdży uczestniczącego w rekombinacji mejotycznej; *NBS1* — gen związany z występowaniem syndromu pęknięć Nijmegen; p95^{NBS1} — białko o masie 95 kDa kodowane przez gen *NBS1*; PIR51 — białko oddziałujące z RAD51; RAD51, RAD52, RAD54 — ludzkie homologi *rad51*, *rad52*, *rad54*; *rad51*, *rad52*, *rad54*, *rad55*, *rad57*, *rdh54*, *mre11*, *xrs2* — drożdżowe białka należące do grupy epistatycznej *rad52* uczestniczące w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną; RecA, RecBCD, RecG, RecQ, RuvA, RuvB, RuvC, Rus,

Contents:

- I. Introduction
- II. Homologous recombination in *Escherichia coli*
- III. Homologous recombination DNA repair proteins in mammalian cells
- IV. Homologous recombination DNA repair in mammalian cells
 - IV-1. MRE11/RAD50 complex
 - IV-2. Proteins coordinating action of MRE11/RAD50 and RAD51 recombination complexes
 - IV-3. RAD51
 - IV-4. RPA and RAD52
 - IV-5. Other proteins participating in strand exchange
 - IV-6. Proteins of final steps of homologous recombination
- V. Participation of homologous recombination proteins in single strand annealing
- VI. Concluding remarks

SbcC, SbcD — białka *Escherichia coli* biorące udział w rekombinacji homologicznej DNA; RECQL4 — ludzki homolog RecQ, typ IV; RPA — białko replikacyjne A; RUVBL1 — ludzki homolog RuvB; SSB — białko *E. coli* wiążące jednoniciowy DNA; TBP — białko wiążące sekwencję TATA; TIP49 — białko o masie 49 kDa wiążące się z TBP; UBL1 — ludzki homolog ubikwityny; WRN — białko związane z występowaniem syndromu Wernera; XRCC2 — ludzki homolog białka chomika syryjskiego związanego z II grupą komplementacyjną mutantów nadwrażliwych na promieniowanie jonizujące.

Komórki ES — zarodkowe komórki pnia; *Rad51*^{-/-} — mutant zawierający dwa nieaktywne allele genu *Rad51*; sekwencja χ — sekwencja 5'-GCTGGTGG-3' *E. coli*.

I. Wprowadzenie

DNA komórek ssaków narażony jest na działanie wielu czynników uszkodzających. Czynniki takie jak promieniowanie jonizujące i UV, wolne rodniki, jony i związki metali przejściowych, związki alkilujące powodują powstanie pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA, miejsc apurynowych i apirymidynowych, produktów deaminacji zasad, monoadduk-

¹Dr, ²dr hab., Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel: (42) 635 4334; fax: *42) 635 4484; e-mail: januszbl@biol.uni.lodz.pl

tów, wewnątrz- i międzyciociowych wiązań krzyżowych oraz fotoproduktów. Uszkodzenia te, z wyjątkiem podwójnych pęknięć DNA, są substratem dla systemów naprawy DNA przez wycinanie: zasad, nukleotydów oraz systemu naprawy błędnie sparowanych zasad. Usuwanie uszkodzeń DNA przez te trzy systemy naprawy odbywa się w dwóch etapach. Pierwszym z nich jest wycięcie uszkodzenia w wyniku czego tworzone jest pojedyncze pęknięcie DNA. Podczas drugiego etapu następuje synteza naprawcza i uzupełnienie powstałej luki DNA.

Podwójne pęknięcia DNA i międzyciociowe wiązania krzyżowe stanowią poważne zagrożenie dla życia komórek. Podwójne pęknięcia DNA są wynikiem blisko siebie położonych pojedynczych pęknięć na dwóch niciach DNA, które mogą powstawać w wyniku działania systemów naprawy DNA przez wycinanie. Pęknięcia podwójne mogą również tworzyć się podczas replikacji, kiedy na matrycy DNA występuje pojedyncze pęknięcie DNA, a także jako konsekwencja aktywności topoizomerazy typu II lub ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące. Międzyciociowe wiązania krzyżowe są indukowane przez czynniki alkilujące, takie jak mitomycyna C, cyklofosfamid i iperyt azotowy oraz niektóre jony i związki metali przejściowych. Nienaprawione pęknięcia podwójne i międzyciociowe wiązania krzyżowe blokują replikację i transkrypcję sekwencji, w których występują. Niekompletna naprawa takich uszkodzeń może prowadzić do utraty części chromosomów, a wolne końce DNA powstałe w wyniku pęknięć są sygnałem dla białek biorących udział w kontroli cyklu komórkowego.

Rekombinacja genetyczna DNA to proces, w wyniku którego z dwóch różnych cząsteczek DNA powstaje jedna. Rekombinacja jest niezbędna w naprawie pęknięć podwójnych DNA i międzyciociowych wiązań krzyżowych, we wzajemnej wymianie fragmentów DNA pomiędzy homologicznymi chromosomami zachodzącej podczas mejozy, w różnicowaniu się immunoglobulin oraz w transpozycji i retrotranspozycji; białka rekombinacyjne uczestniczą także w stabilizacji i wydłużaniu telomerów. U eukariontów opisano trzy systemy naprawy rekombinacyjnej DNA: naprawę DNA przez rekombinację homologiczną (ang. *homologous recombination repair*), niehomologiczną (ang. *nonhomologous end-joining*) oraz dopasowywanie pojedynczych nici DNA (ang. *single strand annealing*). W naprawie podwójnych pęknięć DNA biorą udział wszystkie systemy naprawy rekombinacyjnej DNA [1, 2]. W naprawie międzyciociowych wiązań krzyżowych główną rolę odgrywają naprawa przez rekombinację homolo-

giczną i dopasowywanie pojedynczych nici DNA. W komórkach różnych grup systematycznych przeważa jeden ze sposobów naprawy pęknięć podwójnych DNA — w komórkach ssaków naprawa przez rekombinację niehomologiczną, natomiast u *Saccharomyces cerevisiae* przez rekombinację homologiczną. Co więcej, w komórkach ssaków podczas fazy G₁ i wczesnej S stwierdzono uruchamianie przede wszystkim procesów rekombinacji niehomologicznej naprawy DNA, zaś podczas późnej fazy S oraz fazy G₂ procesów rekombinacji homologicznej [3].

Rekombinacja homologiczna DNA to rekombinacja zachodząca między homologicznymi odcinkami DNA. Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków i innych eukariontów oraz właściwości białek biorących w niej udział przypominają rekombinację homologiczną DNA zależną od białek RecA i RecBCD i przebiegającą u *Escherichia coli*.

II. Rekombinacja homologiczna u *Escherichia coli*

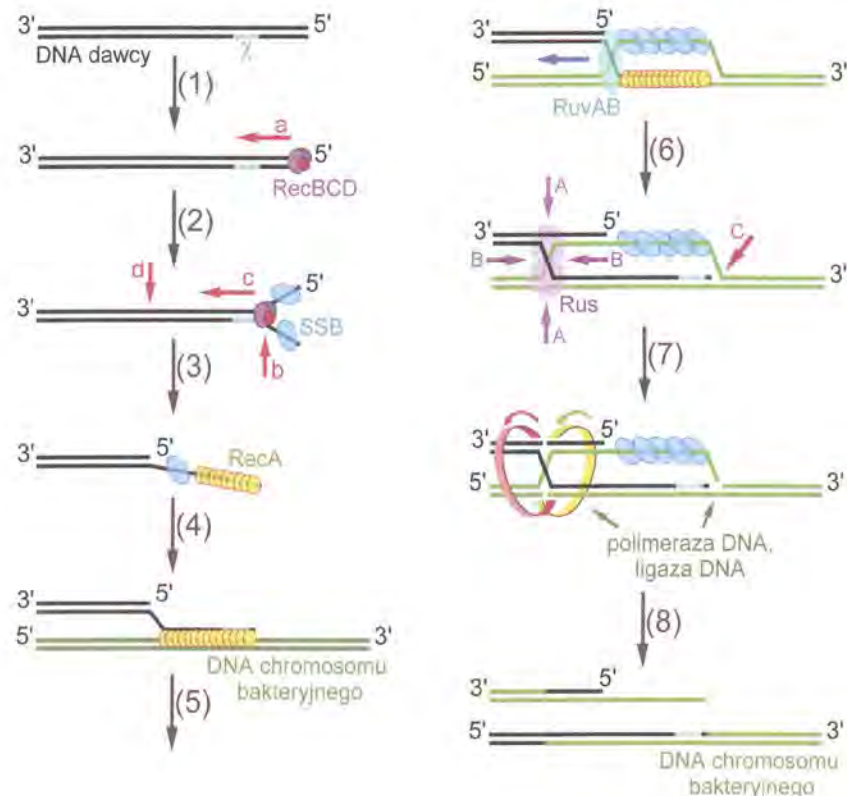
W rekombinacji homologicznej DNA zależnej od RecA i RecBCD u *Escherichia coli* biorą udział następujące białka: RecBCD, SSB, RecA, RuvA, RuvB, RuvC, RecG, Rus, polimerazy DNA I i III, ligaza DNA, topoizomerazy oraz białka systemu naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych. Rekombinacja homologiczna u *E. coli* jest konieczna podczas ostatniego etapu koniugacji do wymiany informacji genetycznej pomiędzy chromosomem bakteryjnym komórki biorecy i odcinkiem DNA pochodzącym z komórki dawcy. Może ona także odgrywać rolę w naprawie pęknięć podwójnych DNA i międzyciociowych wiązań krzyżowych. Ponadto rekombinacja DNA jest niezbędna do naprawy luk w obrębie syntetyzowanej podczas replikacji nici DNA w miejscu, w którym w nici stanowiącej matrycę wystąpiły np. dimery pirymidynowe.

Najlepiej poznanym procesem zachodzącym u *E. coli* z udziałem rekombinacji homologicznej jest koniugacja. Proces ten składa się z kilku podstawowych etapów: wytworzenia jednoniciowego DNA, formowania presynaptycznego kompleksu nukleo-proteinowego, tworzenia trójniciowego kompleksu synaptycznego, wymiany nici oraz tworzenia heterodupleksu i pętli D, formowania struktury Hollidaya, przemieszczania się rozgałęzienia, rozdzielania cząsteczek DNA.

W inicjacji rekombinacji homologicznej bierze udział kompleks białek RecBCD o właściwościach helikazy, egzonukleazy i endonukleazy jednonicio-

wego DNA. Kompleks ten rozwija podwójną helisę DNA począwszy od zakończenia obejmującego koniec 3' nici zawierającej sekwencję χ . Sekwencja χ (5'-GCTGGTGG-3') jest niezbędna w rekombinacji homologicznej. Po osiągnięciu sekwencji χ kompleks RecBCD przecina nić DNA po jej stronie 3', a następnie komplementarną nić zakończoną wolną grupą 5'-OH (Ryc. 1). RecA tworzy polimer na jed-

nię χ jest substratem preferowanym do inwazji nici w obrębie superskręconego DNA [4]. Równoległe nici trójniciowego kompleksu synaptycznego, mające podobną sekwencję, podlegają następnie wymianie z wytworzeniem heterodupleksu i pętli D. Reakcja ta jest katalizowana przez białko RecA i stymulowana przez SSB. Białka SSB przyłączają się do jednociowego DNA w obszarze pętli D uniemożliwiając



Ryc. 1. Przebieg rekombinacji homologicznej DNA zależnej od RecA i RecBCD podczas koniugacji u *Escherichia coli*. (1-3): Formowanie kompleksu presynaptycznego przez RecA; (4): tworzenie kompleksu synaptycznego; (5) wymiana nici w obrębie kompleksu synaptycznego; (6): przesuwanie rozgałęzienia struktury Hollidaya przez RuvAB; (7-8): rozdzielanie rekombinujących cząsteczek DNA, uzupełnianie brakujących nukleotydów przez polimerazę DNA i łączenie fragmentów DNA przez ligazę DNA; heterodupleksy obecne w produkcie reakcji (8) są substratem dla systemu naprawy przez wycinanie błędnie sparowanych zasad azotowych. Kolorem czarnym oznaczono DNA dawcy, niebieskim sekwencję χ , zielonym DNA chromosomu bakteryjnego. AA, BB: miejsca przecięcia zewnętrznych i wewnętrznych nici rozgałęzienia struktury Hollidaya.

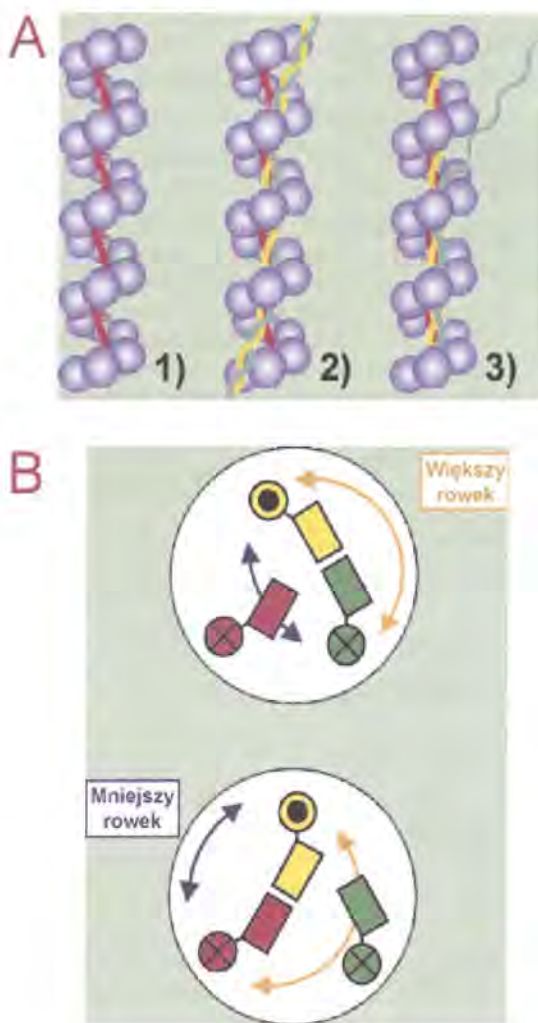
nociowym odcinku DNA biorcy w kierunku 5'→3', tworząc presynaptyczny filament nukleoproteinowy. Do kompleksu DNA-RecA przyłączają się białka SSB, które stabilizują strukturę pojedynczej nici DNA i w ten sposób ułatwiają wiązanie się z nią RecA. Białka SSB są wypierane przez białko RecA podczas tworzenia filamentu presynaptycznego.

Białko RecA, tworzące kompleks z pojedynczą nicią DNA, uczestniczy w poszukiwaniu sekwencji homologicznej z tą, z którą jest związane (Ryc. 1 i Ryc. 2). Do utworzenia trójniciowego kompleksu synaptycznego wymagana jest homologia pomiędzy sekwencjami o długości co najmniej 8 zasad. Podczas tego etapu pojedyncza nić DNA zostaje umieszczona w większym rowku dwuniciowego DNA, a nici podlegające wymianie zostają ułożone w orientacji równoległej. Białko RecA może przeprowadzać tworzenie kompleksu synaptycznego począwszy zarówno od końca 3' jak i 5' nici DNA podlegającej wymianie, jednakże koniec 3' zawierający sekwen-

jej zamknięcie i przebieg reakcji w odwrotnym kierunku [5].

Hydroliza ATP jest niezbędna do przeprowadzenia katalizowanej przez RecA wymiany nici w obrębie struktur różniących się sekwencją oraz do oddysocjowania tego białka od DNA. ATP jest także dla RecA allosterycznym kofaktorem, koniecznym podczas wymiany nici w obrębie w pełni homologicznych sekwencji DNA [6].

Po katalizowanej przez białko RecA wymianie nici i utworzeniu drugiego heterodupleksu powstaje struktura Hollidaya (Ryc. 1). Dwa powstałe heterodupleksy DNA ulegają wydłużeniu w wyniku przemieszczania rozgałęzienia podczas reakcji katalizowanej przez białka RuvAB i RecG przy udziale ATP. Białka RuvC i Rus rozdzielają nici DNA w rekombinacji homologicznej, wykazują więc aktywność resolwaz [7]. Dla zakończenia procesu rekombinacji niezbędne są także polimerazy DNA I i III, ligaza DNA i białka systemu naprawy przez wycinanie



Ryc. 2. Reakcje przeprowadzane przez bakteryjne białko RecA i jego eukariotyczny homolog rad51. A. 1: Komplex presynaptyczny; 2: kompleks synaptyczny; 3: kompleks postsynaptyczny. B. Wymiana nici przeprowadzana przez RecA i rad51; na rysunku górnym i dolnym przedstawiono odpowiednio sytuację przed i po wymianie nici. Kolorem czerwonym oznaczono DNA dawcy, zielonym nić DNA biorcy podlegającą wymianie i tworzącą w kompleksie postsynaptycznym pętlę D, żółtym nić DNA biorcy nie podlegającą wymianie i komplementarną do nici oznaczonych kolorem czerwonym i zielonym. W panelu A kolorem fioletowym oznaczono białko RecA. W panelu B strzałkami oznaczono rowki DNA (kolorem żółtym — rowek większy, granatowym — mniejszy).

błędnie sparowanych zasad. Ważną rolę pełnią również topoiizomerazy regulujące superskręcenie rekombinujących cząsteczek DNA.

III. Białka systemu naprawy DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków

Białka uczestniczące w naprawie DNA człowieka przez rekombinację homologiczną przedstawiono w Tabeli 1. W komórkach myszy stwierdzono występowanie homologów prawie wszystkich genów rekombinacyjnych.

binacji homologicznej człowieka. Białka eukariontów wykazują różnego stopnia homologię w stosunku do niektórych białek *Escherichia coli*. Obecność homologów stwierdzono także u archeobakterii i bakteriofaga T4 (Tabela 2). W komórkach człowieka występują homologi bakteryjnych białek RecA i SSB. Ostatnio wykazano także w komórkach ssaków występowanie homologów bakteryjnych białek RuvB i RuvC [12, 13, 14].

Homologi białka RecA stanowią najliczniejszą poznaną grupę białek rekombinacji homologicznej eukariontów (Tabela 2). Wszystkie białka tej grupy zawierają motywy Walkera A i B biorące udział w wiązaniu ATP. Wśród tej grupy białek największy stopień zachowania budowy i funkcji wykazują odpowiedniki ludzkich białek: RAD51 i specyficznego dla komórek przechodzących podziały mejotyczne białka DMC1 (Tabela 3). Białka RAD51 (człowieka), rad51 (drożdży *Saccharomyces cerevisiae*), a także UvsX (faga T4), RecA (bakterii *E. coli*) (Tabela 2) i RadA (archeobakterii *Sulfolobus solfataricus*) są homologami funkcjonalnymi (ortologami). Inne eukariotyczne homologi białka RecA stanowią grupę paralogów, tzn. wykazują jedynie podobieństwo strukturalne, świadczące o tym, że kodujące je geny mogły powstać przez duplikację genu pierwotnego (Tabela 3). Ludzkie białka RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3, podobnie jak drożdżowe rad55 i rad57, mogą grać rolę białek pomocniczych w stosunku do głównych białek rekombinacji homologicznej, np. ludzkiego RAD51 czy też drożdżowego rad51. Poziom ekspresji homologów białka RecA jest podwyższony w komórkach jąder ssaków (Rad51, Rad51B, Rad51D, Xrcc2), a także śledziony, grasicy, jelita cienkiego, jajników i komórek zarodkowych (Rad51) [16-18], co świadczy o tym, że homologi te mogą uczestniczyć zarówno w rekombinacji mitotycznej jak i mejotycznej.

Występowanie odpowiedników ludzkich białek MRE11, RAD50, p95^{NBS1} (białka o masie 95 kDa kodowanego przez gen *NBS1*), RAD52 i RAD54 stwierdzono również u innych eukariontów (Tabela 2). U *E. coli* występują białka SbcC i SbcD, które wykazują pewne podobieństwo strukturalne do RAD50 i MRE11, jednakże nie jest znana dokładna rola tych białek w rekombinacji homologicznej u bakterii [19]. MRE11, RAD50, p95^{NBS1}, RAD52 i RAD54 charakteryzują się mniejszym podobieństwem do swoich drożdżowych odpowiedników w porównaniu z białkiem RAD51. Stopień homologii waha się tutaj od około 30% (RAD50, RAD52) [20, 21] do 50% (RAD54) [22]. Poziom ich ekspresji jest najwyższy w jądrach i śledzionie.

Tabela 1

Białka człowieka biorące udział w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną^{aj} (na podstawie: [8])

| Białko/ podjednostka | Gen | Locus | Masa cząstecz- kowa [kDa] (ilość amino- kwasów) | Oddziaływanie z innymi białkami ^{aj} | Właściwości i funkcje | |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|--|--|---|---|
| RPA | RPA1 | <i>RPA1</i> | 17p13.1 | 70 (616) | RPA2, RPA3, RAD51, RAD52, PCNA, p53 | bierze udział we wszystkich etapach naprawy; usuwa struktury drugorzędowe tworzone przez jednoniciowy DNA; wiąże się z pętlą D tworzoną podczas wymiany nici przeprowadzanej przez RAD51 uniemożliwiając przebieg reakcji w przeciwnym kierunku ^{aj} |
| | RPA2 | <i>RPA2</i> | 1p35-36.1 | 32 (270) | RPA1, RPA3, RAD52 | |
| | RPA3 | <i>RPA3</i> | 7p22-21 | 14 (121) | RPA1, RPA2 | |
| MRE11/RAD50 | MRE11 | <i>MRE11</i> | 11q21 | (708) | RAD50, Ku70 | ma aktywność egzonukleazy 3'→5' |
| | RAD50 | <i>RAD50</i> | 5q23-31 | 153 (1312) | MRE11, BRCA1 | wiąże się z DNA w sposób zależny od ATP; zwiększa aktywność MRE11 |
| | p95 | <i>NBS1</i> | 8q21 | (754) | ? | stabilizuje i zwiększa aktywność kompleksu MRE11/RAD51 |
| | p200 ^{aj} | ? | ? | ~200 | ? | ? |
| | p400 | ? | ? | ~350 | ? | ? |
| MRE11B | ? | 7 lub 11q21 ^{aj} | (708) | ? | ? | |
| RAD52 | <i>RAD52</i> | 12p13-12.2 | (418) | RAD51, RPA1, RPA2, UBL1, UBE21 | kontroluje aktywność egzonukleolityczną MRE11/ RAD50 (?); uczestniczy w tworzeniu kompleksu presynaptycznego i wymianie nici przez RAD51 | |
| BRCA1 | <i>BRCA1</i> | 17q21 | 220 (1863) | RAD50, RAD51, BRCA2, ATM, p53 | koordynuje działania MRE11/RAD50 i RAD51; bierze udział w regulacji naprawy DNA przez rekombinację homologiczną | |
| BRCA2 | <i>BRCA2</i> | 13q12.3 | 384 (3418) | BRCA1, RAD51 | bierze udział w regulacji naprawy DNA przez rekombinację homologiczną | |
| RAD51 (RAD51A) | <i>RAD51 (RAD51A)</i> | 15q15.1 | 37,0 (339) | RPA1, RAD52, RAD54, XRCC3, RAD51C, PIR51, BRCA1, BRCA2, c-Abl, p53, UBL1, UBE2 | najważniejsze białko rekombinacji homologicznej DNA; tworzy presynaptyczny kompleks nukleoproteinowy, trójniciowy kompleks synaptyczny i przeprowadza wymianę nici z wytworzeniem heterodupletu i pętli D | |
| RAD51B ^{aj} | <i>RAD51B (RAD51L1)</i> | 14q23.3-24 | (350) | RAD51C | uczestniczą w wymianie nici jako białko pomocnicze dla RAD51 (?); RAD51B uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego dzięki aktywności kinazy białkowej (?) | |
| RAD51C | <i>RAD51C</i> | 17q | (376) | RAD51B, RAD51D, XRCC2 | | |
| RAD51D | <i>RAD51D</i> | 17q11 | (328) | RAD51C, XRCC2 | uczestniczą w wymianie nici jako białka pomocnicze dla RAD51 (?); biorą udział w naprawie międzyniciowych wiązań krzyżowych (?) | |
| XRCC2 | <i>XRCC2</i> | 7q36.1 | (280) | RAD51D | | |
| XRCC3 | <i>XRCC3</i> | 14q32.3 | (346) | RAD51, RAD51C | | |
| RAD54 | <i>RAD54^{aj}</i> | 1p32 | (747) | RAD51 | powoduje destabilizację struktury nukleosomalnej podczas rekombinacji homologicznej (?) | |
| RAD54B | <i>RAD54B^{aj}</i> | 8q21.3-22 | (910) | ? | ? | |
| PIR51 | <i>PIR51</i> | 15p13.2-13.1 | (335) | RAD51 | ? | |
| RUVBL1 | <i>RUVBL1 (TIP49A)</i> | 3q21 | 54 (456) | ? | przemieszczają rozgałęzienia struktury Hollidaya (?) | |
| RUVBL2 | <i>RUVBL2 (TIP49B)</i> | ? | (463) | ? | | |

Opisano następujące homologi białek RAD54 i MRE11 człowieka: RAD54B [11] i MRE11B [23] (Tabela 1). Białko MRE11B w porównaniu z MRE11 zawiera dodatkową 28-aminokwasową insercję oraz 28-aminokwasową delecję w pobliżu C-końca [23]. Nie wiadomo, czy białko MRE11B jest kodowane przez ten sam gen co białko MRE11. Wyniki otrzymane metodą hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ*

RuvB [12, 13] i RuvC [14] (Tabela 1 i 2) uczestniczących w przemieszczaniu rozgałęzień struktury Hollidaya i rozdzielaniu cząsteczek DNA uczestniczących w rekombinacji homologicznej. Stwierdzono także istnienie ludzkich homologów białka RecQ *E. coli*: helikaz BLM, WRN, REQL, REQL4 i REQL5 [8, 25]. Bakteryjne białko RecQ uczestniczy w rekombinacji homologicznej zależnej od RecA i

Tabela 2

Homologi niektórych białek *Escherichia coli* uczestniczących w rekombinacji homologicznej u różnych grup systematycznych

| <i>Escherichia coli</i> | fag T4 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Homo sapiens</i> |
|-------------------------|----------------------|--------------------------------------|---|
| RecBCD | – | ? | ? |
| SbcC | T4 p46 | rad50 | RAD50 |
| SbcD | T4 p47 | mre11 | MRE11, MRE11B |
| — | — | xrs2 | p95 ^{NBS1 a)} |
| RecA | UvsX | rad51, rad55, rad57, dmc1 | RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3, DMC1 ^{b)} |
| SSB | T4 p32 | RPA (RPA1, RPA2, RPA3) ^{c)} | RPA (RPA1, RPA2, RPA3) ^{c)} |
| — | UvsY | rad52, rad59 | RAD52 |
| — | — | rad54, rdh54 | RAD54, RAD54B |
| ? | ? | ? | PIR51 |
| RuvA | T4 p59 ^{d)} | ? | ? |
| RuvB | T4 p41 ^{d)} | ruvBL1, ruvBL2 | RUVBL1, RUVBL2 |
| RecG | UvsW ^{d)} | ? | ? |
| RuvC | ? | ? | ? ^{e)} |
| Rus | ? | ? | ? |

Wyszczególniono homologi białek *Escherichia coli* uczestniczących w rekombinacji DNA zależnej od RecA i RecBCD do etapu rozdzielania rekombinujących cząsteczek DNA. W przypadku, gdy u danego organizmu występuje kilka białek z danej grupy homologów pogrubioną czcionką oznaczono białko odgrywające najważniejszą rolę w rekombinacji; w nawiasach podano nazwy podjednostek; znak “?” oznacza, że nie wiadomo czy białko homologiczne istnieje, natomiast znak “–” oznacza, że takie białko nie istnieje. ^{a)}Homologia pomiędzy drożdżowym xrs2 i ludzkim p95^{NBS1} występuje tylko w obrębie ich domen N-terminalnych; ^{b)}u myszy opisano inny homolog RecA: białko Kin17; ^{c)}eukariotyczne białka RPA1 i RPA2 wykazują niski stopień homologii z bakteryjnym SSB; ^{d)}białka te pełnią podobną funkcję jak białka *E. coli*; ^{e)}białko homologiczne do bakteryjnego RuvC wykryto u chomika syryjskiego i cielęcica

wskazują na istnienie dwóch kopii genów zawierających sekwencje homologiczne do cDNA *MRE11* i znajdujących się w chromosomach 7 i 11 [23, 24].

W komórkach ssaków w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną mogą brać udział także inne białka. Opisano homologi bakteryjnych białek

RecF. Białkiem, które może brać udział w rekombinacji homologicznej niezależnej od RAD51 jest TLS/FUS. Białko to przeprowadza niezależną od ATP reakcję pomiędzy komplementarnymi sekwencjami jednoniciowego DNA i superskręconego dwuniciowego DNA z wytworzeniem heterodupleksu i

Objaśnienia do Tabeli 1. ^{a)}W powyższej tabeli wzięto pod uwagę białka uczestniczące w naprawie przez rekombinację homologiczną DNA zależną od RAD51 do etapu rozdzielania rekombinujących cząsteczek DNA; ^{b)}podano tylko te oddziaływania, które mogą mieć znaczenie w naprawie przez rekombinację homologiczną DNA; ^{c)}podano funkcje białka RPA w odniesieniu do naprawy przez rekombinację homologiczną DNA; ^{d)}białko p200 może być identyczne z białkiem BRCA1 (dyskusja w tekście); ^{e)}nie wiadomo czy białko MRE11B jest kodowane przez ten sam gen, co białko MRE11 (dyskusja w tekście); ^{f)}stwierdzono występowanie 3 alternatywnych produktów składania mRNA [9]; ^{g)}w obrębie genu *RAD54* opisano 4 rodzaje polimorfizmów [10]; ^{h)}w obrębie genu *RAD54B* opisano 2 rodzaje polimorfizmów [11]; znak “?” oznacza brak dostępnych informacji, natomiast “(?)” przypuszczalną funkcję białka.

pętli D. Mutanty myszy pozbawione genu *TLS* są nieplodne i nadwrażliwe na promieniowanie jonizujące [26].

Białka rad51, rad52, rad54, występujące w komórkach różnych eukariontów, zawierają domeny charakteryzujące się brakiem homologii. Domenami takimi są odcinki C-terminalne drożdżowego rad52 i

niowaniem [32]. U mutantów *Rad54*^{-/-} komórek ES myszy obserwuje się 2-krotny wzrost wrażliwości na promieniowanie jonizujące i spadek częstości rekombinacji genetycznej [33]. Różnice we wrażliwości mutantów różnych gatunków eukariontów pozbawionych tych samych genów świadczą o istnieniu różnic funkcjonalnych pomiędzy białkami kodowa-

Tabela 3

Podobieństwo pomiędzy ludzkimi i drożdżowymi homologami białka RecA (na podstawie: [15])

| Gen człowieka | Stopień podobieństwa [%] do białka kodowanego przez gen drożdżowy: | | | |
|---------------|--|-------------|--------------|--------------|
| | <i>rad51</i> | <i>dmc1</i> | <i>rad55</i> | <i>rad57</i> |
| <i>RAD51</i> | 82,6 | 65,5 | 43,0 | 50,1 |
| <i>DMC1</i> | 70,1 | 71,5 | 44,4 | 48,5 |
| <i>RAD51B</i> | 50,6 | 52,2 | 45,8 | 54,7 |
| <i>RAD51C</i> | 50,3 | 52,4 | 46,3 | 52,1 |
| <i>RAD51D</i> | 49,8 | 51,5 | 48,5 | 51,3 |
| <i>XRCC2</i> | 47,3 | 47,5 | 45,8 | 48,0 |
| <i>XRCC3</i> | 49,4 | 50,0 | 46,3 | 53,3 |

ludzkiego RAD52 odpowiedzialne za wiązanie rad51 [27]. Różnice w sposobie oddziaływania głównych białek rekombinacyjnych oraz odmienne zestawy białek pomocniczych (Tabela 2) sugerują różnice w przebiegu naprawy przez rekombinację homologiczną u różnych organizmów. Potwierdza to również brak pełnego odzyskania funkcji po wprowadzeniu homologu pochodzącego z innego organizmu do komórek charakteryzujących się mutacją w genie kodującym białko rekombinacyjne.

Mutanty drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawione funkcjonalnych genów: *rad51*^{-/-}, *rad52*^{-/-}, *rad54*^{-/-} cechują się podobnymi defektami w naprawie i rekombinacji genetycznej; mutanty *S. cerevisiae* z jedną z tych mutacji cechuje duża wrażliwość na promieniowanie jonizujące [28]. U drożdży *Schizosaccharomyces pombe* mutacja w genie *rad52* powoduje mniejsze defekty naprawy niż mutacje w *rad51* i *rad54* [29]. Mutacja *Rad51*^{-/-} powoduje u ssaków śmierć podczas rozwoju zarodkowego [30]. Mutacje w genach *Rad52* i *Rad54* powodują mniej poważne skutki, a osobniki pozbawione tych genów są zdolne do przeżycia. Mutanty *Rad52*^{-/-} komórek ES (zarodkowych komórek pnia) myszy nie są nadwrażliwe na promieniowanie i okazują zmniejszoną częstością rekombinacji genetycznej [31]; nadekspresja *Rad52* powoduje niewielki wzrost odporności na promieniowanie oraz zwiększoną częstość rekombinacji spontanicznej i indukowanej promie-

nymi przez te geny oraz istnieniem odmiennych zestawów białek pomocniczych.

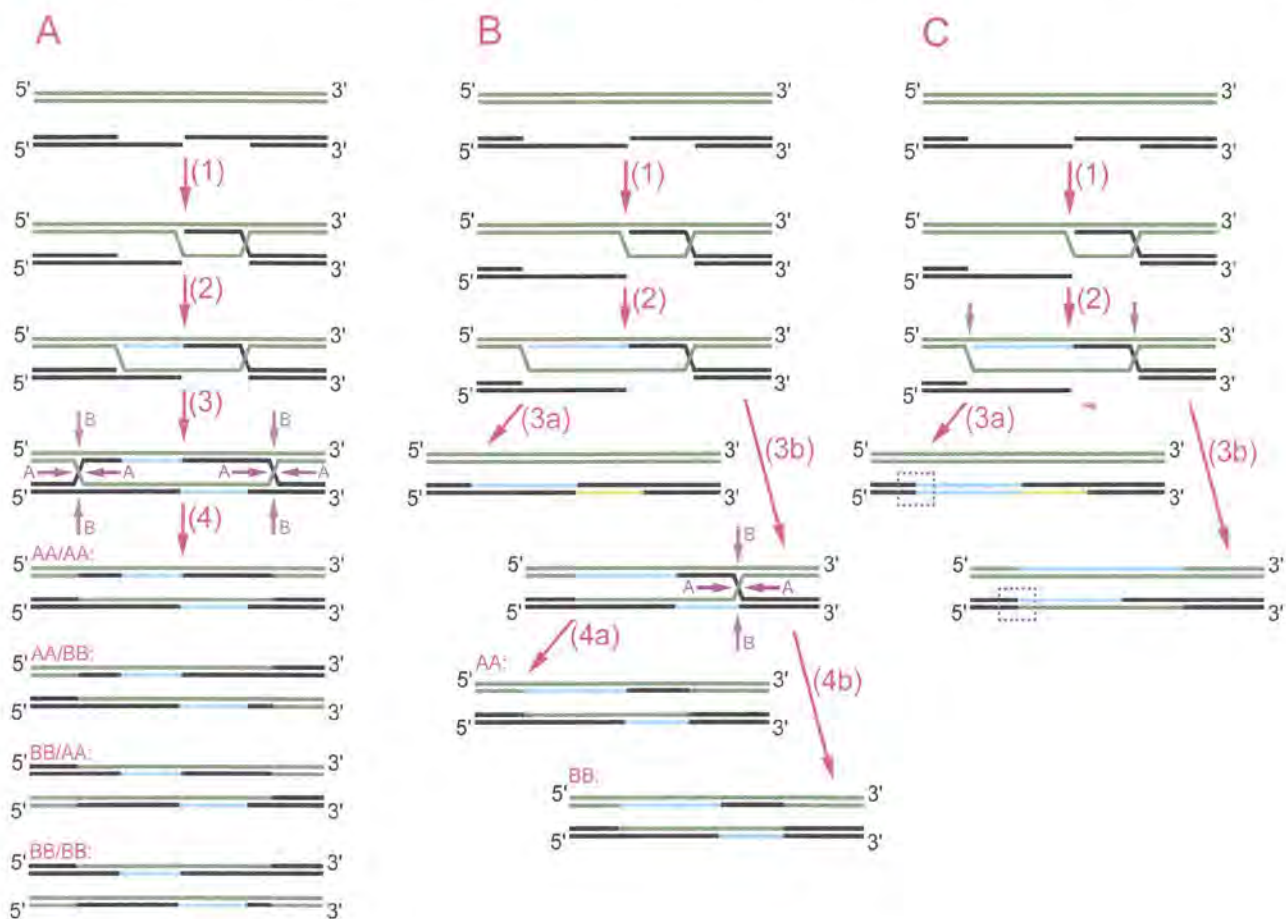
IV. Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków

Rekombinacja homologiczna jest efektywnym i charakteryzującym się dużą wiernością szlakiem naprawy pęknięć podwójnych DNA, w którym do odtworzenia struktury chromosomu wykorzystywany jest jego nieuszkodzony homolog. Naprawa przez rekombinację homologiczną może przebiegać w komórkach ssaków z inwazją jednej lub dwóch nici DNA z cząsteczki DNA biorcy do DNA dawcy. Przebieg rekombinacji homologicznej u ssaków najlepiej opisuje schemat OSI (jednostronnej inwazji; ang. *one-side invasion*) [34], który powstał w oparciu o schemat DSBR (naprawy podwójnych pęknięć DNA; ang. *double strand break repair*) opracowany pierwotnie dla rekombinacji mejotycznej drożdży [35] (Ryc. 3). Schemat DSBR opisuje przebieg rekombinacji konserwatywnej, tzn. takiej, podczas której nie następuje utrata informacji genetycznej. Schemat OSI, oprócz rekombinacji konserwatywnej, przewiduje także rekombinację niekonserwatywną z możliwością delekcji lub insercji w obrębie cząsteczki biorcy w pobliżu jednego z końców fragmentu DNA podlegającego rekombinacji. Schemat ten uwzględnia także przypadki rekombinacji konserwatywnej,

podczas której dochodzi do powstawania asymetrycznych heterodupleksów.

W schemacie jednostronnej inwazji po powstaniu podwójnego pęknięcia w DNA następuje tworzenie się dwóch jednoniciowych odcinków DNA zawie-

dokonującej inwazji na matrycy DNA dawcy. Jeżeli wydłużona sekwencja jest homologiczna z sekwencją drugiego końca biorcy, wówczas rekombinacja homologiczna przebiega dalej wg schematu jednostronnej inwazji dla konserwatywnej rekombinacji



Ryc. 3. Schematy naprawy DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków. Kolorem czarnym oznaczono DNA dawcy, zielonym DNA biorcy, żółtym DNA syntetyzowany na matrycy DNA dawcy, niebieskim DNA syntetyzowany na matrycy biorcy. **A.** Schemat naprawy podwójnych pęknięć DNA zakładający dwustronną inwazję DNA dawcy przez jednoniciowe zakończenia podwójnej helisy DNA biorcy [35]. (1): Inwazja DNA dawcy przez jedno z jednoniciowych zakończeń DNA biorcy, wytworzenie pętli D; (2): wydłużanie pojedynczej nici DNA dokonującej inwazji DNA dawcy, powiększanie pętli D i hybrydyzacja pomiędzy drugim jednoniciowym zakończeniem DNA dawcy i jednoniciowym DNA pętli D; (3): wydłużanie drugiego jednoniciowego zakończenia DNA biorcy, przesuwanie rozgałęzień struktury Hollidaya; (4): przecięcie nici DNA w obrębie struktur Hollidaya i rozdzielanie rekombinujących cząstek DNA. Jeżeli oba rozgałęzienia zostaną przecięte w tej samej orientacji (AA/AA lub BB/BB) wówczas nie zachodzi wymiana dwuniciowych odcinków pomiędzy cząsteczkami biorcy i dawcy; jeżeli rozgałęzienia zostaną przecięte w odwrotnej konfiguracji (AA/BB lub BB/AA) zachodzi wymiana dwuniciowych odcinków. Ostatnim etapem naprawy DNA jest usunięcie niesparowań z heterodupleksów. **B.** Schemat jednostronnej inwazji dla konserwatywnej rekombinacji homologicznej [34]. (1): Jak w punkcie A; (2): wydłużanie pojedynczej nici DNA dokonującej inwazji DNA dawcy, powiększanie pętli D; (3a): rozwijanie nowo zsyntetyzowanej nici DNA i jej hybrydyzacja z drugim jednoniciowym zakończeniem DNA dawcy, synteza brakującej sekwencji w cząsteczce biorcy; (3b): hybrydyzacja pomiędzy drugim jednoniciowym zakończeniem DNA dawcy i jednoniciowym DNA pętli D, przecięcie czołowego końca pętli D; (4a) i (4b): przecięcie nici DNA w obrębie struktury Hollidaya i rozdzielanie rekombinujących cząstek DNA z wymianą (4a) lub bez wymiany (4b) dwuniciowych odcinków DNA dawcy i biorcy. **C.** Schemat jednostronnej inwazji dla niekonserwatywnej rekombinacji homologicznej [34]. (1) i (2): Jak w punkcie B; (3a): rozwijanie nowo zsyntetyzowanej nici DNA i jej połączenie z niedokonującym inwazji końcem cząsteczki biorcy na drodze niehomologicznego łączenia końców DNA; (3b): rozdzielanie rekombinujących cząstek DNA wycięcia nici DNA dawcy komplementarnej do DNA pętli D i jej połączenia z niedokonującym inwazji końcem cząsteczki biorcy na drodze niehomologicznego łączenia końców DNA. Kwadrat oznacza miejsca niehomologicznego łączenia końców DNA.

rających na jednym z końców wolną grupę 3'-OH. Jeden z tych fragmentów DNA biorcy dokonuje inwazji podwójnej helisy DNA, zawierającej homologiczną sekwencję nukleotydową dawcy. W następnym etapie dochodzi do wydłużenia nici DNA

homologicznej DNA i kończy się wymianą dwuniciowych odcinków DNA między cząsteczkami biorcy i dawcy lub też jedynie utworzeniem odcinka heterodupleksowego w obrębie obu cząstek (Ryc. 3B). W przypadku, gdy wydłużona sekwencja

nie jest homologiczna z sekwencją drugiego końca biorcy, to zachodzi nieuprawnione łączenie końców cząsteczki biorcy, czego konsekwencją może być delecja lub insercja sekwencji nukleotydowej w tej cząsteczce (Ryc. 3C).

Mechanizm naprawy przez rekombinację homologiczną może być różny w komórkach różnych typów [36]. W komórkach linii zarodkowej pnia ES myszy [37] zachodzi w większym stopniu rekombinacja konserwatywna niż w mysich fibroblastach 3T3 [38]. Wskazuje to na różnice w mechanizmie rekombinacji homologicznej w komórkach somatycznych różnych typów.

Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną rozpoczyna się wykryciem pęknięć podwójnych w DNA przez RAD52 i kompleks MRE11/RAD50. Kolejnym etapem tego szlaku naprawy jest wytworzenie jednoniciowych fragmentów DNA zakończonych wolną grupą 3'-OH. Białko RAD51 przy współudziale białek towarzyszących wchodzących w skład kompleksu rekombinacyjnego RAD51 tworzy kompleks presynaptyczny z pojedynczą nicią DNA, a następnie rozpoznaje homologiczną sekwencję DNA i przeprowadza wymianę nici. Pod koniec rekombinacji następuje rozdzielenie cząsteczek DNA biorcy i dawcy oraz naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych w przypadku dwie nici DNA stanowiące produkt rekombinacji nie są w pełni komplementarne (Ryc. 4).

IV-1. Kompleks MRE11/RAD50

Kompleks MRE11/RAD50 może uczestniczyć zarówno w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną jak i niehomologiczną. Komórki zarodkowe pnia ES myszy *Mre11*^{-/-} nie są zdolne do przeżycia [39] podobnie jak komórki myszy *Rad51*^{-/-} [30], natomiast komórki myszy pozbawione genu *Ku70* lub *Ku80* zachowują zdolność przeżycia. Dane te sugerują, że Mre11 ssaków bierze udział w naprawie przez rekombinację homologiczną. Z drugiej strony MRE11 bierze udział *in vitro* w łączeniu niehomologicznych końców DNA przez ligazę DNA I w reakcji, w której biorą udział 1-5 nukleotydowe odcinki homologiczne w pobliżu pęknięcia podwójnego DNA. Ponieważ odcinki te wykorzystywane są również w procesie naprawy DNA przez rekombinację niehomologiczną *in vivo*, kompleks MRE11/RAD50 może także uczestniczyć w tym szlaku naprawy DNA [40]. MRE11 może oddziaływać z białkiem Ku70, którego obecność w jądrze komórkowym decyduje o tym czy pęknięcia podwójne DNA będą naprawiane poprzez rekombinację niehomolo-

giczną zależną od DNA-PK, czy też poprzez rekombinację homologiczną [41].

Kompleks MRE11/RAD50 składa się z 5 podjednostek [20] (Tabela 1). Kompleks ten posiada właściwości egzonukleazy 3'→5' [42] w związku z czym, aby wytworzyć jednoniciowe zakończenie DNA z wolną grupą 3'-OH wymagane są helikazy związane z MRE11/RAD50 lub egzonukleazy o aktywności 5'→3'. Aktywność egzonukleolityczna 3'→5' jest wynikiem działania białka MRE11 [40]. RAD50, białko wykazujące zdolność wiązania DNA w sposób zależny od ATP, podwyższa aktywność egzonukleolityczną MRE11 [40]. Znaczenie pozostałych białek kompleksu nie zostało jeszcze poznane. Jednakże wiadomo, że w syndromie pęknięć Nijmegen, w przypadku którego występuje mutacja w obrębie genu *NBS1*, obserwuje się zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów, defekty w cyklu komórkowym i nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące. Ponadto niedobór białka p95^{NBS1} może znosić tworzenie się skupisk MRE11 i RAD50 w jądrach komórkowych ekspozowanych na promieniowanie jonizujące [43]. Kolejnym białkiem, które może wchodzić w skład kompleksu MRE11/RAD50 może być BRCA1 (Tabela 1). W ludzkich komórkach raka sutka HCC1937 charakteryzujących się homozygotyczną mutacją w genie *BRCA1* obserwuje się zmniejszoną częstość tworzenia skupisk zawierających MRE11, RAD50, p95^{NBS1} i BRCA1.

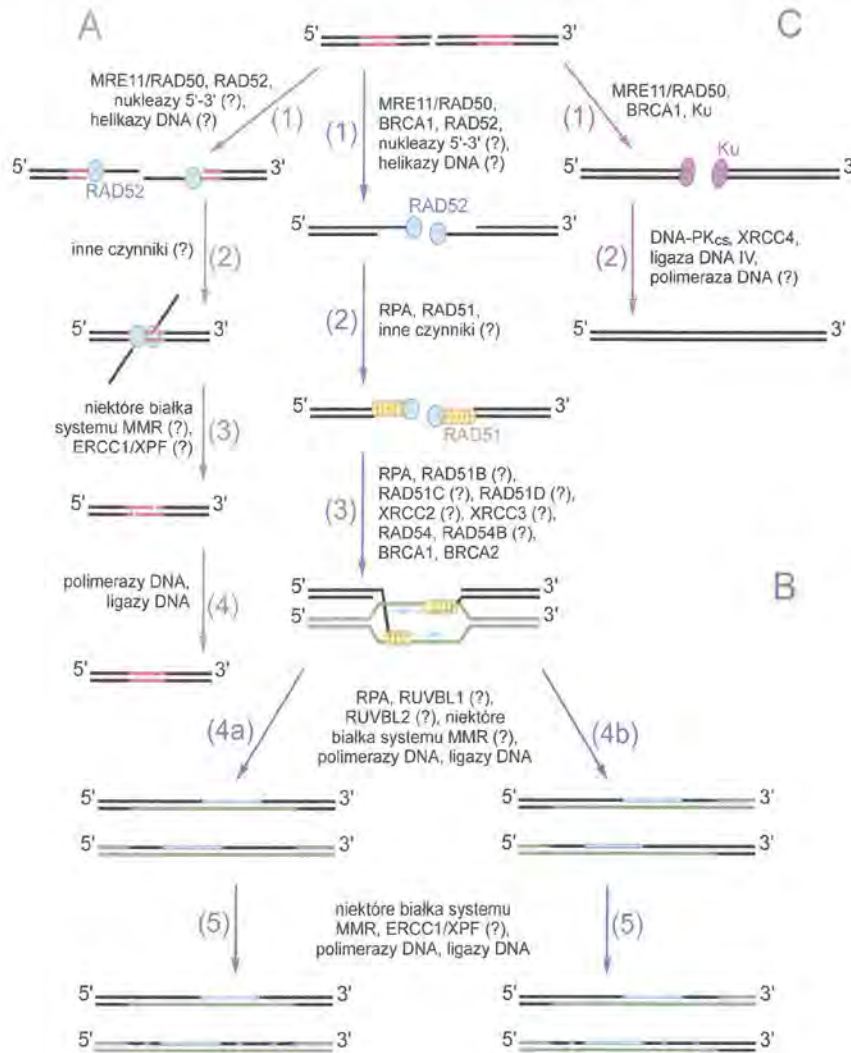
IV-2. Białka koordynujące działanie kompleksów rekombinacyjnych MRE11/RAD50 i RAD51

Kompleks MRE11/RAD50 jest obecny w komórkach człowieka w fazie G₁, podczas gdy RAD51 przeprowadza wymianę nici podczas faz S i G₂ [44]. Przebiegające w różnych fazach cyklu komórkowego reakcje przeprowadzane przez oba kompleksy mogą być sprzęgane przez białka RAD52 lub/i przez BRCA1 [45], dzięki ich zdolnościom do oddziaływania zarówno z MRE11/RAD50 jak i RAD51.

Ludzkie białko RAD52 może się przyłączać do jedno- i dwuniciowych zakończeń dwuniciowego DNA powstałych w wyniku pęknięć i zabezpieczać w ten sposób DNA przed atakiem egzonukleaz [2]. Podobnie u drożdży pozbawionych genu *rad52* obserwuje się szybszą degradację DNA niż w komórkach typu dzikiego [46]. RAD52 może więc odgrywać analogiczną funkcję jak białko Ku i pełnić bezpośrednią kontrolę nad aktywnością egzonukleolityczną MRE11/RAD50 [2]. RAD52 również stymuluje tworzenie kompleksu presynaptycznego i wymianę nici przez RAD51.

BRCA1 może oddziaływać z białkami RAD50 [45] oraz z RAD51 bezpośrednio [47] i za pośrednictwem białka BRCA2 [48]. BRCA1 może znajdować

podobnie jak jego bakteryjny homolog, białko RecA, przeprowadza formowanie presynaptycznego kompleksu nukleoproteinowego i trójniciowego kom-



Ryc. 4. Udział białek w różnych szlakach naprawy DNA przez rekombinację u ssaków. Systemy naprawy DNA przez: (A) dopasowywanie pojedynczych nici DNA, (B) rekombinację homologiczną zależną od RAD51, (C) rekombinację niehomologiczną DNA. W przypadku systemu naprawy DNA przez rekombinację homologiczną przebieg naprawy przedstawiono dla schematu naprawy podwójnych pęknięć DNA (Ryc. 3A). Dalsze informacje w tekście. Kolorem czarnym oznaczono DNA dawcy, zielonym DNA biorycy, czerwonym sekwencje powtórzone wymagane przy naprawie DNA przez dopasowywanie pojedynczych nici, niebieskim DNA syntetyzowany na matrycy biorycy, różowym miejsca naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych. Użyte skróty: MMR — naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych.

się w skupiskach tworzonych zarówno przez RAD50 w fazie G₁, jak i RAD51 w fazach S i G₂. Ponadto brak funkcjonalnego białka BRCA1 przyczynia się do nadwrażliwości zarodkowych komórek pnia na promieniowanie jonizujące [49]. BRCA1 może zatem funkcjonować jako pomocnicze białko naprawy DNA, koordynujące działania białek występujących w różnych fazach cyklu.

IV-3. RAD51

Najważniejszym białkiem kompleksu rekombinacyjnego RAD51/RAD52/RPA jest RAD51. RAD51,

podobnie jak jego bakteryjny homolog, białko RecA, przeprowadza formowanie presynaptycznego kompleksu nukleoproteinowego i trójniciowego kompleksu synaptycznego oraz wymianę nici z wytworzeniem heterodupleksu i pętli D (Ryc. 2). Badania drożdżowego Rad51 i ludzkiego RAD51 wskazują na to, że białka te tworzą kompleksy presynaptyczne w jednoniciowych zakończeniach DNA biorycy z wolną grupą 3', a następnie przeprowadzają wymianę nici w kierunku 3'→5' względem nici tworzącej kompleks presynaptyczny [50, 51, 52].

Białko RAD51 różni się od RecA pod względem właściwości biochemicznych. RAD51 wiąże się *in vitro* do jedno- i dwuniciowego DNA, podczas gdy RecA wiąże się jedynie z jednoniciowym DNA [53]. RAD51 charakteryzuje się także mniejszą szybko-

ścią wymiany nici w porównaniu z RecA [52, 53]. Różnice dotyczą również wymagań w stosunku do ATP jako kofaktora i źródła energii. W przypadku RecA przyłączenie się ATP wystarcza do przeprowadzenia wymiany nici DNA, jednakże hydroliza ATP jest niezbędna do końcowego rozdzielania heterodupleksów. Zastosowanie ATP γ S, analogu ATP nie ulegającego hydrolizie, a także mutacja w domenie odpowiedzialnej za hydrolizę ATP w genie kodującym RecA, nie mająca znaczenia dla wiązania ATP, hamuje wymianę nici. Ponadto RecA zawierające mutację w domenie hydrolizującej ATP nie uzupełniają braku RecA u szczepów *E. coli* pozbawionych tego białka [54]. U człowieka zastosowanie analogu ATP nie ulegającego hydrolizie nie przyczynia się do zahamowania reakcji przeprowadzanej przez białko RAD51, natomiast mutacja w genie kodującym RAD51, znosząca aktywność ATP-azy i nie wpływająca na zdolność białka do wiązania ATP, powoduje jedynie częściowe zmniejszenie aktywności zmutowanego białka [55].

W wymianie nici w procesie rekombinacji homologicznej w komórkach eukariontów oprócz RPA uczestniczy szereg innych białek pomocniczych dla głównego białka rekombinacyjnego rad51: grupa paralogów rad51, a także białka rad52 i rad54 wraz z homologami. Dodatkowym białkiem pomocniczym występującym w komórkach człowieka jest najprawdopodobniej białko PIR51 (Tabela 2).

IV-4. RPA i RAD52

U drożdży do jednoniciowego zakończenia DNA biorcy przyłączają się białka RPA i rad51. Składające się z trzech podjednostek białko RPA usuwa struktury drugorzędowe tworzone przez pojedynczą nić DNA, umożliwiając wydajne tworzenie kompleksu presynaptycznego przez rad51. Przy braku RPA białko rad51 oddziałuje z jednoniciowym DNA i stabilizuje tworzone przez niego struktury drugorzędowe, hamując w ten sposób tworzenie się kompleksu presynaptycznego [56]. Jednocześnie RPA współzawodniczy z rad51 o wiązanie z pojedynczą nicią DNA [57]. Współzawodnictwo o substrat zaobserwowano także pomiędzy ludzkimi białkami RPA i RAD51 [58]. Również u bakterii białka SSB konkurują z RecA o miejsce wiązania z jednoniciowymi odcinkami DNA, jednakże hamujący wpływ SSB na proces rekombinacji zaobserwowano u szczepów charakteryzujących się podwyższoną ekspresją tych białek [59]. O ile u bakterii hamujący wpływ SSB przewyższa białko RecA, to u drożdży utworzenie kompleksu presynaptycznego

przez rad51 i przemieszczenie RPA na pętlę D możliwe jest dzięki obecności rad52 oraz heterodimeru rad55/rad57 [57, 60, 61].

Funkcjonalnym odpowiednikiem drożdżowego białka rad52 w komórkach człowieka może być RAD52. RAD52 oddziałuje z RAD51, z podjednostkami RPA1 i RPA2 białka RPA [27, 62], a także, podobnie jak RAD51, z jedno- i dwuniciowym DNA [63]. RAD52 ulega wyparciowi z jednoniciowego DNA przez RAD51 znacznie łatwiej w porównaniu z dwuniciowym [63]. Właściwości te mogą decydować o stymulującym wpływie RAD52 na tworzenie kompleksu presynaptycznego i wymianę nici przez RAD51.

Białka biorące udział rekombinacji homologicznej charakteryzują się wysokim stopniem zachowania międzygatunkowego. Dotyczy to szczególnie białek SSB i RecA *Escherichia coli*, T4p32 i UvsX faga T4 oraz eukariotycznych białek RPA i rad51 [64, 57, 52]. Z drugiej jednak strony można dostrzec także istotne różnice. Domena RAD52 odpowiedzialna za oddziaływanie z RAD51 nie wykazuje homologii do drożdżowego rad52, co sugeruje, że oddziaływanie między tymi białkami jest specyficzne gatunkowo [27].

IV-5. Inne białka uczestniczące w wymianie nici

W kompleksie przeprowadzającym wymianę nici w komórkach ssaków oprócz białek Rad51, Rad52, RPA, Brca1 i Brca2 znajdują się również inne białka: paralogi Rad51, a także Rad54 i Rad54B.

Spośród licznych paralogów Rad51 większość uczestniczy w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną. Wszystkie one mogą oddziaływać bezpośrednio lub pośrednio z Rad51 (Tabela 1). Brak ekspresji Rad51B i Rad51D przyczynia się, podobnie jak w przypadku braku Rad51, Brca1, czy też Brca2, do śmierci myszy we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego [65]. Defektem w obu allelach genów kodujących Xrcc2 i Xrcc3 towarzyszy 25-100-krotne zmniejszenie częstości naprawy rekombinacyjnej DNA oraz zwiększona wrażliwość na promieniowanie jonizujące i mitomycynę C [66, 67]. Do tej pory nie udało się określić roli paralogów Rad51 w naprawie DNA. Wiadomo jednakże, że ekspresja poszczególnych paralogów Rad51 jest specyficzna gatunkowo i może się zmieniać podczas rozwoju osobniczego organizmu. Przypuszcza się, że poszczególne białka mogą uczestniczyć w naprawie różnego rodzaju uszkodzeń i odgrywać większe lub mniejsze znaczenie w rekombinacji mitotycznej lub mejotycznej. Białko Rad51B ponadto wykazujące

aktywność kinazy białkowej m.in. w stosunku do p53, może być zaangażowane w regulację cyklu komórkowego w odpowiedzi na wykryte uszkodzenia DNA [68].

Białka Rad54 i Rad54B zalicza się do rodziny swi2/snf2 zawierającej 7 motywów charakterystycznych dla helikaz DNA i RNA. U drożdżowego rad54, podobnie jak u innych przedstawicieli rodziny swi2/snf2, nie stwierdza się aktywności helikazowej [69]. W związku z tym, że drożdżowe i ludzkie białka z rodziny swi2/snf2 wykorzystują energię pochodzącą z hydrolizy ATP do destabilizacji struktury nukleosomalnej, Rad54 może uczestniczyć w przebudowywaniu chromatyny podczas rekombinacji homologicznej [70].

IV-6. Białka końcowych etapów rekombinacji homologicznej

Końcowe etapy rekombinacji homologicznej w komórkach ssaków zostały słabo poznane. Przyпуска się, że mogą brać w nich udział m.in. homologi bakteryjnych białek uczestniczących w przemieszczaniu rozgałęzień struktury Hollidaya, rozdzielaniu cząsteczek DNA, topoizomerazy, polimerazy DNA, ligazy DNA, białka systemu naprawy przez wycinanie błędnie sparowanych zasad oraz najprawdopodobniej białka systemu naprawy przez wycinanie nukleotydów. Poza wymienionymi białkami rozważa się także udział w rekombinacji homologów bakteryjnego białka RecQ: helikaz WRN i BLM [25].

W komórkach człowieka wykryto 2 homologi bakteryjnego białka RuvB: RUVBL1 [12] i RUVBL2 [13]. Poza prawdopodobnym udziałem w rekombinacji RUVBL1 i RUVBL2 mogą one uczestniczyć w transkrypcji. Inne białko, homolog bakteryjnego RuvC, zostało wykryte w komórkach grasicy cielęcia i komórkach CHO chomika syryjskiego [14].

W rekombinacji homologicznej biorą także udział białka systemu naprawy błędnie sparowanych zasad. Uczestniczą one w usuwaniu błędnie sparowanych zasad znajdujących się w obrębie heterodupleksowego DNA. Mutacja w mysim genie *Pms2* przyczynia się do nieprawidłowości w koniugacji chromosomów i niepłodności u samców [71]. Podobny efekt, ale związany z oogenezą, występuje w przypadku braku prawidłowego genu *Mlh1* [72]. Białka *Pms2* i *Mlh1* mogą u ssaków brać udział w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną.

U drożdży opisano szereg białek, które uczestniczą w rekombinacji mejotycznej. Wydaje się, że

mogą one też uczestniczyć w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną. Białko systemu naprawy przez wycinanie błędnie sparowanych zasad, *msh2*, oraz endonukleaza systemu naprawy przez wycinanie nukleotydów *rad10/rad1* mogą być odpowiedzialne za usuwanie większych obszarów niesparowań w obrębie heterodupleksów, np. pętli tworzonych przez jedną z nici DNA. Białko *msh2* najprawdopodobniej rozpoznaje strukturę pętlową, a kompleks *rad10/rad1* przecina nić DNA naprzeciw pętli [73]. Inne drożdżowe białka systemu naprawy przez wycinanie zasad *msh4* i *msh5* mogą z kolei brać udział w rozdzielaniu cząsteczek DNA uczestniczących w rekombinacji. Mutacje w genach *msh4* i *msh5* powodują obniżenie częstości wzajemnej wymiany dwuniciowych odcinków DNA pomiędzy cząsteczkami biorcy i dawcy [74, 75]. Opisano szereg ludzkich homologów: MSH2, ERCC1/XP-F, MSH4 i MSH5, jednakże w chwili obecnej brak jest doniesień o ich roli w rekombinacji DNA. W przypadku myszy *Msh2*^{-/-} nie stwierdzono zaburzeń w rekombinacji mejotycznej, co może wskazywać na to, że białko *Msh2* nie bierze udziału w rekombinacji mejotycznej u ssaków [76].

V. Udział białek rekombinacji homologicznej w naprawie DNA przez dopasowywanie pojedynczych nici

System naprawy DNA przez dopasowywanie pojedynczych nici (ang. *SSA* — *single strand annealing*) został najlepiej scharakteryzowany u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Białka naprawcze tego szlaku wykorzystują krótkie sekwencje powtórzone znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie pęknięcia do wzajemnego dopasowania jednoniciowych końców dwóch fragmentów DNA, a następnie ich połączenia. W pierwszym etapie specyficzne egzonukleazy 5'→3' trawią oba dwuniciowe końce DNA. Utworzenie połączenia pomiędzy dwoma dwuniciowymi cząsteczkami DNA możliwe jest dzięki hybrydyzacji odcinków zawierających powtórzenia znajdujące się w obrębie jednoniciowych zakończeń DNA. W dalszej kolejności zachodzi usunięcie niehomologicznych końców, synteza naprawcza DNA i ligacja końców (Ryc. 4). Opisany szlak naprawy charakteryzuje się zatem małą wiernością ponieważ sekwencje pomiędzy podwójnym pęknięciem DNA i jednostkami powtórzonymi są tracone.

Białkami, które biorą udział w SSA u drożdży są *mre11/rad50*, *rad52*, *RPA*, *rad1*, *rad10*, *msh2*, *msh3* i *srs2*. U szczepów drożdży pozbawionych *rad52* lub składników kompleksu *mre11/rad50*, *rad50* i *xrs2*,

obserwuje się zmniejszoną częstość delecji [46, 77]. Białka mre11/rad50 i rad52 mogą pełnić tutaj podobną funkcję jak w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną. Ponadto, rad52 i RPA uczestniczą w hybrydyzacji powtórzeń DNA [78]. Białka msh2 i msh3 najprawdopodobniej rozpoznają, natomiast rad1 i rad10 usuwają jednoniciowe fragmenty DNA o niehomologicznej sekwencji [79].

Nie wiadomo czy system naprawy DNA przez dopasowywanie pojedynczych nici jest czynny w naprawie uszkodzeń DNA w komórkach ssaków. Argumentem świadczącym za funkcjonowaniem systemu SSA u ssaków jest wykrycie homologów wszystkich białek drożdżowych uczestniczących w tym systemie naprawy DNA, z wyjątkiem srs2. Ponadto, mutanty genów *Ercc1* i *Ercc4* kodujących homologi drożdżowych białek Rad10 i Rad1, charakteryzują się wrażliwością na promieniowanie jonizujące; cechy tej nie mają mutanty genów kodujących inne białka systemu naprawy przez wycinanie nukleotydów. Świadczy to o udziale *Ercc1* i *Ercc4* w naprawie podwójnych pęknięć DNA.

VI. Uwagi końcowe

Naprawa przez rekombinację homologiczną DNA w komórkach ssaków jest procesem stosunkowo słabo poznanym. Oprócz naprawy DNA zależnej od RAD51 i naprawy DNA przez dopasowywanie pojedynczych nici DNA, mogą istnieć również inne szlaki naprawy przez rekombinację homologiczną. Opisano szereg białek, które mogą uczestniczyć w takich szlakach. Przykładami są homologi bakteryjnej helikazy RecQ oraz białko TLS.

W naprawie DNA przez rekombinację homologiczną zależną od RAD51 najlepiej poznanym etapem jest wymiana nici. Jednakże poza względnie dobrze poznanymi białkami RAD51, RAD52 i RPA niewiele wiadomo o funkcji innych białek uczestniczących w tym etapie naprawy. Pojawiają się nowe doniesienia o czynnikach, które mogą być zaangażowane w wymianę nici DNA [80].

Wielość białek uczestniczących w rekombinacji homologicznej DNA wynika z tego, że są one specyficzne w procesie rekombinacji mitotycznej lub mejozycznej i mogą być zaangażowane tylko w naprawę DNA, czy też rekombinację genetyczną, lub też jednocześnie w oba te procesy. Ponadto w przypadku białek biorących udział w naprawie DNA część z nich może uczestniczyć w naprawie określonych uszkodzeń DNA. Przykładami takich białek są XRCC2 i XRCC3, które biorą najprawdopodobniej

udział w usuwaniu międzyniciowych wiązań krzyżowych.

Badania naprawy pęknięć podwójnych dostarczyły dowodów na przyczynowy związek pomiędzy zaburzeniami w naprawie a występowaniem nowotworów i innych defektów genetycznych. Postęp w badaniach procesów naprawy takich pęknięć pozwoli na lepsze zrozumienie zależności pomiędzy drogami powstawania uszkodzeń DNA, naprawą DNA i chorobami genetycznymi. Będzie on również miał wpływ na możliwość oceny narażenia ludzi na promieniowanie jonizujące i inne czynniki uszkadzające oraz udoskonali sposób zastosowania leków w terapii antynowotworowej.

Podziękowania

Praca wykonana przy wsparciu Uniwersytetu Łódzkiego grant nr 505/718.

Artykuł otrzymano 20 lipca 2000 r.
Zaakceptowano do druku 20 stycznia 2001 r.

Piśmiennictwo

1. Jeggo PA (1997) *Mutat Res* **384**: 1-14
2. Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999) *Nature* **398**: 728-731
3. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) *EMBO J* **17**: 5497-5508
4. Dixon DA, Kowalczykowski SC (1991) *Cell* **66**: 361-371
5. Lavery PE, Kowalczykowski SC (1992) *J Biol Chem* **267**: 9315-9320
6. Rosselli W, Stasiak A (1990) *J Mol Biol* **216**: 335-352
7. Sharples GJ, Chan SN, Mahdi AA, Whitby MC, Lloyd RG (1994) *EMBO J* **13**: 6133-6142
8. OMIM — online Mendelian Inheritance in Man (John Hoppkins University), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>
9. Schoenmakers EFPM, Huysmans C, Van de Ven WJM (1999) *Cancer Res* **59**: 19-23
10. Matsuda M, Miyagawa K, Takaharashi M, Fukuda T, Kataoka T, Asahara T, Inui H, Watatani M, Yasutomi M, Kamada N, Dohi K, Kamiya K (1999) *Oncogene* **18**: 3427-3430
11. Hiramoto T, Nakanishi T, Sumiyoshi T, Fukuda T, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K, Shibasaki Y, Inui H, Watatani M, Yasutomi M, Sumii K, Kajiyama G, Kamada N, Miyagawa K, Kamiya K (1999) *Oncogene* **18**: 3422-3426
12. Qiu X-B, Lin Y-L, Thome KC, Pian P, Schlegel BP, Weremowicz S, Parvin JD, Dutta A (1998) *J Biol Chem* **273**: 27793-27793
13. Kanemaki M, Kurokawa Y, Matsuura T, Makino Y, Masani A, Okazaki K, Morishita T, Tamura TA (1999) *J Biol Chem* **274**: 22437-22444
14. Hyde H, Davies AA, Benson FE, West SC (1994) *J Biol Chem* **269**: 5202-5209
15. Thacker J (1999) *Biochemie* **81**: 77-85
16. Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, Ushio N, Ikeo K, Ogawa T (1993) *Nature Genet* **4**: 239-243
17. Cartwright R, Dunn AM, Simpson PJ, Tambini CE, Thacker J (1998a) *Nucl Acids Res* **26**: 1653-1659

18. Cartwright R, Tambini CE, Simpson PJ, Thacker J (1998b) *Nucl Acids Res* **26**: 3084-3089
19. Sharples GJ, Leach DR (1995) *Molec Microbiol* **15**: 1215-1217
20. Dolganov GM, Maser RS, Novikov A, Tosto L, Chong S, Bressan DA, Petrini JH (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 4832-4841
21. Muris DF, Bezzubova O, Buerstedde JM, Vreeken K, Balajee AS, Osgood CJ, Troelstra C, Hoeijmakers JH, Ostermann K, Schmidt H, Natarajan AT, Eeken JCJ, Lohman PHM, Pastink A (1994) *Mutat Res* **315**: 295-305
22. Kanaar R, Troelstra C, Swagemakers SM, Essers J, Smit B, Franssen JH, Pastink A, Bezzubova OY, Buerstedde JM, Clever B, Heyer WD, Hoeijmakers JH (1996) *Curr Biol* **6**: 828-838
23. Chamankhah M, Wei Y-F, Xiao W (1998) *Gene* **225**: 107-116
24. Petrini JHJ, Walsh ME, DiMarc C, Chen X-N, Korenberg JR, Weaver DT (1995) *Genomics* **29**: 80-86
25. Karow JK, Wu L, Hickson ID (2000) *Curr Opin Genet Dev* **10**: 32-38
26. Baechtold H, Kuroda M, Sok J, Ron D, Lopez BS, Akhmedov T (1999) *J Biol Chem* **274**: 34337-34342
27. Shen Z, Cloud KG, Chen DJ, Park MS (1996) *J Biol Chem* **271**: 148-152
28. Resnick MA, Martin P (1976) *Molec Gen Genet* **143**: 119-129
29. Muris DFR, Vreeken K, Schmidt H, Ostermann K, Clever B, Lohman PHM, Pastink A (1997) *Curr Genet* **31**: 248-254
30. Lim DS., Hasty P (1996) *Molec Cell Biol* **16**: 7133-7143
31. Rijkers T, Van Den Ouweland J, Morolli B, Roli AG, Baarends WM, Van Sloun PPH, Lohman PHM, Pastink A (1998) *Molec Cell Biol* **18**: 6423-6429
32. Park MS (1995) *J Biol Chem* **270**: 15467-15470
33. Essers J, Hendriks RW, Swagemakers MA, Troelstra C, de Wit J, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R (1997) *Cell* **89**: 195-204
34. Belmaaza A, Chartrand P (1994) *Mutat Res* **314**: 199-208
35. Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ (1983) *Cell* **33**: 25-35
36. Jasin M (1996) *Trends Genet* **12**: 224-229
37. Smih F, Rouet P, Ronanienko PJ, Jasin M (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 5012-5019
38. Rouet P, Smih F, Jasin M (1994) *Molec Cell Biol* **14**: 8096-8106
39. Xiao Y, Weaver DT (1997) *Nucl Acids Res* **25**: 2985-2991
40. Paull TT, Gellert M (1998) *Molec Cell* **1**: 969-979
41. Goedecke W, Eijpe M, Offenbergh HH, van Aaldern M, Heyting C (1999) *Nature Genet* **23**: 194-198
42. Trujillo KM, Yuan SSF, Lee EYHP, Sung P (1998) *J Biol Chem* **273**: 21444-21450
43. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH (1998) *Cell* **93**: 477-486
44. Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JHI (1997) *Molec Cell Biol* **17**: 6097-6104
45. Zhong Q, Chen C-F, Li S, Chen Y, Wang C-C, Xiao J, Chen P-L, Sharp ZD, Lee W-H (1999) *Science* **285**: 747-750
46. Sugawara N, Haber JE (1992) *Molec Cell Biol* **12**: 563-575
47. Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM (1997) *Cell* **88**: 265-275
48. Wong AKC, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL (1997) *J Biol Chem* **272**: 31941-31944
49. Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA (1998) *Science* **281**: 1009-1012
50. Tsubouchi H, Ogawa H (1998) *Molec Cell Biol* **18**: 260-268
51. Sung P, Robberson DL (1995) *Cell* **82**: 453-461
52. Baumann P, West SC (1999) *J Molec Biol* **291**: 363-374
53. Benson FE, Stasiak A, West SC (1994) *EMBO J* **13**: 5764-5771
54. Konola JT, Logan KM, Knight KL (1994) *J Molec Biol* **237**: 20-34
55. Morrison C, Shinohara A, Sonoda E, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Weichelbaum RR, Takeda S (1999) *Molec Cell Biol* **19**: 6891-6897
56. Zaitseva EM, Zaitsev EN, Kowalczykowski SC (1999) *J Biol Chem* **274**: 2907-2915
57. Shinohara A, Ogawa T (1998) *Nature* **391**: 404-407
58. Benson F, Baumann P, West SC (1998) *Nature* **391**: 401-404
59. Camerini-Otero RD, Hsieh P (1995) *Annu Rev Genetics* **29**: 509-552
60. New JH, Sugiyama T, Zaitseva E, Kowalczykowski SC (1998) *Nature* **391**: 407-410
61. Sung P (1997) *Genes Dev* **11**: 1111-1121
62. Park MS, Ludwig DL, Stigger E, Lee SH (1996) *J Biol Chem* **271**: 18996-19000
63. Van Dyck E, Hajibagheri NMA, Stasiak A, West SC (1998) *J Molec Biol* **284**: 1027-1038
64. Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC (1997) *J Biol Chem* **272**: 7940-7945
65. Shu Z, Smith S, Wang L, Rice MC, Kmiec EB (1999) *Molec Cell Biol* **19**: 8686-8693
66. Johnson RD, Liu N, Jasin M (1999) *Nature* **401**: 397-399
67. Pierce AJ, Johnson RD, Thompson LH, Jasin M (1999) *Genes Dev* **13**: 2633-2638
68. Harve PA, Rice M, Ramos R, Kmiec EB (2000) *Exp Cell Res* **254**: 33-44
69. Petukhlova G, Stratton S, Sung P (1998) *Nature* **393**: 91-94
70. Peterson CL, Tamkun JW (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 143-146
71. Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, Elliot EA, Yu J, Ashley T, Arheim N, Flavell RA, Liskay RM (1995) *Cell* **82**: 309-319
72. Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM (1996) *Nature Genet* **13**: 336-342
73. Kirkpatrick DT (1999) *Cell Molec Life Sci* **55**: 437-449
74. Ross-MacDonald P, Roeder GS (1994) *Cell* **79**: 1069-1080
75. Hollingsworth NM, Ponte L, Hasley C (1995) *Genes Dev* **9**: 1728-1739
76. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, Rielc HT (1995) *Cell* **82**: 321-330
77. Ivanov EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J, Haber JE (1996) *Genetics* **142**: 693-704
78. Sugiyama T, New JH, Kowalczykowski SC (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6049-6054
79. Separbaev M, Prakash L, Prakash S (1996) *Genetics* **142**: 727-736
80. Kannouche P, Angulo JF (1999) *J Cell Sci* **112**: 3215-3224

Czy w mitochondriach działają skuteczne mechanizmy naprawy DNA?

Mechanisms of DNA repair — are they effective in mitochondria?

RYSZARD OLIŃSKI¹, MAREK JURGOWIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mechanizmy naprawy DNA w mitochondriach
 - II-1. Naprawa przez wycinanie zasad (BER)
 - II-1.1. Naprawa oksydacyjnych uszkodzeń DNA
 - II-1.1.1. Niejednorodność białek OGG 1, jako wynik alternatywnego składania mRNA
 - II-1.1.2. Czy mechanizm naprawy powiązanej z procesem transkrypcji (TCR) uczestniczy w naprawie mtDNA?
 - II-1.1.3. Naprawa miejsc apurynowych i apirymidynowych (AP)
 - II-1.2. Naprawa alkilacyjnych uszkodzeń DNA
- III. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Mechanisms of DNA repair in mitochondria
 - II-1. Base excision repair (BER)
 - II-1.1. Repair of oxidative DNA damage
 - II-1.1.1. Heterogeneity of OGG1 proteins is a result of alternative splicing of the mRNA
 - II-1.1.2. Does TCR pathway take part in repair of mtDNA?
 - II-1.1.3. Repair of apurinic and apyrimidinic sites (AP)
 - II-1.2. Repair of alkylation damage to DNA
- III. Conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: AP — miejsca apurynowe i apirymidynowe w DNA; A,T,G,C — literowe skróty oznaczają zasady azotowe: adenina, tymina, guanina, cytozyna; BER — naprawa przez wycinanie zasad azotowych; białka OGG — glikozylazy wycinające z DNA 8-oksyguaninę to funkcjonalne homologi białka Fpg u drożdży, człowieka i innych ssaków; FapyA — 4,6-diamino-5-formamidopirymidyna; FapyG — 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna; Fpg — formamidopirymidyno-DNA glikozylaza, bakteryjna glikozylaza 8-oksyguaniny; MMR — naprawa niedopasowanych zasad; mtDNA — mitochondrialny DNA; NER — naprawa przez wycinanie nukleotydów; 8-oksYG — 8-oksyguanina; 8-oksYG — 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna; 8-oksYGTP — 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna-5-trifosforan; PCR — polimerazowa reakcja łańcuchowa; TCR — naprawa genów aktywnych transkrypcyjnie.

I. Wstęp

Komórki żywych organizmów ekspozowane są na działanie czynników egzogennych i endogennych, które mogą uszkadzać ich jądrowy i mitochondrialny DNA (mtDNA). Coraz powszechniej zwraca się uwagę na znaczenie możliwych defektów genomu mitochondrialnego (mtDNA, u człowieka, to kolista cząsteczka zbudowana z 16 569 pz i zawierająca 37 genów) jako czynnika w patogenezie chorób człowieka i naturalnego starzenia się [1-3]. Duże zainteresowanie badaczy wzbudzają także mutacje mtDNA wykrywane w ludzkich tkankach nowotworowych, mające implikacje w nieprawidłowym metabolizmie i zmianach apoptotycznych w komórkach stransformowanych [4]. Mutacje mtDNA mogą mieć miejsce zarówno w komórkach linii płciowej, jak i w komórkach somatycznych. Liczne mutacje w komórkach linii płciowej są przyczyną wielu chorób przekazywanych potomstwu przez matkę (komórka jajowa jest źródłem mitochondriów, a tym samym mtDNA dla rozwijającego się zarodka), podczas gdy

¹Prof. dr hab., ²dr, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz, tel. (052) 341 4916, 341 5251; e-mail: ryszardo@aci.amb.bydgoszcz.pl; marekj@aci.amb.bydgoszcz.pl

akumulacja mutacji somatycznych w obrębie tkanek postmitotycznych powoduje postępujący spadek wydolności mitochondriów prowadząc do rozwoju wielu chorób i starzenia się [1, 2, 5].

Ze względu na lokalizację mtDNA w pobliżu mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów (generującego anionorodnik ponadtlenkowy, $O_2^{\bullet-}$) stały poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA powinien być relatywnie wyższy w mtDNA w porównaniu z DNA jądrowym. MtDNA, oprócz powstających w nim uszkodzeń oksydacyjnych, jest również zagrożony uszkodzeniami wywołanymi przez środki alkilujące i policykliczne aromatyczne węglowodory [6].

Ocenia się, że poziom oksydacyjnych uszkodzeń mtDNA jest wysoki [7] i szacowany jest nawet na 163 cząsteczki 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oksydG)/ genom ($4840 / 10^6$ zasad) w mtDNA izo-

O tym, że opisane powyżej uszkodzenia stanowią zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek, przekonuje fakt obecności enzymów specyficznym rozpoznających i usuwających oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe oraz zmodyfikowane przez czynniki innego rodzaju (np. pochodne alkilowane). Uszkodzenia takie usuwane są z jądrowego DNA na drodze reperacji przez wycinanie zasad azotowych (ang. *Base excision repair*, BER) i wycinanie nukleotydów (ang. *Nucleotide excision repair*, NER). Słabiej poznane są natomiast mechanizmy naprawcze działające w mitochondriach.

Obserwowany, wyższy poziom uszkodzonych oksydacyjnie zasad i mutacji w mtDNA, niż w DNA jądrowym, może wynikać z kilku przyczyn:

- 1) z lokalizacji mtDNA w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej gdzie generowane są oksydanty;

Tabela 1

Mechanizmy naprawy DNA obecne w jądrze komórkowym i mitochondriach — dane różnych autorów, a głównie wg [44], zmodyfikowane.

| Mechanizm naprawy DNA | Obecny w jądrze komórkowym | Obecny w mitochondriach |
|--|----------------------------|-------------------------|
| Fotoliza (naprawa fotodimerów powstałych pod wpływem promieniowania UV) | + | + |
| DNA metylotransferaza (enzym indukowany już pod wpływem niskich dawek czynników metylujących (alkilujących)) | ± | + |
| BER (naprawa przez wycinanie zasad) | - | + |
| — uszkodzenia alkilacyjne | + | + |
| — uszkodzenia oksydacyjne | + | + |
| — pęknięcia pojedynczej nici | + | + |
| MMR (naprawa niedopasowanych zasad) | + | ? |
| NER (naprawa przez wycinanie nukleotydów) | + | ? |
| TCR (naprawa genów aktywnych transkrypcyjnie) (<i>patrz również tekst</i>) | + | ? |
| Naprawa rekombinacyjna | + | ? |

lowanym z serca szczurów w wieku 100-tygodni [8]. Poziom 8-oksydG w mtDNA hodowlanych komórek HeLa oceniony został na $0,08 / 10^6$ zasad. W innych pracach wykazano, że w mtDNA wątroby szczura powstawać może od $4 / 10^6$ do $110 / 10^6$ uszkodzonych zasad [9, 10]. W mtDNA izolowanym z wątroby świni wykazano obecność 4,4 razy większej liczby cząsteczek 8-oksyguaniny (8-oksydG) w porównaniu z DNA jądrowym. Podobne wyniki uzyskane zostały podczas detekcji 5-hydroksycytozyny (5-OHC) w tej samej tkance. Należy podkreślić, że 8-oksydG i 5-OHC charakteryzuje wysoki potencjał mutageny [11].

- 2) z faktu, że mtDNA nie jest skompleksowany z białkami (brak histonów i białek niehistonowych, które w jądrze komórkowym wchodzi w skład chromatyny);

- 3) z faktu, że mtDNA ssaków (w tym i człowieka) nie zawiera intronów, a więc do utrzymania funkcji bioenergetycznych niezbędna jest ekspresja całego genomu;

- 4) oraz jak sądzą niektórzy autorzy z faktu, że mechanizmy naprawy DNA w mitochondriach działają mniej skutecznie niż w jądrze komórkowym.

Jednakże, ostatnio pojawiają się prace wykazujące obecność wydajnie funkcjonujących syste-

mów naprawiających uszkodzenia DNA w mitochondriach. Niniejszy artykuł poświęcony jest temu nadal kontrowersyjnemu zagadnieniu.

II. Mechanizmy naprawy DNA w mitochondriach

II-1. Naprawa przez wycinanie zasad (BER)

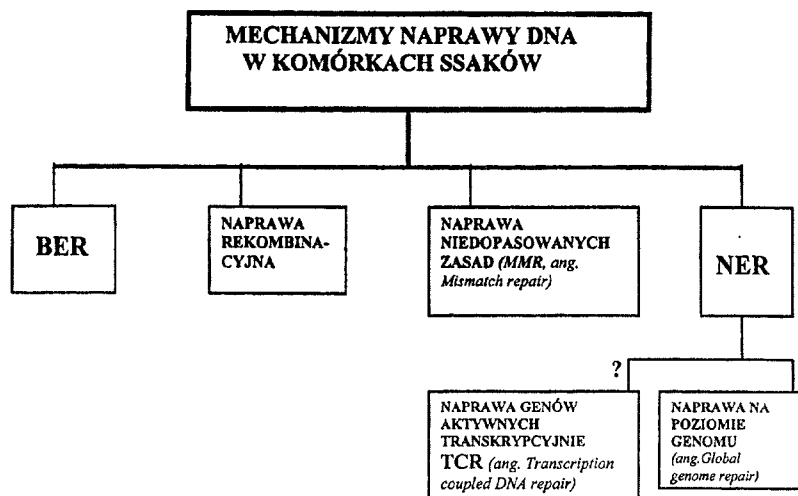
Głównym mechanizmem naprawiającym uszkodzenia związane z obecnością oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA jest BER. Naprawa przez wycinanie zasad różni się od innych mechanizmów naprawy (NER i naprawy niedopasowanych zasad — MMR, ang. *Mismatch repair*) obecnością specyficznych enzymów rozpoznających i usuwających uszkodzone zasady oraz rozmiarami luki powstającej po usunięciu uszkodzenia [12-14].

Oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe mogą zostać wycięte z łańcucha DNA z udziałem — DNA glikozylaz. Enzymy te specyficznie rozpoznają zmodyfikowane zasady purynowe, bądź pirymidy-

pośrednim sąsiedztwie uszkodzenia. Daje to 3'OH wolny koniec dla działania polimerazy DNA.

Glikozylazy/AP liazy dokonują cięcia na końcu 3'AP. Nacięcie i usunięcie miejsca apurynowego i apirymidynowego przez endonukleazy AP zachodzi w sposób skoordynowany i daje jednonukleotydową lukę w nici DNA (w komórkach ssaków 75% reszt 8-oksydG jest naprawiana z powstaniem jednonukleotydowych luk, a tylko 25% z powstaniem luk kilkunukleotydowych) [15]. Skoordynowane działanie polimerazy DNA i ligazy łączy wolne końce DNA. Jest to główna droga usuwania uracylu z cząsteczki DNA oraz adduktów zasad z prostymi związkami alkilującymi.

Ostatnio zidentyfikowano inną możliwość naprawy przez wycinanie zasad azotowych. Dowodów na obecność mechanizmów usuwających zmodyfikowane zasady niezależnie od obecności polimerazy β dostarczyły doświadczenia z komórkami fibroblastów otrzymanych z embrionów myszy pozbawionych genu kodującego polimerazę β (ang. *Pol β -knock down mouse*). Takie komórki są wrażliwe na



Ryc. 1. Główne mechanizmy naprawy DNA w komórkach ssaków — dane różnych autorów, a głównie wg [72] — zmodyfikowane. BER — naprawa przez wycinanie zasad, NER — naprawa przez wycinanie nukleotydów. Według ostatnio opublikowanych danych [71] naprawa typu TCR może stanowić mechanizm nadrzędny (?) i połączony ze ścieżkami naprawczymi typu BER i NER.

nowe. Glikozylazy mogą wycinać zmodyfikowane zasady w wyniku hydrolizy wiązania N-glikozydowego łączącego zmodyfikowaną zasadę z resztą cukrową. W komórkach obecne są dwa typy glikozylaz: (a) Glikozylazy hydrolizujące wiązanie N-glikozydowe, co prowadzi do powstania w łańcuchu DNA miejsc apurynowych i apirymidynowych (miejsca AP); (b) Glikozylazy/AP liazy to enzymy nie tylko hydrolizujące wiązanie N-glikozydowe, ale jednocześnie mając właściwości liazowe nacinają w DNA miejsca apurynowe i apirymidynowe.

Miejsca apurynowe i apirymidynowe są usuwane przez odpowiednie endonukleazy AP rozszczepiające wiązania fosfodiesterowe od końca 5' w bez-

działające na nie związki alkilujące, ale uszkodzenia powstające po ekspozycji na reaktywne formy tlenu są usuwane równie efektywnie, jak w komórkach kontrolnych. W tym kontekście należy zwrócić uwagę na różnicę pomiędzy glikozylazami rozpoznającymi uracyl i alkilowane zasady oraz enzymami rozpoznającymi oksydacyjnie zmodyfikowane zasady. W pierwszym przypadku zasada jest rozpoznawana przez glikozylazę bez aktywności AP endonukleazy. W drugim przypadku kompleks enzymatyczny nie tylko hydrolizuje wiązanie N-glikozydowe, ale dzięki aktywności AP liazy nacinają DNA. Postuluje się, że naprawa inicjowana przez ten typ glikozylaz może przebiegać II-gą ścieżką naprawy,

zależną od polimeraz replikacyjnych (δ i ϵ), czynnika proliferacyjnego PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) i od endonukleazy typu FEN (ang. *Flap-endonuclease*). Ta ścieżka reperacyjna pozostawia 2-5 nukleotydową lukę wypełnianą przez polimerazy replikacyjne, które przyłączałyby się do DNA za pośrednictwem czynnika PCNA [16].

Jak zaznaczono wcześniej, około 25% 8-oksYG usuwane jest przez dłuższą ścieżkę naprawy, nie znaczy to jednak, że pozostałe zmodyfikowane zasady usuwane są na drodze zależnej od polimerazy β . Wyniki cytowanej powyżej pracy sugerują, że nawet powstająca w wyniku wycinania 8-oksYG jednonukleotydowa luka może być wypełniana przez polimerazy DNA inne niż polimeraza β .

Glikozylazą, której aktywność po raz pierwszy wykazano w mitochondriach jest DNA glikozylaza uracylu (ang. *Uracil DNA glycosylase*, UDG) [17]. Następnie okazało się, że mitochondrialna UDG izolowana z wątroby szczura wykazuje niewielkie różnice biochemiczne w porównaniu do UDG jądrowej [18, 19]. W drożdżach mutacyjna inaktywacja jądrowej izoformy DNA glikozylazy uracylu nie ma wpływu na aktywność enzymu mitochondrialnego [20]. Wynik ten sugerował, że jądrowa i mitochondrialna forma UDG kodowane są przez dwa różne geny. Jednakże po przeprowadzeniu dalszych badań udało się wykazać, że izoformy — mitochondrialna i jądrowa są produktem tego samego genu i powstają przez alternatywny *splicing* oraz poprzez wykorzystanie dwóch różnych kodonów *start* [21-23]. Jest to enzym wysoce specyficzny wobec uracylu w DNA. Może usuwać uracyl z pary A-U, jak i G-U eliminując skutek dezaminacji cytozyny i przeciwdziałając zmianom mutagennym.

Z badań *in vitro* wynika, że substratami dla DNA glikozylazy uracylu może być także 5-hydroksyuracyl (5-OHU) i 5,6-dihydroksyuracyl (5,6-dihOHU). Gen kodujący ten enzym zlokalizowany w *locus* 12q23-q24.1 składa się z 7 eksonów obejmujących 13,8 Kz. Jest w wysokim stopniu konserwatywnym ewolucyjnie i wykazującym duże podobieństwa międzygatunkowe. Dwie formy glikozylazy uracylowej — UDG1 i UDG2 zlokalizowane są odpowiednio w mitochondriach i w jądrach komórkowych. W miejscach promotorowych genu glikozylazy uracylowej brak jest sekwencji TATA, występują natomiast liczne wyspy CpG, co sugeruje konstytutywny charakter genu [24]. mRNA dla glikozylazy mitochondrialnej koduje białko złożone z 304 aminokwasów, z których 35 pierwszych jest unikalnych dla tej formy. W mRNA glikozylazy UDG2 za-

warta jest informacja dla białka składającego się z 313 aminokwasów, z których pierwsze 44 są charakterystyczne dla formy jądrowej. Unikalne, N-końcowe sekwencje są niezbędne dla lokalizacji glikozylazy, nie mają natomiast znaczenia dla ich właściwości katalitycznych. W 269 aminokwasowym fragmencie wspólnym dla obu form znajduje się domena katalityczna złożona z 220 aminokwasów oraz część N-terminalna, do której może przyłączać się białko replikacyjne A. Do tzw. kieszeni w centrum aktywnym glikozylazy uracylowej może wejść tylko uracyl, a nie może tymina, czy cytozyna. Odpowiada za to obecność asparaginy w pozycji 204 enzymu, która tworzy wiązanie wodorowe z O⁴ pierścienia pirymidynowego uracylu, a nie tworzy takiego wiązania z grupą NH₂, co uniemożliwia wejście cytozyny. Obecność tyrozyny w pozycji 147 stanowi barierę przestrzenną dla grupy CH₃ tyminy. Zmianę specyficzności tej glikozylazy powoduje zamiana aminokwasów w wymienionych dwóch pozycjach [25].

II-1.1. Naprawa oksydacyjnych uszkodzeń DNA

Oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych można podzielić na dwie grupy: a) potencjalnie mutagenne, oraz b) blokujące proces replikacji DNA. Typowym przykładem oksydacyjnego uszkodzenia DNA prowadzącego do bloku replikacyjnego jest powstawanie glikolu tyminy. Ponadto jest prawdopodobne, że obecność w cząsteczce DNA obu produktów częściowego rozpadu pierścienia purynowego tzn. 2,4-diamino-5-formamidopirymidyny (FapyA) i 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyny (FapyG) może skutkować zahamowaniem procesu replikacji [12, 26, 69].

Badania z zastosowaniem różnych metod biochemicznych, badań specyficznej genowo naprawy, czy też metod bazujących na PCR pozwoliły stwierdzić, że w mitochondriach obecne są sprawnie funkcjonujące mechanizmy naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Naprawa uszkodzeń w mtDNA komórek eukariotycznych, zachodząca z udziałem funkcjonalnych homologów białka Fpg (Fpg to pierwsza opisana glikozylaza 8-hydroksyguaniny u *E. coli*), została stwierdzona w komórkach szczura, komórkach CHO (ang. *Chinese hamster ovary cells*) oraz komórkach człowieka [12, 27-29]. Okazało się, że uszkodzenia DNA indukowane przez oranż akrydynowy (AO) i światło podlegają naprawie, zarówno w sekwencjach jądrowego, jak i mtDNA. Ciekawe jest, że naprawa w cząsteczkach mtDNA zachodziła w opisywanym eksperymencie z tą samą szybkością, lub nawet szybciej niż w obrębie jądrowego DNA.

Także w badaniach z zastosowaniem metod genowo specyficznej naprawy DNA stwierdzona została naprawa 8-oksydG w obrębie mtDNA człowieka [27]. Po ekspozycji komórek na działanie czynnika specyficznie indukującego powstanie 8-oksydG, jakim jest błękit metylenowy/światło użyto glikozylazy do detekcji oksydacyjnych uszkodzeń mtDNA. W tym przypadku stwierdzono [27], że usuwanie z DNA uszkodzeń w postaci 8-oksydG nie zachodzi na drodze naprawy połączonej z procesem transkrypcji (ang. *Transcription coupled repair*, TCR) (patrz również dalej).

II-1.1.1. Niejednorodność białek OGG1, jako wynik alternatywnego składowania mRNA

Funkcjonalnymi homologami bakteryjnego białka Fpg jest u drożdży, człowieka i innych ssaków rodzina białek OGG1 (ang. *8-oxoguanine glycosylase*). Białka te uczestniczą w naprawie utlenionej guaniny w DNA.

Gen kodujący OGG1 z komórek człowieka wykazuje 38% identyczności z homologicznym genem drożdży *S. cerevisiae* [30]. Analiza sekwencyjna cDNA człowieka pozwoliła na wykrycie dwóch typów mRNA, z otwartą ramką odczytu, kodujących białka zawierające 345 i 424 aminokwasy (odpowiednio α i β hOGG1). Porównanie sekwencji obu typów wykazało, że dwa białka kodowane przez te mRNA mają identyczne 316 aminokwasów od końca -NH₂. Obie formy zawierają mitochondrialną sekwencję sygnałową, obejmującą pierwszych 30 aminokwasów końca -NH₂, podczas gdy sekwencja końca -COOH jest zupełnie różna. Sekwencje ludzkiego α hOGG1 i drożdżowego OGG1 są bardzo podobne, szczególnie w rejonie jądrowej sekwencji sygnałowej. Stwierdzono obecność obu form mRNA w większości tkanek człowieka.

Ludzki α mRNA glikozylazy 8-oksyguaniny zawiera około 7Kz i obejmuje 7 eksonów. Natomiast β OGG1 dzieli 6 pierwszych eksonów z formą α , ale w konsekwencji alternatywnego składowania 7 ekson jest zastąpiony przez inny, ułożony około 8Kz w dół (w kierunku 3') od ostatniego eksonu formy α . Ciekawe jest, że terminalne sekwencje eksonu 7 genu *OGG1* odpowiadają antysensownej nici genu kinazy kalmodulinowej I (*CaMK1*). Oba geny są transkrybowane z zachodzących na siebie sekwencji. Formę α zlokalizowano w jądrze komórkowym, natomiast formę β w mitochondrium [30].

Ostatnie badania wykazały, że w wyniku alternatywnego składowania w obrębie dwóch opisanych powyżej typów mRNA ludzkiej glikozylazy 8-oksyguaniny powstaje 7 alternatywnie składowanych rodza-

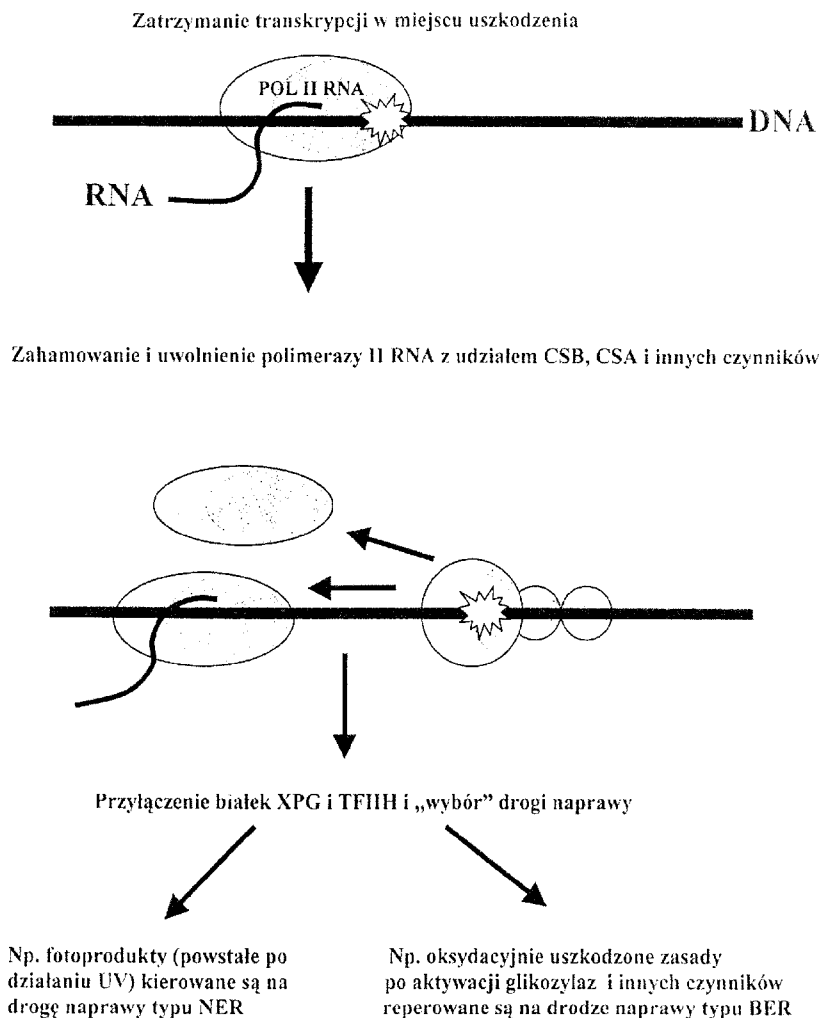
jów mRNA kodujących różne białka enzymatyczne [31]. Tylko jeden z tych enzymów został zlokalizowany w jądrze, a pozostałe w mitochondrium. Badania immunocytochemiczne pozwoliły na lokalizację enzymu mitochondrialnego w obrębie wewnętrznej błony mitochondrialnej. Stwierdzono, że ekspresja genu *OGG1* zachodzi we wszystkich badanych tkankach (mózg osobników dojrzałych i płodów, nerki, grasica, jądra, jajniki i płuca) ale jej poziom jest najwyższy w mózgu.

Gen *OGG1* został zlokalizowany w *locus* 3p26. Typ α , izoforma I zawierająca siedem eksonów obejmuje 7421 pz. Region promotorowy nie zawiera kasyety TATA. Region ten jest bogaty w pary GC, co jest charakterystyczne dla genów konstytutywnych. Sekwencja ostatnich 55 zasad, od końca 3' nie ulegających translacji, w eksonie 7 jest bardzo podobna w materiale genetycznym organizmów różnych gatunków. Związane jest to prawdopodobnie z obecnością w tym miejscu sekwencji kodujących gen *CaMK1* (patrz wyżej). W rejonie intronów 3 i 4 znaleziono 7 sekwencji Alu, co może czynić ten region podatny na rearanżacje.

Skuteczna naprawa miejsc wrażliwych na działanie białka Fpg wskazuje, że mitochondria wyposażone są w enzymy wycinające utlenioną guaninę z DNA. W jądrowym DNA ssaków oksydacyjne uszkodzenia guaniny są eliminowane dzięki działaniu 8-oksydG DNA glikozylazy/AP liazy (białko OGG1), DNA glikozylazy adeninowej (OGG2) usuwającej 8-oksyg sparowaną z adeniną oraz fosfatazy 8-oksyo-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanu (8-oksydGTPazy) [12, 32]. W jednym z doświadczeń użyte zostały izolowane mitochondria wątroby szczura do uzyskania enzymu 8-oksydG DNA glikozylazy/AP liazy usuwającego specyficznie 8-oksydG. Glikozylaza izolowana z mitochondriów szczura wycinająca 8-oksyg nazwana została mtODE. Enzym ten rozpoznaje specyficznie pary 8-oksydG:dC [16]. Substratem mtODE jest 8-oksydG w kontekście pary 8-oksydG:dC podobnie jak w przypadku wcześniej izolowanego jądrowego OGG1 [33]. Nie jest dotąd pewne, czy enzymy izolowane z mitochondriów aktywne są tylko w mitochondriach, czy też może wykazują aktywność naprawczą także w jądrze. MtODE wycina 8-oksydG i rozcina nić DNA na drodze β -eliminacji (enzym ten ma masę cząsteczkową 25 000-30 000). MtODE nie ma jednak zdolności usuwania z DNA Fapy-7MeG. Wydajność naprawy 8-oksydG przez ten enzym zależy od zasady z którą to uszkodzenie zostało sparowane. Preferowane są pary z C, natomiast pary z G lub A są bardzo słabo rozpoznawane i metabolizowa-

ne. Według niektórych autorów [16] mtODE najprawdopodobniej nie jest mitochondrialną formą OGG1, pomimo, że geny mysich i ludzkich homolo-

gów OGG1 zawierają sekwencje sygnałowe kierujące do mitochondriów i ich produkty są kierowane do mitochondriów [34]. 8-oksyo-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan (8-oksyoGTP) jest usuwany z puli nukleotydów ponieważ wstawienie tak zmodyfikowanego nukleotydu do DNA, przez polimerazy DNA, zwiększa częstotliwość mutacji. Jeżeli 8-oksyoGTP nie zostanie zhydrolizowany przez odpowiednią fosfatazę (białko Mut T w komórkach bakteryjnych lub jego homologi w komórkach eukariotycznych) to 8-oksyoG może być włączana do nowo syntetyzowanej nici naprzeciwko adeniny. Usunięcie utlenionego nukleotydu jest możliwe dzięki aktywności 8-oksyoGTPazy, która rozkłada 8-oksyoGTP do 8-oksyoGMP i zapobiega włączaniu



Ryc. 2. Uszkodzenia takie jak 8-oksyoanina i glikol tyminy są usuwane z DNA na drodze naprawy połączonej z transkrypcją (TCR). Naprawa dodatkowo wymaga zaangażowania mechanizmu typu BER. Polimeraza II RNA jest hamowana przez uszkodzenie (w tym wypadku 8-oksyoaninę). Zaproponowano ciekawy model reperacji powiązanej z transkrypcją, który łączy mechanizmy naprawy typu NER i BER. Po osiągnięciu miejsca, które wymaga reperacji (⚡) polimeraza zostaje uwolniona z udziałem czynników CSA i CSB, a do uszkodzonego miejsca są przyłączane białka XPG i TFIIH, które „oceniają” rodzaj uszkodzenia i w zależności od tego decydują o zaangażowaniu mechanizmu naprawy typu NER lub BER (w świetle ostatnich danych [71] w przypadku 8-oksyoG jest to proces naprawy typu BER) (na podstawie [70] — zmodyfikowane).

wana jest za funkcjonalny analog bakteryjnego białka MutT. 8-oksyoGTPaza jest białkiem o masie 18kDa, które zapobiega włączaniu uszkodzonego nukleotydu do puli trifosforanów nukleotydów i DNA, gdyż kinaza guanylowa fosforylująca dGMP do dGDP i dGTP jest nieaktywna wobec 8-oksyoGMP, a nukleotydaza wydajnie defosforyluje 8-oksyoGMP do nukleozydu, który wydalany jest poza komórkę [36]. Mitochondria także posiadają 8-oksyoGTPazę, która zapobiega włączaniu mutagennych nukleotydów do nowo replikowanych nici DNA [37]. Najprawdopodobniej jądrowy gen *MTH1* koduje, zarówno jądrową, jak i mitochondrialną izoformę białka enzymatycznego. Jeżeli 8-oksyoGTP nie zostanie zhydrolizowany przez odpowiednią fos-

fatazę, to 8-oksyoG może być włączana do nowo syntetyzowanej nici naprzeciwko adeniny. W komórkach bakteryjnych taka mutagenna zmiana może być korygowana przez białko mutY, które wycina adeninę z utworzonej pary zasad. W komórkach człowieka zidentyfikowano enzym o analogicznej funkcji (białko MYH). Jednak droga naprawy z udziałem tego enzymu jest mało precyzyjna. W miejsce wyciętej adeniny może być włączona cytozyna, możliwe jest jednak ponowne włączenie adeniny. W komórkach HeLa wykryto aktywność enzymu OGG2. Postuluje się, że białko to usuwa 8-oksyoG tylko z nowo zsintetyzowanej nici zapobiegając w ten sposób mutacjom wynikającym z braku hydrolizy 8-oksyoGTP [38].

Ludzki gen *MYH* (*hMYH*) koduje białko złożone z 535 aminokwasów, które wykazują 41% homologii do bakteryjnego białka MutY [30]. Jako wynik alternatywnego składowania genu *hMYH* powstają białka dwu typów enzymatycznych. Pierwsze zlokalizowane w mitochondriach, oraz drugie w jądrze komórkowym. Poziom ekspresji białka mitochondrialnego jest wyższy niż formy jądrowej. Poziom ekspresji obu izoform jest wyraźnie wyższy w szybko dzielących się komórkach, co można tłumaczyć aktywnością tych enzymów skierowaną na korekcję błędów powstających podczas replikacji, wynikających z włączania 8-oksyoG naprzeciwko adeniny [40].

8-oksyoG jest modyfikacją często powstającą w mitochondriach i uznana jako swoisty marker oksydacyjnych uszkodzeń mitochondriów [41], ale nie jest to jedyna oksydacyjna modyfikacja powstająca w mtDNA. W mtDNA stwierdzono powstawanie oksydacyjnie zmodyfikowanych pochodnych pirymidyn [42, 11]. Jedną z takich pochodnych jest glikol tyminy powodujący silny blok replikacyjny. W określonym kontekście zasad 5'-C(Tg)C-3' i 5'-C(Tg)A-3' modyfikacja ta może prowadzić do tranzykcji T→C z częstością 0,3-0,45% [43]. Naprawa glikolu tyminy w jądrowym DNA przebiega według podobnego mechanizmu jaki opisany został dla naprawy 8-oksyoG. DNA glikozylazy których substratem jest glikol tyminy i inne pochodne pirymidynowe, hydrolizują wiązanie N-glikozydowe pomiędzy cukrem a uszkodzoną zasadą, w wyniku czego powstają miejsca AP podlegające naprawie. Takie DNA glikozylazy/AP liazy, pochodzące z różnych organizmów, w tym człowieka, zostały izolowane i sklonowane (przegląd wg. [44]).

Obecnie dopuszcza się istnienie co najmniej trzech enzymów mitochondrialnych (aktywność enzymatyczna badana była w mitochondriach wątroby

szczura) specyficznie usuwających glikol tyminy z helisy DNA [47]. Jednym z takich enzymów jest mitochondrialna endonukleaza glikolu tyminy (*ang. Mitochondrial thymine glycol endonuclease*, mtT-Gendo). Aktywność mtT-Gendo powiązana jest z aktywnością AP liazową. Enzym ten nie ma zdolności wycinania z DNA 8-oksyoG, jak również uracylu. Masa cząsteczkowa mitochondrialnej endonukleazy glikolu tyminy wynosi około 30kDa. Pierwszą glikozylazą opisaną jako enzym naprawiający w DNA utlenione pirymidyny była endonukleaza III z *E. coli* kodowana przez gen *nth* [48]. Strukturalne analogi białka Nth – rodzinę białek NTG (*ang. Endonuclease of thymine glycol*) opisano w komórkach eukariotycznych. Są to, zarówno komórki *S. cerevisiae*, jak i komórki człowieka [49-51]. Dwie izoformy endonukleazy glikolu tyminy tj. NTG1 i NTG2 różnią się kilkoma cechami, między innymi tym, że NTG2 znaleziono wyłącznie w jądrze komórkowym, a NTG1 znaleziono w jądrze i mitochondriach [52]. Ludzki enzym NTG1 zlokalizowany został zarówno w jądrze, jak i mitochondriach [40]. Najprawdopodobniej NTG1 pochodzący z *S. cerevisiae* zawiera sekwencję sygnałową kierującą go do mitochondrium [53]. Ciekawe są spostrzeżenia dotyczące poziomu tych enzymów w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Okazało się, że białko NTG2 jest enzymem konstytutywnym, a poziom NTG1 wyraźnie wzrasta pod wpływem działania na komórki czynników utleniających [52]. Specyficzność substratowa NTG1 i NTG2 jest dość podobna. Zaobserwowano jednakże, że NTG1 wycina również 8-oksyoG sparowaną z guaniną. Natomiast oba enzymy naprawiają glikol tyminy, 5-hydroksyuracyl, 5-hydroksy-5-metylohydantoinę, 5-hydroksy-6-hydrouacyl, 5-hydroksy-6-hydrotyminę [54], jak również puryny z otwartym pierścieniem imidazolowym. Białko NTG1 mniej wydajnie niż NTG2 naprawia 5-hydroksycytozynę. NTG1 lepiej natomiast naprawia fotoprodukty cytozyny powstałe na skutek naświetlania UV [52]. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa NTG1 i NTG2 może sugerować, że rolą NTG2 jest naprawa DNA jądrowego, natomiast NTG1 uzupełniałby tę aktywność w stanie stresu oksydacyjnego, w którym mitochondria wytwarzają większe ilości reaktywnych form tlenu, a tym samym ilość uszkodzeń przekraczających zdolność naprawczą NTG2. Jednak główną funkcją NTG1 jest naprawa DNA mitochondrialnego [52].

Jedną z zaproponowanych hipotez [45] zakłada, że dla reperacji glikolu tyminy wymagane są białka uczestniczące w naprawie typu BER i białko XPG – będące jednym z czynników w naprawie NER.

Białko XPG jest jednym z białek systemu naprawczego NER (zmutowane w chorobie *Xeroderma pigmentosum* charakteryzującej się wzrostem wrażliwości na światło UV i powstawaniem nowotworów skóry). Możliwe są dwa typy szlaków naprawy glikolu tyminy (prawdopodobnie również 8-oksYG) — szybszy i wolniejszy. Pierwszy jest transkrypcyjną naprawą przez wycinanie zasad i wymaga udziału białek: XPG (aktywność niezależna od właściwości nukleazowej), CSB lub CSA (te białka enzymatyczne uczestniczą w mechanizmie naprawy typu TCR — patrz niżej; brak aktywności białek CSA i CSB stwierdzono u chorych z zespołem Cockayne — patrz również [70]) i aktywności glikozylazy/AP liazy. Drugi typ naprawy, operujący na poziomie całego genomu wymaga białka XPG i aktywności glikozylazy/AP liazy. Model ten został ostatnio uzupełniony o jeszcze jeden typ naprawy usuwający obok glikolu tyminy również 8-oksYG. Ten typ naprawy, wymagający wszystkich białek uczestniczących w naprawie typu NER i aktywności nukleazowej białka XPG, zaproponowano w przypadku naprawy jądrowego DNA [46]. Niewykluczone, że podobne mechanizmy mogą funkcjonować również w mitochondriach.

II-1.1.2. Czy mechanizm naprawy powiązanej z procesem transkrypcji (TCR) uczestniczy w naprawie mtDNA?

Do niedawna uważano, że w mechanizmie naprawy przez wycinanie nukleotydów (NER) można wyróżnić dwie ścieżki reperacyjne. Jedna operująca na poziomie całego genomu (ang. *Global genome repair*, GGR) i druga, szybsza zależna od RNA polimerazy II, ograniczająca naprawę do genów aktywnych transkrypcyjnie (dotyczy to głównie nici służącej jako matryca). Nazwę tej drugiej drogi naprawy (ang. *Transcription coupled repair*) można przetłumaczyć jako naprawa powiązana z procesem transkrypcji (TCR). Warto w tym miejscu zacytować najnowsze poglądy dotyczące roli naprawy powiązanej z procesem transkrypcji w usuwaniu oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad. W świetle wyników opublikowanych niedawno w czasopiśmie *Cell* wydaje się, że TCR może być mechanizmem nadrzędnym w stosunku do naprawy typu NER i BER i połączonym z obu tymi ścieżkami reperacyjnymi [70, 71]. Autorzy cytowanej powyżej pracy stwierdzili, że 8-oksYG, podobnie jak glikol tyminy, jest usuwana na drodze naprawy powiązanej z transkrypcją, ale naprawa uszkodzenia wymaga zaangażowania mechanizmu naprawy typu BER. Wykazano, że polimeraza II RNA jest hamowana przez

uszkodzenie (w tym przypadku 8-oksYG). Zaproponowano ciekawy schemat reperacji powiązanej z transkrypcją, który łączy mechanizmy naprawy typu NER i BER. Po osiągnięciu miejsca, które wymaga naprawy polimeraza musi zostać uwolniona, a do uszkodzonego miejsca są przyłączane białka XPG i TFIIH, które „oceniają” rodzaj uszkodzenia i w zależności od tego decydują o zaangażowaniu mechanizmu naprawy typu NER lub BER (w świetle wyników ostatnich badań [71] w przypadku 8-oksYG jest to proces naprawy typu BER). Wprawdzie nie ma jeszcze dowodów na udział opisanego wyżej mechanizmu naprawy w usuwaniu oksydacyjnych uszkodzeń z mtDNA, ale wobec zaangażowania w prace wielu ośrodków badających mitochondrialne mechanizmy naprawy DNA, wydaje się, że jest tylko kwestią czasu stwierdzenie tego faktu.

II-1.1.3. Naprawa miejsc apurynowych i apirymidynowych (AP)

Miejsca apurynowe i apirymidynowe (AP), jak wiadomo, mogą być źródłem mutacji. Miejsca AP powstawać mogą wskutek oddziaływania z DNA różnych związków chemicznych, na skutek działalności DNA glikozylaz (np. mitochondrialnej glikozylazy uracylu), bądź na skutek spontanicznej hydrolizy zasad.

Naprawy miejsc apurynowych i apirymidynowych dokonują AP endonukleazy. Enzymy te tną wiązanie po stronie 5' AP co daje wolny koniec 3'OH i 5'-fosfodeoksyrybozę [12, 56, 57].

Badania mitochondrialnych AP endonukleaz komórek HeLa z zastosowaniem przeciwciał wykazały, że odpowiadają one pasmom wielkości 66kDa. Natomiast cytoplazmatyczna forma AP endonukleazy myszy odpowiada 41kDa. Niektórzy autorzy [58] sugerują, że mało prawdopodobne jest aby mitochondrialna AP endonukleaza była produktem jądrowego genu dla AP endonukleazy identycznym z AP endonukleazą zlokalizowaną w jądrze. Tezę tą poparli badania [40], w których wykluczono mitochondrialną lokalizację jądrowej formy AP endonukleazy. Następnym krokiem było sklonowanie genu mitochondrialnej AP endonukleazy.

Z niedawno przeprowadzonych badań [59] wynika, że skuteczna naprawa uszkodzeń mtDNA przebiega z udziałem enzymów mitochondrialnych. Autorzy cytowanej pracy obserwowali naprawę miejsc AP w warunkach *in vitro* używając w eksperymencie izolowanych składowych mitochondrialnych. W badaniach użyto mitochondrialną AP endonukleazę, mitochondrialną glikozylazę uracylu, polimerazę DNA (pol γ) i ligazę. W eksperymencie tym wykaza-

no, że mitochondrialna polimeraza DNA (pol γ) uczestniczy w szlaku naprawy typu BER w rekonstruowanym systemie mitochondrialnym. Cytowani autorzy izolowali również ligazę mitochondrialną o masie 100 kDa, sugerując, że mitochondrialna ligaza może powstawać jako alternatywny produkt genu DNA ligazy III.

II-1.2. Naprawa alkilacyjnych uszkodzeń DNA

Alkilacyjne uszkodzenia DNA są naprawiane efektywnie z udziałem systemu BER. W mitochondrialnym DNA wykazano obecność alkilowanych zasad (metylowanych, etylowanych). Do takich produktów alkilacji należą 7-metyloguanina, 3-metyloguanina, 3-metyloadenina. Najczęściej metylowaną zasadą jest guanina. Czynnikiem alkilującym DNA, stosowanymi w badaniach uszkodzeń mtDNA, są np. streptozotocyna, metylnitrozomocznik i sulfonian metano-metylowy [różni autorzy, wg 44]. W eksperymentach, w których stosowano wszystkie z wymienionych wyżej czynników alkilujących, naprawa w mtDNA zachodziła tak jak w genomie jądrowym. Iperyt azotowy jest czynnikiem również inicjującym uszkodzenia alkilacyjne DNA, jednak nie obserwowano naprawy powstających pod jego wpływem uszkodzeń w obrębie mtDNA [55]. Być może dlatego, że czynnik ten odpowiedzialny jest za powstawanie poprzecznych wiązań międzyciociowych. W jądrowym DNA kompleksy takie są naprawiane przez system NER. Jak jednak obecnie przypuszcza się system naprawy NER nie jest aktywny w mitochondriach, bądź jest bardzo mało wydajny.

III. Uwagi końcowe

W komórkach organizmów eukariotycznych mechanizmy naprawy DNA są bardziej złożone w porównaniu z komórkami Prokaryota. Jest to wynikiem bardziej złożonej struktury genomu eukariotycznego w porównaniu z prokariotycznym, skomplikowanego przebiegu cyklu komórkowego, oraz obecnością organelli zawierających własne genomy (plastidy i mitochondria). W toku ewolucji mechanizmów naprawy DNA powstały także enzymy działające w organellach komórkowych [60].

Przeciętna komórka ciała człowieka, za jaką uważany może być np. hepatocyt, zawierać może tysiące cząsteczek mtDNA. Zależy to od liczby mitochondriów obecnych w komórce, a każde mitochondrium zawierać może od 2 do 10 cząsteczek mtDNA. Mitochondria stanowią mogą nawet 12% objętości komórki. W obliczu tak dużej liczby mitochondriów, zatem i kopii mtDNA obecnych w każdej komórce

można zastanowić się, czy z energetycznego punktu widzenia komórce „opłaca się” wydatkować dużą ilość energii na utrzymanie i funkcjonowanie wydajnych systemów naprawiających DNA w mitochondriach. Wiadomo jest obecnie, że uszkodzenia mtDNA mogą odpowiadać za deficyt energii w komórce (spowodowany spadkiem wydolności mitochondriów), co osłabia jej prawidłową aktywność, jak również ogranicza możliwości adaptacyjne komórki w warunkach różnego typu szoku fizjologicznego [61]. Może to być powodem rozwoju różnego typu stanów chorobowych (nowotwory [39], choroby układu krążenia, niedobory układu immunologicznego, choroby neurodegeneracyjne) oraz zmian związanych ze starzeniem się. Mitochondria określane są nawet jako „swoisty zegar biologiczny” odmierzający czas życia organizmu [62]. Jeszcze kilkanaście lat temu za dogmat uważano brak mechanizmów naprawy DNA w mitochondriach. Od kilku lat, w wielu publikacjach, potwierdza się już wprawdzie obecność systemów naprawczych w mitochondriach, ale podkreślając jednocześnie ich niewielką wydajność. Jako potwierdzenie podawany jest fakt 5-10-krotnie większego tempa powstawania mutacji w mtDNA ssaków w porównaniu do DNA jądrowego [63]. Mitochondria są miejscem przebiegu szczególnie intensywnych procesów oksydacyjnych. Oksydacyjne uszkodzenia zasad są kumulowane w mtDNA, co jest przyczyną mutacji i ma udział w procesach starzenia i śmierci komórki. W tym aspekcie interesujące są wyniki niedawno opublikowanych badań dotyczące aktywności mitochondrialnej glikozylazy wycinającej 8-oksydG (mtODE) w mitochondriach wątroby i serca starzejących się szczurów [64]. Wykazano w tych badaniach wyższą aktywność mtODE u 12- i 23-miesięcznych szczurów, w porównaniu do zwierząt młodszych (6-miesięcznych), zarówno w ekstraktach wątroby, jak i serca. Wyniki te sugerują, że zdolność naprawy 8-oksydG, która akumulowana jest w mtDNA wraz ze wzrastającym wiekiem, nie obniża się, a raczej wzrasta wraz z wiekiem. W przypadku innych enzymów (np. DNA glikozylazy uracylu) z ekstraktów mitochondrialnych uzyskiwanych od szczurów w różnym wieku nie odnotowano zmian związanych z wiekiem. Specyficzny wzrost aktywności 8-oksydG endonukleazy sugeruje możliwość indukcji tej drogi naprawy wraz ze wzrastającym wiekiem [64].

Z biologicznego, ale i z klinicznego punktu widzenia istotny wydaje się fakt, że 8-oksydG będąca swoistym markerem oksydacyjnych uszkodzeń DNA, ma działanie promutagenne [39]. Poziom 8-oksydG mitochondrialnego DNA w mięśni prze-

pony człowieka, w wieku 85 lat, stanowi około 0,5% cząsteczek deoksyguanozyny (dG) w DNA tej organeli. Porównanie tego wyniku z mtDNA izolowanym od osobników młodych wskazuje na 25-krotny wzrost poziomu 8-oksydG wraz z wiekiem. Wysoki poziom 8-oksydG (0,87% cząsteczek dG) obserwowano także w mtDNA izolowanym z tkanki mózgu, pochodzącej od osobnika w wieku 90 lat [65]. Powiązanie coraz większej grupy chorób z uszkodzeniami mtDNA [66], także chorób nowotworowych [67] powoduje, że coraz większą uwagę zwraca się na mechanizmy naprawy DNA funkcjonujące w mitochondriach. Niniejsze opracowanie, opierające się na najnowszych doniesieniach pochodzących z prowadzących laboratoriów zajmujących się naprawą DNA, potwierdza współczesne sugestie o wydajnie funkcjonujących mechanizmach naprawczych w mitochondriach. Dotyczy to przede wszystkim wydajnej naprawy oksydacyjnych i alkilacyjnych uszkodzeń mtDNA z udziałem systemu BER. Nadal kontrowersyjnym pozostaje udział systemu NER w naprawie mtDNA. Ostatnie doniesienia wskazują jednak na aktywność przynajmniej niektórych mechanizmów naprawczych związanych z naprawą rekombinacyjną w DNA mitochondrialnym. Kompleksy cisplatyna-DNA tworzące międzyniciowe wiązania krzyżowe naprawiane drogą naprawy rekombinacyjnej stwierdzono w mtDNA komórek chomika [55].

Białko MSH1 drożdży jest enzymem mitochondrialnym, homologiem bakteryjnego MutS (uczestniczącego w naprawie niedopasowanych zasad — MMR). W jednej z ostatnio opublikowanych prac [73] wykazano, że szczepy drożdży z mutacjami genu *msh1* charakteryzują destabilizacją naprawy genomu mitochondrialnego. Potwierdzałoby to wcześniejsze dane [74], że MSH1 odgrywa rolę w naprawie mtDNA. W mitochondriach komórek człowieka wykryto białko MYH, które jest również częścią systemu usuwającego błędnie sparowane zasady (patrz powyżej). W artykule przedstawiono możliwość usuwania oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad w wyniku współdziałania białek enzymatycznych biorących udział w naprawie typu BER i NER. Również błędnie sparowane zasady naprawiane są w wyniku połączenia pewnych elementów mechanizmów naprawy typu NER i MMR [68]. Wydaje się prawdopodobne, że w niedalekiej przyszłości można spodziewać się odkryć potwierdzających obecność białek uczestniczących w naprawie typu NER w mitochondriach.

Artykuł otrzymano 6 lipca 2000 r.

Zaakceptowano do druku 8 stycznia 2001 r.

- Wallace DC (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 1175-1212
- Wallace DC (1992) *Science* **256**: 628-632
- Jurgowiak M, Oliński R (1997) *Post Biochem* **43** (1): 30-40
- Polyak K, Li Y B, Zhu H, Lengauer C, Willson SD, Markowitz SD, Trush M A, Kinzler K W, Vogelstein B (1998) *Nat Genet* **20**: 291-293
- Wallace DC, Lott M T, Torroni A, Brown M D, Shoffner J S (1994) *Human gene mapping: A compendium*, Cuticchia A J, Pearson P L (red) Johns Hopkins University Press, Baltimore str. 813-845
- Richter C (1995) *Current Topics in Bioenergetics* **17**: 1-19
- Richter C, Park J W, Ames B N (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6465-6467
- Takasawa M, Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Ito T, Ozawa T (1993) *Exp Gerontol* **28**: 269-280
- Beckman K B, Ames B N (1996) *Methods Enzymol* **264**: 442-453
- Beckman K B, Ames B N (1999) *Mutat Res* **424**: 51-58
- Zastawny T H, Dąbrowska M, Jaskólski T, Klimarczyk M, Kuliński L, Koszela A, Szezęńiewicz M, Śliwińska M, Witkowski P, Oliński R (1998) *Free Rad Biol Med* **24** (5): 722-725
- Tudek B (1999) *Kosmos* **48** (4): 339-352
- Friedberg E C, Walker G C, Siede W (1995) *DNA repair and mutagenesis*. ASM PRESS Washington DC
- Friedberg E C (1996) *Annu Rev Biochem* **65**: 15-42
- Dianov G, Bischoff C, Piotrowski J, Bohr V A (1998) *J Biol Chem* **273**: 33811-33816
- Croteau D L, Rhys C M, Hudson E K, Dianov G, Hansford R G, Bohr V A (1997) *J Biol Chem* **272**: 27338-27344
- Anderson C T, Friedberg E C (1980) *Nucleic Acids Res* **8**: 875-888
- Domena J D, Mosbaugh D W (1985) *Biochemistry* **24**: 7320-7328
- Domena J D, Timmer R T, Dicharry S A, Mosbaugh D W (1988) *Biochemistry* **27**: 6742-6751
- Burgers P M, Klein M B (1986) *J Bacteriol* **166**: 905-913
- Nilsen H, Otterlei M, Haug T, Solum K, Nagelhus T A, Skorpene F, Krokan H E (1997) *Nucleic Acids Res* **21**: 2579-2584
- Otterlei M, Haug T, Nagelhus T A, Slupphaug G, Lindmo T, Krokan H E (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 4611-4617
- Slupphaug G, Markussen F H, Olsen L C, Aasland R, Aarsaether N, Bakke O, Krokan H E, Helland D E (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 2579-2584
- Krokan H E, Standal R, Slupphaug G (1997) *Biochem J* **325**: 1-16
- Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L (1995) *Nature* **373**: 487-493
- Oliński R, Jurgowiak M (1999) *Kosmos* **48**(3): 329-338
- Anson R M, Croteau D L, Stierum R H, Filburn C, Parsell R, Bohr V A (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 662-668
- Driggers W J, LeDoux S P, Wilson G L (1993) *J Biol Chem* **268**: 22042-22045
- Taffe B G, Larminat F, Laval J, Croteau D L, Anson R M, Bohr V A (1996) *Mutation Res* **364**: 183-192
- Boiteux S, Radicella J P (1999) *Biochimie* **81**: 59-67
- Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, Fujiwara T, Kang D, Sugimachi K, Nakabeppu Y (1999) *Mol Biol Cell* **10**: 1637-1652
- Croteau D L, Bohr V A (1997) *J Biol Chem* **272**: 25409-25412
- Prieto A M, Jurado J, Francastel E, Laval F (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 5199-5202
- Rosenquist T A, Zharkov D O, Grollman A P (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7429-7434
- Maki H, Sekiguchi M (1992) *Nature (London)* **355**: 273-275
- Hayakawa H, Taketomi A, Sakumi K, Kuwano M, Sekiguchi M (1995) *Biochemistry* **34**: 89-95

37. Kang D, Nishida J, Iyama A, Nakabeppu Y, Furuichi M, Fujiwara T, Sekiguchi M, Takeshige K (1995) *J Biol Chem* **270**: 14659-14665
38. Hazra TK, Izumi T, Maidt L, Floyd RA, Mitar S (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 5116-5122
39. Oliński R, Jurgowiak M (1999) *Post Biochem* **45**(1): 50-58
40. Takao M, Aburatani H, Kobayashi K, Yasui A (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 2917-2922
41. Anson RM, Hudson E, Bohr VA (2000) *FASEB J* **14**: 355-360
42. Hegler J, Bittner D, Boiteux S, Epe B (1993) *Carcinogenesis* **14**: 2309-2312
43. Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM (1998) *Mutation Res* **400**: 99-115
44. Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA (1999) *Mutation Res* **434**: 137-148
45. Cooper PK, Nospikel T, Clarkson SG, Leadon SA (1997) *Science* **275**: 990-993
46. Reardon JT, Bessho T, Kung HCH, Bolton PH, Sancar A (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9463-9468
47. Stierum RH, Croteau DL, Bohr VA (1999) *J Biol Chem* **274**: 7128-7136
48. Weiss B, Cunningham RP (1985) *J Bacteriol* **162**: 607-610
49. Eide L, Bjoras M, Pirovano M, Alseth K, Berdal G, Seeberg E (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10735-10740
50. Aspimwall RD, Rothwell DG, Roldan-Arjona T, Anselmino C, Ward CJ, Cheadle JP, Sampson RJ, Lindahl T, Harris PC, Hickson ID (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 109-114
51. Hilbert TP, Chaung W, Boorstein RJ, Cunningham RP, Teeborg GW (1997) *J Biol Chem* **272**: 6733-6740
52. Alseth I, Eide L, Pirovano M, Rognes T, Seeberg E, Bjoras M (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 3779-3787
53. Augeri L, Lee Y M, Barton A B, Doetsch P W (1997) *Biochemistry* **36**: 721-729
54. Senturker S, Auffret van der Kemp P, You H J, Doetsch P W, Dizdaroglu M, Boiteux S (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 5270-5276
55. LeDoux S P, Wilson G L, Beecham E J, Stevnsner T, Wassermann K, Bohr V A (1992) *Carcinogenesis* **13**: 1967-1973
56. Pietrzykowska I, Krwawicz J (1999) *Kosmos* **48**(4): 315-328
57. Doetsch P W, Cunningham R P (1990) *Mutation Res* **236**: 173-201
58. Tomkinson A E, Bonk R T, Linn S (1988) *J Biol Chem* **263**: 12532-12537
59. Pinz K G, Bogenhagen D F (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 1257-1265
60. Polaczek P (1999) *Kosmos* **48**(3): 353-358
61. Ames B N, Shigenaga M K, Hagen T M (1995) *Biochim Biophys Acta* **1271**: 165-170
62. Harman D (1972) *J Amer Geriatr Soc* **20**: 145-147
63. Brown W M, George M J R, Wilson A C (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1967-1971
64. Souza-Pinto N, Croteau D L, Hudson E K, Hansford R G, Bohr V A (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 1935-1942
65. Mecocci P, Mac Garvey U, Kaufman A E, Koontz D, Shoffner J M, Wallace D C, Beal M F (1993) *Ann Neurol* **34**: 609-616
66. Luft R (1995) *Biochim Biophys Acta* **1271**: 1-6
67. Polyak K, Li Y B, Zhu H, Lengauer C, Willson J K V, Markowitz S D, Trush M A, Kinzler K W, Vogelstein B (1998) *Nat Genet* **20**: 291-293
68. Sancar A (1999) *Nat Genet* **21**: 247-249
69. Gąziewicz M A, Zastawny T H, Oliński R, Spina E, Siedlecki J, Tudek B (2000) *Free Rad Biol Med* **28**(1): 75-83
70. Hanawalt P C (2000) *Nature* **405**: 415-416
71. Le Page F, Kwok E E, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon S A, Sarasin A, Cooper P K (2000) *Cell* **101**: 159-171
72. Bohr V A, Anson R M (1999) *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **31**(4): 391-398
73. Sia E A, Butler Ch A, Dominska M, Greenwell P, Fox T D, Petes T D (2000) *PNAS* **97**(1): 2550-2555
74. Chi N W, Kolodner R D (1994) *J Biol Chem* **269**: 29984-29992

Rola ligazy ubikwitynowo-białkowej Rsp5p w endocytozie białek błony komórkowej u drożdży

Role of Rsp5p ubiquitin-protein ligase in endocytosis of plasma membrane proteins in yeast

TERESA ŻOŁĄDEK¹, JOANNA KAMIŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rodzina ligaz ubikwitynowo-białkowych Nedd4/Rsp5p
- III. Proces endocytozy u drożdży
- IV. Regulacja białek błony komórkowej zależna od Rsp5p
- V. Sekwencje sygnałowe niezbędne do ubikwytynacji białek błony komórkowej
- VI. Typ modyfikacji ubikwityną białek błony komórkowej
- VII. Ubikwityna jako sygnał do internalizacji
- VIII. Aparat białkowy biorący udział w internalizacji ubikwytynowanych białek: wpływ Rsp5p
- IX. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases
- III. Endocytosis pathway in yeast
- IV. Rsp5p-dependent regulation of plasma membrane proteins
- V. Signal sequences for ubiquitination of plasma membrane proteins
- VI. Type of ubiquitination of plasma membrane proteins
- VII. Ubiquitin as an internalization signal
- VIII. Machinery involved in internalization of ubiquitinated proteins: a role of Rsp5p
- IX. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Φ — aminokwas hydrofobowy; aa — aminokwasy; ABC — ang. *ATP Binding Cassette*; APC — ang. *Anaphase Promoting Complex*; C2 — ang. *protein kinase C homology 2*; D — kwas asparaginowy; D-box — ang. *destabilizing box*; ER — retikulum endoplazmatyczne; F — fenyloalania; G — glicyna; Hect — ang. *Homologous to E6-AP C-terminus*; I — izoleucyna; K — lizyna; L — leucyna; M — metionina; MFS — ang. *Multi Facilitators Superfamily*; motyw PY — sekwencja xPPxY; N — asparagina; P — prolina; PKC — kinaza białkowa C; S — seryna; SCF — Skp1, Cullin, F-box; T — treonina; VBC — ang. *The von Hippel-Lindau (VHL), elongin B, elongin C*; WW — domena zawierająca dwie reszty tryptofanowe; X — dowolny aminokwas; Y — tyrozyna.

I. Wstęp

Ubikwytynacja to proces posttranslacyjnej modyfikacji, w którym 76-aminokwasowy polipeptyd zwany ubikwityną jest przyłączany do białek [1]. Opis tego procesu był również przedmiotem arty-

kułów w Postęпах Biochemii [2, 3]. W procesie ubikwytynacji bierze udział kilka enzymów tj.: E1, E2, E3. Enzym aktywujący (E1) aktywuje ubikwitynę w sposób zależny od ATP przez utworzenie wiązania tioestrowego pomiędzy cysteiną w centrum aktywnym enzymu a C-końcem ubikwityny. Ubikwityna jest następnie przenoszona na cysteinę w centrum aktywnym enzymu koniugującego (E2), a niekiedy także na cysteinę w centrum aktywnym ligazy ubikwitynowej (E3). W reakcji ubikwytynacji substratu białkowego, katalizowanej przez enzym E2 przy pomocy enzymu E3, lub bezpośrednio przez E3, wytworzone zostaje wiązanie izopeptydowe między C-terminalną glicyną ubikwityny i grupą ϵ -aminową lizyny w ubikwytynowanym białku. Możliwe jest również powstanie łańcucha poliubikwitynowego będące rezultatem przyłączenia kolejnej ubikwityny do lizyny 48 lub innych lizyn w rosnącym łańcuchu. Enzymy E3 mają ważne zadanie rozpoznania białka podlegającego ubikwytynacji. Najlepiej poznane klasy enzymów E3 to kompleksy zawierające białka z domeną RING-*finger* takie jak: APC, SCF, VBC [4], rodzina białek c-Cbl [5] oraz grupa białek zawierających domenę Hect (ang. *Homologous to E6-AP*

¹Doc. dr hab., ²mgr, Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, e-mail: teresa@ibb.waw.pl; kaminska@ibb.waw.pl

carboxy terminal) [6]. Wśród białek E3 z domeną Hect wyróżnia się rodzinę ligaz ubikwitynowo-białkowych Nedd4/Rsp5p, do której należy Rsp5p, znane także jako Np1p i Mdp1p [7]. W proces poliubikwitynacji niektórych białek, które mają przyłączone już trzy reszty ubikwityny, zaangażowany jest enzym E4 [8]. Poliubikwitynacja wielu białek cytosolowych oraz białek retikulum endoplazmatycznego (ER) prowadzi do ich degradacji przez proteasom 26S. Proteasom jest to wielopodjednostkowy kompleks proteazowy, składający się z rdzenia 20S i dwóch kompleksów regulatorowych 19S [9]. Degraduje on cykliny, czynniki transkrypcyjne, białka szlaków przekazywania sygnału (ang. *signal transduction*), enzymy szlaków metabolicznych, które wymagają ścisłej regulacji ilości w komórce [1]. Nieprawidłowo zwinięte lub zmutowane białka ER są degradowane przez proteasom po przetransportowaniu ich do cytosolu [10]. W uwalnianiu ubikwityny z degradowanych białek oraz w procesie biosyntezy i dojrzewania ubikwityny biorą udział enzymy deubikwitynujące (Ubp i Uch).

W ostatnich latach stało się jasne, że również liczne białka transmembranowe błony komórkowej są ubikwitynowane, a modyfikacja ta odgrywa zasadniczą rolę w ich endocytozie i degradacji w wakuoli (drożdżowy odpowiednik lizosomu w komórce zwierzęcej) [11, 12]. Stan wiedzy o roli ubikwitynacji w endocytozie oraz regulacji tego procesu przez ligazę ubikwitynowo-białkową Rsp5p jest przedstawiony poniżej.

II. Rodzina ligaz ubikwitynowo-białkowych Nedd4/Rsp5p

Rodzina Nedd4/Rsp5p należy do grupy enzymów E3 z domeną Hect. Białka tej rodziny, jako jedyne enzymy z grupy E3, tworzą tioester z ubikwityną i bezpośrednio katalizują ubikwitynację substratu. Wszystkie białka należące do rodziny Nedd4/Rsp5p zawierają: domenę C2, dwie do czterech domen WW oraz C-terminalną domenę Hect [7] (Ryc. 1).

Domena C2, pierwotnie zidentyfikowana w kinazie białkowej C (PKC), składa się z około 130 aminokwasów. Tworzą ją dwie antyrównoległe harmonijki β , z których każda złożona jest z czterech nici. Cztery reszty kwasu asparaginowego obecne w tej domenie tworzą wiązanie koordynacyjne z Ca^{2+} [13]. Wykazano, że domena ta jest zdolna do wiązania fosfolipidów i błon w sposób zależny od jonów Ca^{2+} w takich białkach jak: synaptotagmina, fosfolipaza C, rasGAP [13], co wskazuje, że odgrywa rolę w wiązaniu białka z błoną i ma znaczenie dla jego lokalizacji.

Niektóre domeny C2 mają zdolność wiązania specyficznych białek w sposób zależny od jonów Ca^{2+} . Na przykład druga domena C2 synaptotagminy I oddziałuje z podjednostką kompleksu AP2 związanego z klatryną [13].

Domena WW (nazwana tak od dwóch reszt tryptofanowych występujących w każdej domenie) składa się z około 40 aminokwasów, przyjmuje strukturę trzyniciowej harmonijki β i odpowiada za wiązanie białka z innymi białkami [14]. Domena ta została znaleziona, między innymi, w białkach szlaków przekazywania sygnału i wiąże sekwencje bogate w prolinę. Dotychczas opisano cztery typy sekwencji wiążących domeny WW: motyw PY (xPPxY) (x – dowolny aminokwas) [15], motyw PPLP [16], motyw PGM (bogaty w glicynę i metioninę) [17] oraz specyficzne motywy zawierające fosforylowaną serynę i treoninę [18]. Rsp5p ma trzy domeny WW, preferencyjnie wiążące sekwencję xPPxY [19]. U różnych członków rodziny Nedd4/Rsp5p liczba domen WW wynosi od dwóch do czterech, co wskazuje, że enzym ten może równocześnie wchodzić w kompleksy z różnymi białkami.

Domena Hect zlokalizowana na C-końcu białek z rodziny Nedd4/Rsp5p ma długość 350 aminokwasów i jest odpowiedzialna za aktywność enzymatyczną tej grupy ligaz ubikwitynowo-białkowych. Została pierwotnie zidentyfikowana w E6-AP, białku biorącym udział w ubikwitynacji p53 [6]. Domena Hect ma niezbędną do pełnienia funkcji cysteinę, która tworzy wiązanie tioestrowe z ubikwityną, po jej przeniesieniu z E2 [6], a następnie przenosi ją na grupę ϵ -lizyny w białku substratowym lub w ubikwitynie na końcu łańcucha poliubikwitynowego [20]. Enzymy E2, które przenoszą ubikwitynę na domenę Hect Rsp5p to Ubc4p i Ubc5p [21]. Struktura domeny Hect E6-AP w kompleksie z UbcH7, ludzkim homologiem Ubc4/5, została ostatnio poznana [20]. Składa się ona z dwóch płatów (N i C), pomiędzy którymi jest katalityczne zagłębienie z niezbędną cysteiną. Płat N wiąże E2. Mechanizm przeniesienia ubikwityny z E2 na domenę Hect nie jest na razie znany.

Najlepiej zbadaną funkcją białka Rsp5p, omówioną w tej pracy, jest regulowanie przez ubikwitynację stabilności licznych białek transbłonowych błony komórkowej. Modyfikacja ta prowadzi do ich endocytozy a następnie degradacji w wakuoli. Inne funkcje białka Rsp5p są przedstawione tylko skrótowo.

Jednym z białek wiążących się z Rsp5p jest największa podjednostka RNA polimerazy II (Rpb1p). Wzajemne oddziaływanie jest stymulowane przez

uszkodzenia DNA i wymaga udziału domen WW2 i WW3 Rsp5p oraz C-końca Rpb1p, który ma liczne motywy YSPTSPS [22]. Prowadzi to do ubikwitynacji i degradacji Rpb1p przez proteasom [23]. Rsp5p jest zaangażowane również w degradację białka wiążącego jednoniciowe DNA, Rfa1p [24], mitochondrialno-cytoplazmatyczną dystrybucję białek [25] oraz dziedziczenie mitochondriów [26]. Mechanizm wpływu Rsp5p na ten ostatni proces nie jest znany. Być może współuczestniczy w nim białko Bul1p, które wiąże Rsp5p i stymuluje jego aktywność [26, 27]. Oba te białka warunkują również wrażliwość komórek drożdży na anestetyki wziewne [28]. Rsp5p wpływa też na aktywację H⁺-ATPazy Pma1p przez glukozę [29]. Proces aktywacji nie jest do końca poznany, lecz wiadomo, że Pma1p nie jest ubikwitynowana, ani nie zmienia się jej stabilność. Równocześnie mutacja *pma1-t*, prowadząca do podstawienia aminokwasowego w domenę wiążącej ATP Pma1p, przywraca zdolność mutantów *rsp5* do wzrostu w temperaturze 37°C [30]. Najnowsze wyniki wskazują, że Rsp5p jest niezbędne do aktywacji aktywatora transkrypcji Spt23p, a przez to wpływa na poziom enzymu Ole1p i poziom nienasyconych kwasów tłuszczowych w komórce [31]. Homolog Rsp5p w *Schizosaccharomyces pombe* Pub1, nie tylko reguluje stabilność permeaz błonowych, podobnie jak Rsp5p (patrz poniżej), lecz również wpływa na stabilność fosfatazy tyrozynowej cdc25, jednego z białek regulujących cykl komórkowy [32].

III. Proces endocytozy u drożdży

Proces endocytozy u drożdży jest złożony, wieloetapowy i zbliżony do endocytozy zachodzącej u ssaków. Polega na internalizacji fragmentów błony komórkowej, wraz z białkami transbłonowymi, oraz związków rozpuszczalnych w wodzie, a następnie na ich transporcie przez wczesne i późne endosomy do wakuoli. Białka błony komórkowej (receptory, transportery, kanały jonowe) podlegają selekcji i przeniesieniu do obszaru tworzącego się pęcherzyka endocytarnego, zaś związki rozpuszczalne w wodzie pobierane są w sposób nieselektywny. Powstający pęcherzyk jest otoczony białkami płaszcza rekrutowanymi z cytosolu, ulega oderwaniu od błony komórkowej i przemieszczeniu do wnętrza komórki. Tam białka płaszcza oddysocjują od błony pęcherzyka. W dalszych etapach białka błonowe i substancje płynne są transportowane poprzez wczesny i późny endosom do wakuoli, gdzie białko ulega degradacji. W endosomach zachodzi sortowanie białek, część z nich może wrócić na powierzchnię komórki. Endo-

cytoza zachodzi z udziałem pęcherzyków pokrytych klatryną oraz drogą niezależną od klatryny. Klatrynowy koszyk jest przyłączany do błony komórkowej przez kompleks białek adaptorowych AP2, złożony z czterech podjednostek niezależnie wiążących klatrynę, błonę plazmatyczną lub białko substratowe. Internalizacja pęcherzyków endocytarnych zachodzi z udziałem cytoskieletu aktynowego oraz licznych białek wpływających na jego prawidłowe funkcjonowanie (patrz poniżej) [11, 12, 33].

IV. Regulacja białek błony komórkowej zależna od Rsp5p

Badania endocytozy u drożdży prowadzono z zastosowaniem dwóch typów białek błony komórkowej jako białek modelowych. Do jednej grupy należą dwa receptory feromonów drożdżowych, sprzężone z białkiem G. Są to: Ste2p, receptor czynnika α , i Ste3p receptor czynnika α . Zawierają one N-koniec skierowany na zewnątrz komórki, siedem domen transbłonowych i cytoplazmatyczny C-koniec. Oba receptory podlegają konstytutywnej endocytozie i endocytozie indukowanej związaniem liganda. Związanie feromonów przez receptor inicjuje szlak przekazywania sygnału, prowadząc do zmian, niezbędnych do krzyżowania się komórek [34]. Do drugiej grupy należą dwa transportery z rodziny ABC (ang. *ATP Binding Cassette*) i liczne transportery z rodziny MFS (ang. *Multi Facilitators Superfamily*). Białka te mają 10-12 hydrofobowych segmentów transbłonowych otoczonych domenami hydrofilowym, przypuszczalnie skierowanymi w stronę cytoplazmy [35]. Transportery te odgrywają ważną rolę w regulacji tempa wzrostu komórki. Większość z nich podlega konstytutywnej endocytozie i endocytozie indukowanej takimi czynnikami jak nadmiar substratu, obfitość składników pokarmowych czy stres. Ta ścisła regulacja obecności transporterów w błonie komórkowej jest niezbędna do adaptacji komórki drożdżowej do szybko zmieniających się warunków zewnętrznych [36].

Pierwszą wskazówką wpływu ubikwitynacji na endocytozę białek były wyniki badań nad Ste6p, transporterem z rodziny ABC, biorącym udział w wydzielaniu drożdżowego czynnika α . Stwierdzono akumulację ubikwitynowanych form tego transportera w błonie komórkowej mutantów zaburzonych w procesie endocytozy. Ste6p było stabilniejsze w mutantach pozbawionych enzymów koniugujących Ubc4p i Ubc5p (E2), co wskazywało na rolę ubikwitynacji w regulacji stabilności tego białka [37].

Dalszych informacji dostarczyły badania genetyczne, analiza mutantów niezdolnych do katabolicznej inaktywacji transporterów cukrów i aminokwasów. Zaobserwowano, że w mutantach *npi1* po dodaniu amoniaku do hodowli zaburzona jest internalizacja i degradacja permeazy aminokwasowej, Gap1p [38]. Te same mutanty wykazywały również defekt w zależnej od czynników stresowych internalizacji i wakuolarniej degradacji innego transportera, permeazy uracylowej Fur4p. Klonowanie genu *NP11*, który jest niezbędny do życia komórki, wykazało, że koduje on ligazę ubikwitynowo-białkową Rsp5p [38]. Wykazano również, że Gap1p i Fur4p podlegają zależnej od Rsp5p, zachodzącej w błonie komórkowej ubikwitynacji, niezbędnej do internalizacji [39, 40]. *In vivo* ubikwitynacja Gap1p wymaga udziału cysteiny w domenie Hect Rsp5p [41], tworzącej wiązanie tioestrowe z ubikwityną [42].

Podobne wyniki otrzymane dla innych białek błony komórkowej potwierdziły, że ubikwitynacja działa jako sygnał do internalizacji białek. Defekt *RSP5* lub *UBC1/4/5* powodował zaburzenia ubikwitynacji i endocytozy receptorów Ste2p i Ste3p, transporterów cukrów: Mal11p, Mal61p, Hxt6p i Hxt7p, permeazy tryptofanu Tat2p i transportera cynku Zrt1p [43; 44-49]. Również mutacje punktowe lub delecja izopeptydazy ubikwityny, Ubp4p/Doa4p, powodowały zaburzenie ubikwitynacji i internalizacji niektórych z tych białek [43, 46, 47, 50-52]. Wcześniej mutanty *ubp4/doa4* były wyizolowane jako mutanty *npi2*, wykazujące zaburzenia w indukowanej amoniakiem regulacji permeazy Gap1p. Badania sekwencji koniecznych do ubikwitynacji Ste2p i Ste6p wykazały, że zachowują się one jak autonomiczne sygnały do ubikwitynacji [53, 54].

Ponieważ ubikwitynowane białka zwykle podlegają degradacji w proteasomie, stało się niezbędne określenie systemu proteolitycznego zaangażowanego w degradację ubikwitynowanych białek błony komórkowej. Dla większości białek wymienionych powyżej było to zbadane podobną metodą eksperymentalną. Receptor Ste2p, ABC transporter Pdr5p oraz transportery Gal2p, Fur4p, Htx6p, Htx7p i Mal11p wykazywały normalną konstytutywną i indukowaną degradację w szczepach ze zmutowaną podjednostką katalityczną lub regulatorową proteasomu (odpowiednio *pre1 pre2*, *yta5*, *cim3*, *cim5*) [39, 45, 46, 55-57] a degradacja była silnie zahamowana w mutantach z zaburzoną aktywnością proteaz wakuolarnych (*pep4*, *pep4 prb1*, *pra1 pra2*) [37, 39, 40, 43, 45, 46, 55-58]. Wydaje się więc jasne, że drożdżowe białka błony komórkowej podlegają ubikwitynacji w błonie, co powoduje ich wejście na drogę endocytozy

i degradację w wakuoli [11]. Za modyfikację wielu z tych białek jest odpowiedzialna ligaza ubikwitynowo-białkowa Rsp5p. Taką samą rolę białka z rodziny Nedd4/Rsp5p pełnią również w innych gatunkach drożdży. Ostatnio wykazano, że Pub1, jeden z homologów Rsp5p w *Schizosaccharomyces pombe*, [7] jest konieczny do indukowanej amoniakiem regulacji permeaz aminokwasowych [59] oraz innych transporterów [60]. Pomimo, że Rsp5p jest niezbędne *in vivo* do ubikwitynacji wielu białek błonowych, dotychczas nie wykazano bezpośredniej interakcji Rsp5p z żadnym z nich, ani nie potwierdzono ich ubikwitynacji w warunkach *in vitro*.

V. Sekwencje sygnałowe niezbędne do ubikwitynacji białek błony komórkowej

Klasyczne sygnały do endocytozy zidentyfikowane w białkach błony komórkowej ssaków takie jak: YxxΦ (Φ, aminokwas hydrofobowy np. leucyna), NPxY, LL, wiążą podjednostki kompleksu adaptorowego AP2 oddziałującego z klatryną [61]. W niektórych przypadkach podobne sygnały zidentyfikowano u drożdży (Tabela 1). Jeden z nich to sekwencja NPFTD, która jest niezbędna do zależnej od klatryny endocytozy receptora Ste3p [62]. Drugi przykład to motyw LL konieczny do endocytozy permeazy Gap1p [63]. W żadnym z tych przypadków nie znane jest białko, które oddziałuje z danym motywem. W pozostałych przypadkach zidentyfikowano motywy warunkujące ubikwitynację. Dla endocytozy receptora Ste2p z C-terminalną delecją istotna jest sekwencja SINNDAK₃₃₇SS [64], a szczególnie lizyna 337. Dalsze badania nad Ste2p wyjaśniły, że podlega on podstawowej, konstytutywnej fosforylacji seryn obecnych w sekwencji SINNDAKSS. Wiązanie czynnika α indukuje zmianę konformacyjną, prowadzącą do hyperfosforylacji seryn i treoniny w pobliżu tej sekwencji [11]. Fosforylacja wymaga obecności aktywnej kinazy kazeinowej I, Yck1p lub Yck2p. Stymulowana związaniem liganda hyperfosforylacja Ste2p poprzedza regulowaną ubikwitynację lizyny 337 [45, 52, 64].

Podobny do sekwencji SINNDAKSS, motyw DAKTI, nazwany D-box (ang. *destabilizing box*) zidentyfikowano w Ste6p. Występuje on w 117-aminokwasowym łączniku pomiędzy dwiema homologicznymi domenami tego transportera ABC i warunkuje jego konstytutywną endocytozę. Jednakże tylko sekwencja dłuższa, 52-aminokwasowa, bogata w kwasowe łańcuchy boczne aminokwasów, zawierająca DAKTI, przyłączona do H⁺-ATPazy Pma1p powoduje jej ubikwitynację i destabilizację [53].

Znaczenie regionów o charakterze kwasowym, zwanych PEST, stanowiących sygnał do ubikwitynacji, zostało wykazane między innymi dla Ste3p [54]. Sekwencje PEST (bogate w prolinę, glutaminę, sery-

wrotny [68]. Wskazuje to, że seryny w sekwencji PEST są fosforylowane przed ubikwitynacją. Fosforylacja, a w konsekwencji ubikwitynacja tego regionu jest tylko częściowo zależna od kinaz Yck1p/Yc-

Tabela 1

Motywy warunkujące ubikwitynację białek błony komórkowej

| białko | Sekwencja sygnałowa | piśmiennictwo |
|--------|--|---------------|
| Ste2p | SINNDKSS, C-koniec zawiera docelową lizynę | [64] |
| Ste3p | sekwencja PEST (58 aa), C-koniec zawiera docelowe lizyny | [54] |
| Ste6p | kwasowy D-box (52 aa) z sekwencją DAKTI, wewnętrzna sekwencja łącznikowa | [53] |
| Fur4p | sekwencja PEST (20 aa), N-koniec poprzedzona przez dwie docelowe lizyny | [68; 69] |
| Tat2p | 31 aa, N-koniec zawiera docelowe lizyny | [43] |
| Zrt1p | docelowa lizyna K195, wewnętrzna pętla | [44] |

nę i treoninę) okazały się uprzednio istotne dla ubikwitynacji regulatorowych, krótkotrwałych białek cytosolowych [1]. C-końcowa sekwencja Ste3p zawiera dwa oddzielne regiony odpowiedzialne za konstytutywną i regulowaną feromonem endocytozę. Sygnał NPFTD, opisany powyżej, niezbędny do endocytozy indukowanej czynnikiem a, działa niezależnie od ubikwitynacji [62]. Region zawierający sekwencję PEST jest konieczny do konstytutywnej endocytozy i jest wystarczający oraz niezbędny do ubikwitynacji [54]. Zmutowana, krótsza forma receptora Ste3p podlega zależnej od kinaz Yck1p/Yck2p fosforylacji w regionie PEST. Modyfikacja ta poprzedza ubikwitynację [65] trzech lizyn w tym regionie [66].

Innym przykładem wskazującym na istotność regionu PEST w procesie ubikwitynacji i endocytozie białka błony komórkowej jest permeaza uracylowa, Fur4p. Podlega ona konstytutywnej endocytozie w komórkach rosnących, a w obecności nadmiaru substratu [67] lub w warunkach stresu [39, 58] proces ten jest przyspieszony. Region PEST (~20aa) w Fur4p znajduje się w cytosolowym N-końcu i jest niezbędny tak dla konstytutywnej jak i indukowanej endocytozy. Zamiana pięciu seryn na alaniny w tej sekwencji, upośledza fosforylację i ubikwitynację, co stabilizuje Fur4p w błonie komórkowej. Podstawienie reszt kwasu glutaminowego, które są podobne do fosforylowanych seryn, powoduje zaś efekt od-

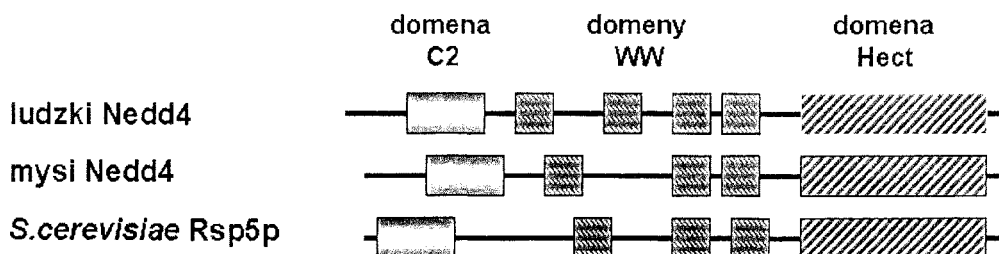
k2p [69]. Dwie lizyny podlegające ubikwitynacji w Fur4p [50] są położone blisko sekwencji PEST [69].

Większość sekwencji sygnałowych warunkujących endocytozę w białkach błony komórkowej jest również sygnałem do ubikwitynacji tych białek. Wyjątkiem jest sekwencja NPFTD w Ste3p [62] i C-końcowy motyw LL w Gap1p. Mutacje motywu LL w Gap1p zaburzają endocytozę, ale nie ubikwitynację permeazy, wskazując na udział tego motywu w procesie endocytozy już po zajściu ubikwitynacji [40, 63]. Zidentyfikowane sygnały do ubikwitynacji są sekwencjami raczej długimi, o odczynie kwaśnym, z sąsiadującymi lizynami podlegającymi ubikwitynacji. Sekwencje te nie zawierają motywów bogatych w prolinę, które mogłyby bezpośrednio wiązać się z domenami WW Rsp5p. Elementem wspólnym w procesie endocytozy Ste2p, Fur4p i Ste3p jest potencjalny wpływ fosforylacji na zajście ubikwitynacji [64, 65, 68]. Istnienie sygnału zależnego od fosforylacji wydaje się uzasadnioną hipotezą, gdyż ubikwitynacja tak jak i endocytoza białek błonowych jest często regulowana przez ligandy, substraty i dostępność substancji pokarmowych. W przypadku Ste2p udowodniono, że ligand indukuje hyperfosforylację receptora, a to zapoczątkowuje jego ubikwitynację. Możliwe jest, że białka te poprzez fosforylowane seryny oddziałują z domenami WW Rsp5p. Byłoby to zgodne z ostatnim raportem donoszącym, że domeny WW Nedd4 wiążą peptydy

zawierające fosfoserynę [18]. Ewentualnie mogą istnieć inne, jeszcze nieznanne motywy wiążące domeny WW. Jest też możliwe, że białka błonowe oddziałują pośrednio z Rsp5p, z udziałem białek adaptorowych. Niezależnie od sposobu wiązania, pokazano, że mutacje konserwowanych reszt aminokwasowych w domenach WW2 i WW3 Rsp5p, uczestniczących w wiązaniu motywów PY [14, 70], hamują internalizację i degradację Fur4p [71]. Udział domeny Hect w rozpoznaniu miejsc ubikwytynacji nie jest jasny, zaś

nacji transporterów (Fur4p, Gap1p, Zrt1p) [44, 50, 51] ujawniła, że ubikwytynowana jest jedna do trzech lizyn, każda jedną, dwoma lub trzema cząsteczkami ubikwytyny. Znaczy to, że liczba przyłączanych ubikwytyn jest za mała, aby łańcuch był rozpoznany przez proteasom.

Typ wiązania pomiędzy ubikwytynami w łańcuchu określono dla transporterów Fur4p i Gap1p w mutantach *ubp4/doa4* defektywnych w aktywności izopeptydazy ubikwytynowej. Mutanty te mają zreduko-



Ryc. 1. Struktura domenowa niektórych białek z rodziny Nedd4/Rsp5p.

domena C2 wydaje się nie być zaangażowana w ten proces [41].

VI. Typ modyfikacji ubikwytyną białek błony komórkowej

Obserwacja, że większość białek błony komórkowej jest degradowana w wakuoli a nie jest rozpoznawana przez proteasom zrodziła podejrzenie, że w tym przypadku ma miejsce innego typu modyfikacja ubikwytyną. Rozpoznanie ubikwytynowanych białek przez proteasom wymaga obecności łańcucha poliubikwytyny o długości co najmniej czterech jednostek połączonych przez lizynę 48 (K48) ubikwytyny [72]. Jednakże w komórkach drożdży obserwowano również, *in vivo* i *in vitro*, powstawanie łańcuchów poliubikwytyny przez lizyny 29 i 63 [73].

Ste6p, Gal2p, i Tat2p są ubikwytynowane wieloma cząsteczkami ubikwytyny [37, 43, 53, 56] jednak nie jest jasne, czy są to modyfikacje łańcuchami poliubikwytynowymi, czy też ubikwytynacja wielu lizyn pojedynczymi ubikwytynami. Dla Ste2p wykazano powstawanie mono- i triubikwytynowych pochodnych form receptora [45], chociaż monoubikwytynacja zmutowanej formy receptora jest wystarczająca do internalizacji. Dane wskazują, że receptor ten podlega monoubikwytynacji z udziałem kilku lizyn, z których dwie są najczęstszym miejscem ubikwytynacji [52]. Mapowanie miejsc ubikwytynacji w Ste3p wykazało, że do trzech lizyn przyłączane są łańcuchy mono-, di- i triubikwytynowe [66]. Analiza ubikwytyn-

waną ilość wolnej ubikwytyny [51] co zaburza endocytozę wielu białek. Nadekspresja genów ubikwytyny przywraca ich ubikwytynację i internalizację [50-52]. Nadekspresja zmutowanych genów ubikwytyny, które uniemożliwiają tworzenie wiązań przez lizyny 29, 48 lub 63, w mutantach *ubp4/doa4* pozwoliła na analizę wzoru ubikwytynacji. Stwierdzono, że transportery Fur4p i Gap1p mają po dwie lizyny, które mogą przyłączać jedną lub dwie (trzy w przypadku Gap1p) cząsteczki ubikwytyny połączone między sobą wiązaniem z przez lizynę 63 [50, 51]. Monoubikwytynacja dwóch lizyn wystarcza do zajęcia endocytozy na podstawowym poziomie, a ubikwytynacja dalszych lizyn zwiększa jej wydajność.

Białko z przyłączonymi krótkimi łańcuchami ubikwytynowymi przez lizynę 63 ubikwytyny nie jest substratem dla proteasomu. Powstało pytanie co warunkuje taką poliubikwytynację i czy oprócz Rsp5p udział biorą jeszcze inne białka np. E4, podobne do tych biorących udział w tworzeniu łańcuchów przez lizynę 29 [8]. Na udział Rsp5p w powstawaniu wiązań przez lizynę 63 wskazuje obserwacja, że defekt w dziedziczeniu mitochondriów niektórych mutantów *rsp5* jest odwracany przez nadekspresję genu kodującego ubikwytynę, a warunkiem jest obecność niezmutowanego kodonu dla lizyny 63 cząsteczki ubikwytyny [26]. Trudno pogodzić te obserwacje z danymi o udziale Rsp5p w ubikwytynacji podjednostki polimerazy II RNA-Rbp1p, która prowadzi do degradacji tej podjednostki przez proteasom [22]. Wymaga to bowiem obecności łańcuchów ubikwytyno-

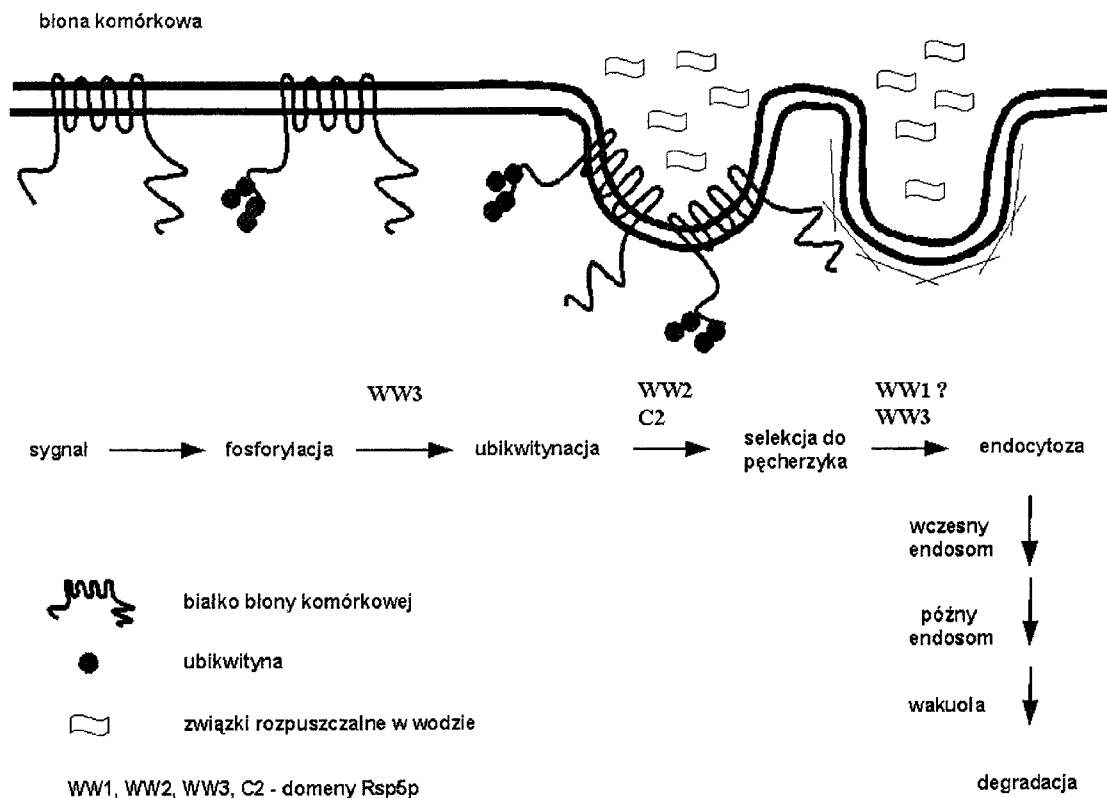
wych powstałych przez wiązanie cząsteczek ubikwityny przez lizynę 48. Możliwe jest, że enzymatyczne właściwości Rsp5p są modyfikowane przez białka adaptorowe lub zależą od białka substratowego.

VII. Ubikwityna jako sygnał do internalizacji

Zaproponowano kilka hipotez tłumaczących w jaki sposób ubikwityna ułatwia internalizację białek błony komórkowej. Sugerowano, że ubikwityna promuje dimeryzację receptorów, powoduje odsłonięcie sygnału do internalizacji lub też indukuje ruch białka do subdomen błony wykazujących aktywną endocytozę [74]. Możliwe jest również, że ubikwityna sama stanowi sygnał i wiąże się do jednego z białek kompleksu warunkującego endocytozę [45, 74]. Najnowsze wyniki badania receptorów Ste2p i Ste3p po

jednej cząsteczki ubikwityny jest wystarczającym sygnałem. Wyniki te sugerują, że ubikwityna nie odsłania ukrytego sygnału do endocytozy lecz raczej sama stanowi ten sygnał. Potwierdza to również obserwacja, że fuzja ubikwityny ze stabilną H^+ -ATPazą Pma1p stymuluje jej endocytozę [75].

Wymiana poszczególnych aminokwasów powierzchniowych ubikwityny na alaninę wykazała, że jej struktura trzeciorzędowa jest ważna dla promowania internalizacji Ste2p, a szczególną rolę odgrywają dwie powierzchnie hydrofobowe [75]. Wydaje się więc, że może istnieć receptor specyficzny dla ubikwityny, który odgrywałby rolę w internalizacji białek. Receptor ten powinien też rozpoznawać łańcuchy ubikwityny połączone wiązaniem przez lizynę 63 i powinien być odizolowany od pochodnych ubikwitynowych białek, biorących udział w innych



Ryc. 2. Hipotetyczny udział domcn WW i C2 ligazy ubikwitynowo-białkowej Rsp5p w endocytozie białek błony komórkowej.

twierdzącą tę ostatnią hipotezę. Fuzja ubikwityny ze Ste2p pozbawionym C-końcowych miejsc ubikwitynacji przywracała jego zdolność do internalizacji po przyłączeniu czynnika α [75]. Podobnie białko Ste3p pozbawione regionu PEST po fuzji z ubikwityną podlega endocytozie i degradacji w wakuoli [66]. Ubikwityna pozbawiona lizyn była tak samo aktywna jak zwykła ubikwityna w promowaniu endocytozy w fuzji ze Ste2p. Wskazuje to, że przyłączenie

procesach komórkowych, dla których wykazano obecność łańcuchów tego samego typu [26].

VIII. Aparat białkowy biorący udział w internalizacji ubikwitynowanych białek: wpływ Rsp5p

Dane genetyczne uzyskane z doświadczeń na drożdżach pozwoliły na zrozumienie podstawowych

mechanizmów endocytozy, wykazały udział aktywny i licznych białek z nią związanych oraz udział lipidów w tym procesie [33, 76]. Jednak mechanizmy molekularne rządzące internalizacją ubikwitynowanych białek pozostają nieznane. Odmienne niż u ssaków, gdzie udział klatryny w endocytozie jest udowodniony, nie jest jasna rola tego białka w endocytozie u drożdży. Delecja genu kodującego łańcuch ciężki klatryny (*CHC1*) lub mutacja w tym genie (*chc1-ts*) powoduje tylko 50% inhibicji internalizacji Ste2p i Ste3p [33] oraz transportera maltozy [77]. Endocytoza transportera Fur4p jest niezmienną w mutancie *chc1-ts* [78]. Delecje genów kodujących podjednostki kompleksu adaptorowego AP2 nie powodują defektu endocytozy [79]. Wskazuje to na obecność drugiej drogi endocytozy, niezależnej od klatryny.

Istnieją jednak pewne podobieństwa endocytozy u ssaków i drożdży. Drożdżowy homolog ssaczego Eps15 zaangażowanego w endocytozę poprzez asocjację z podjednostką AP2, białko Pan1p, też bierze udział w tym procesie, a mutanty *pan1-ts* mają silny defekt endocytozy [80]. Charakteryzują się też zaburzoną organizacją szkieletu aktynowego i głębszymi wgłębieniami błony komórkowej w porównaniu do komórek kontrolnych [76]. Pan1p wykazuje interakcję z wieloma białkami niezbędnymi do endocytozy: End3p [81], yAPI80, homologami epsin Ent1p i Ent2p, homologiem synaptojaniny Slj1p [76, 82, 83]. Zaproponowano więc, że pełni ono rolę multiwalentnego adaptoru niezbędnego do endocytozy [76]. Obserwacja genetycznej interakcji pomiędzy mutantami *pan1* i *rsp5* oraz defekt mutantów *rsp5/mdp1* w endocytozie związków rozpuszczalnych w wodzie (marker *Lucifer Yellow*) była pierwszą wskazówką udziału Rsp5p w endocytozie, odrębną od roli tego białka w ubikwitynacji internalizowanych białek [25]. *RSP5* wykazuje także genetyczną interakcję z *VRP1/MDP2* [25], innym genem niezbędnym do właściwej organizacji szkieletu aktynowego i zajścia endocytozy [84, 85]. Defekt endocytozy związków rozpuszczalnych w wodzie jest również obserwowany w mutantach z podstawieniami aminokwasów w domenie WW3 Rsp5p [71]. Analiza mutantów *rsp5-w* doprowadziła do powstania modelu, w którym Rsp5p odgrywa rolę w kilku etapach endocytozy białek. Domeny WW2 i WW3 są ważne dla procesów poprzedzających internalizację, a domeny WW3 i przypuszczalnie WW1 biorą udział w procesie internalizacji [71]. Ponadto, komórki z Rsp5p pozbawionym domeny C2 normalnie ubikwitynują Gap1p, ale mają zaburzoną internalizację, co sugeruje, że domena C2 uczestniczy w procesie internalizacji lub pośredniczy w oddziaływaniach czynników niezbęd-

nych w tym procesie [41] (Ryc. 2). Białko Rsp5p zostało ostatnio zlokalizowane w komórce drożdży metodą pośredniej immunofluorescencji. Znajduje się ono w strukturach punktowych zarówno blisko błony komórkowej jak i wewnątrz komórki, może być luźno związane z błoną plazmatyczną i z błonami organelli takich jak ER czy aparat Golgiego, ale nie występuje w jądrze i w mitochondriach [71]. Aby lepiej zrozumieć rolę Rsp5p na etapie internalizacji ubikwitynowanych białek błony komórkowej potrzebne są dalsze badania nad identyfikacją białek wiążących Rsp5p i udziałem poszczególnych domen w tych interakcjach.

VIII. Uwagi końcowe

Otrzymane w ostatnich latach wyniki sugerują, że Rsp5p odgrywa zasadniczą rolę w regulowaniu endocytozy zależnej od ubikwityny dla licznych białek błony komórkowej drożdży. Otrzymano także dowody na udział ludzkiego homologa Rsp5p, Nedd4, w podobnych procesach dotyczących niektórych ludzkich białek błony komórkowej. Zaburzenie oddziaływania podjednostek kanału sodowego ENaC z Nedd4 prowadzi do dziedzicznego nadciśnienia zwanego zespołem Liddle'a [86]. Wiele pytań pozostaje jeszcze bez odpowiedzi. Czy sama ubikwityna posiada wystarczające determinanty (obszary hydrofobowe) warunkujące endocytozę? Przez jakie białko są one rozpoznawane? Czy podobnie proces ten zachodzi u ssaków? Czy rodzaj wiązania między ubikwitynami w łańcuchach (przez lizynę 63) jest ważny dla selektywności? W jaki sposób Rsp5p wiąże białka, które nie mają motywów PY? Znalezienie na nie odpowiedzi wymaga dalszych badań. Przyczynią się one do pełnego zrozumienia jak ubikwitynacja białek błonowych sygnalizuje konieczność zajścia endocytozy oraz jaki jest udział Rsp5p w tych procesach.

Podziękowania

Praca została wykonana w ramach grantu 6P04B02416 Komitetu Badań Naukowych

Artykuł otrzymano 14 listopada 2000 r.

Zaakceptowano do druku 1 lutego 2001 r.

Piśmiennictwo

1. Hershko A, Ciechanover A (1998) *Annu Rev Biochem* 67: 425-479
2. Tobiasz A, Żołądek T (1997) *Post Biochem* 43: 91-97
3. Piotrowska U (1993) *Post Biochem* 39: 8-16

4. Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JDR (2000) *Trends Cell Biol* **10**: 429-439
5. Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP (2000) *Cell* **102**: 533-539
6. Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2563-2567
7. Harvcy KF, Kumar S (1999) *Trends Cell Biol* **9**: 166-169
8. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) *Cell* **96**: 635-644
9. Hochstrasser M (1996) *Annu Rev Genet* **30**: 405-439
10. Sommer T, Wolf D (1997) *FASEB J* **11**: 1227-1233
11. Hicke L (1999) *Trends Cell Biol* **9**: 107-112
12. Strous GJ, Govers R (1999) *J Cell Science* **112**: 1417-1423
13. Nalefski EA, Falke JJ (1996) *Protein Science* **5**: 2375-2390
14. Macias MJ, Hyvönen M, Baraldi E, Schultz J, Sudol M, Saraste M, Oschkinat H (1996) *Nature* **382**: 646-649
15. Chen HI, Sudol M (1995) *Proc Natl Acad Sci* **92**: 7819-7823
16. Bedford MT, Chan DC, Leder P (1997) *EMBO J* **16**: 2376-2383
17. Bedford MT, Reed R, Leder P (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10602-10607
18. Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, Lu KP (1999) *Science* **283**: 1325-1328
19. Chang A, Cheang S, Espanel X, Sudol M (2000) *J Biol Chem* **275**: 20562-20571
20. Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, Pavletich NP (1999) *Science* **286**: 1321-1326
21. Nuber U, Schwatz S, Kaiser P, Schneider R, Scheffner M (1996) *J Biol Chem* **271**: 2795-2800
22. Wang G, Yang J, Huibregtse JM (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 342-352
23. Beaudenon SL, Huacani MR, Wang G, McDonell DP, Huibregtse JM (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 6972-6979
24. Erdeniz N, Rothstein R (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 224-232
25. Żołądek T, Tobiasz A, Vaduva G, Boguta M, Martin NC, Hopper AK (1997) *Genetics* **145**: 595-603
26. Fisk HA, Yaffe MP (1999) *J Cell Biol* **145**: 1199-1208
27. Yashiroda H, Kaida D, Toh-e A, Kikuchi Y (1998) *Gene* **225**: 39-46
28. Wolfe D, Reiner T, Keeley JL, Pizzini M, Keil RL (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 8254-8262
29. de la Fuente N, Maladonado AM, Portillo F (1997) *FEBS Lett* **411**: 308-312
30. Kamińska J, Tobiasz A, Gniewosz M, Żołądek T (2000) *Gene* **242**: 133-140
31. Hoppe T, Matuszewski K, Rape M, Schlenker S, Ulrich HD, Jentsch S (2000) *Cell* **102**: 577-586
32. Nefsky B, Beach D (1996) *EMBO J* **15**: 1301-1312
33. Geli MI, Riezman H (1998) *J Cell Sci* **11**: 1031-1037
34. Riezman H (1998) *Sem Cell Dev Biol* **9**: 129-134
35. André B (1995) *Yeast* **11**: 1575-1611
36. Horák J (1997) *Biochim Biophys Acta* **1331**: 41-79
37. Kölling R, Hollenberg CP (1994) *EMBO J* **13**: 3261-3271
38. Hein C, Springael JY, Volland C, Haguenaucr-Tsapis R, André B (1995) *Mol Microbiol* **18**: 77-87
39. Galan JM, Moreau V, André B, Volland C, Haguenaucr-Tsapis R (1996) *J Biol Chem* **271**: 10946-10952
40. Springael JY, André B (1998) *Mol Biol Cell* **9**: 1253-1263
41. Springael JY, De Craenc JO, André B (1999) *Biochem Biophys Res Com* **257**: 561-566
42. Huibregtse JM, Yang JC, Beaudenon SL (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3656-3661
43. Beck T, Schmidt A, Hall MN (1999) *J Cell Biol* **146**: 1227-1237
44. Gitan RS, Eide DJ (2000) *Biochem J* **346**: 329-336
45. Hicke L, Riezman H (1996) *Cell* **84**: 277-287
46. Krampe S, Stamm O, Hollenberg CP, Boles E (1998) *FEBS Lett* **441**: 343-347
47. Lucero P, Lagunas R (1997) *FEMS Microbiol Lett* **147**: 273-277
48. Medintz I, Jiang H, Michels CA (1998) *J Biol Chem* **273**: 34454-34462
49. Roth AF, Davis NG (1996) *J Cell Biol* **134**: 661-674
50. Galan JM, Haguenaucr-Tsapis R (1997) *EMBO J* **16**: 5847-5854
51. Springael JY, Galan JM, Haguenaucr-Tsapis R, André B (1999) *J Cell Sci* **112**: 1375-1383
52. Terrell J, Shih S, Dunn R, Hicke L (1998) *Mol Cell* **1**: 193-202
53. Kölling R, Losko S (1997) *EMBO J* **16**: 2251-2261
54. Roth AF, Sullivan DM, Davis NG (1998) *J Cell Biol* **142**: 949-961
55. Egner R, Mahé Y, Pandjaitan R, Kuchler K (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 5879-5887
56. Horák J, Wolf DH (1997) *J Bacteriol* **179**: 1541-1549
57. Riballo E, Herweijer M, Wolf DH, Lagunas R (1995) *J Bacteriol* **177**: 5622-5627
58. Volland C, Urban-Grimal D, Géraud G, Haguenaucr-Tsapis R (1994) *J Biol Chem* **269**: 9833-9841
59. Karagiannis J, Salecki R, Young PG (1999) *Curr Genet* **35**: 593-601
60. Salecki R, Jia Z, Karagiannis J, Young PG (1997) *Mol Gen Genet* **254**: 520-528
61. Robinson M (1997) *Trends Cell Biol* **7**: 99-102
62. Tan PK, Howard JP, Payne GS (1996) *J Cell Biol* **135**: 1789-1800
63. Hein C, André B (1997) *Mol Microbiol* **24**: 607-616
64. Hicke L, Zanolari B, Riezman H (1998) *J Cell Biol* **141**: 349-358
65. Feng Y, Davis NG (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 5350-5359
66. Roth AF, Davis NG (2000) *J Biol Chem* **275**: 8143-8153
67. Seron K, Blondel MO, Haguenaucr-Tsapis R, Volland C (1999) *J Bacteriol* **181**: 1793-1800
68. Marchal C, Haguenaucr-Tsapis R, Urban-Grimal D (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 314-21
69. Marchal C, Haguenaucr-Tsapis R, Urban-Grimal D (2000) *J Biol Chem* **275**: 23608-23614
70. Chen HI, Einbond A, Kwak SJ, Linn H, Koepf E, Peterson S, Kelly JW, Sudol M (1997) *J Biol Chem* **272**: 17070-17077
71. Gajewska B, Kamińska J, Jesionowska A, Martin NC, Hopper AK, Żołądek T (2001) *Genetics* **157**: 91-101
72. Pickart CM (1997) *FASEB J* **11**: 1055-1066
73. Arnason T, Ellison MJ (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7876-7883
74. Hicke L (1997) *FASEB J* **11**: 1215-1226
75. Shih SC, Sloper-Mould KE, Hicke L (2000) *EMBO J* **19**: 187-198
76. Wendland B, Emr SD, Riezman H (1998) *Curr Opin Cell Biol* **10**: 513-522
77. Penalver E, Lucero P, Moreno E, Lagunas R (1999) *J Bacteriol* **181**: 2555-2563
78. Rotin D, Staub O, Haguenaucr-Tsapis R (2000) *J Membr Biol* **176**: 1-17
79. Huang K, D'Hondt K, Riezman H, Lemmon S (1999) *EMBO J* **18**: 3897-3908
80. Tang HY, Munn A, Cai M (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 4294-4304
81. Bénédetti H, Raths S, Crausaz F, Riezman H (1994) *Mol Biol Cell* **5**: 1023-1037
82. Santolini E, Salcini AE, Kay BK, Yamabhai M, Di Fiore PP (1999) *Exp Cell Res* **253**: 186-209
83. Wendland B, Steece KE, Emr SD (1999) *EMBO J* **18**: 4383-4393
84. Żołądek T, Vaduva G, Hunter LA, Boguta M, Go BD, Martin NC, Hopper AK (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 6884-6894
85. Munn AL, Stevenson BJ, Geli MI, Riezman H (1995) *Mol Biol Cell* **6**: 1721-1742
86. Staub O, Dho S, Henry PC, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D (1996) *EMBO J* **15**: 2371-2380

Receptor estrogenowy β — budowa, regulacja i funkcja*

Estrogen receptor β — structure, regulation and function

Marta Tkaczyk¹, Katarzyna Kalita²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rodzina receptorów jądrowych
- III. Receptory estrogenowe — funkcjonowanie w komórce
- IV. Dwa receptory estrogenowe — porównanie
- V. Izoformy ER β
- VI. Oddziaływanie ER β z innymi białkami
- VII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AF1 — domena transaktywacyjna 1 (ang. *activation function 1*), AF2 — domena transaktywacyjna 2 (ang. *activation function 2*), DBD — domena wiążąca DNA (ang. *DNA binding domain*), ER — receptor estrogenowy (ang. *estrogen receptor*), ERE — sekwencja nukleotydów wiążąca receptor estrogenowy (ang. *estrogen responsive element*), ERK — kinazy regulowane zewnątrzkomórkowo (ang. *extracellular regulated kinases*), JNK — kinazy c-Jun aminowego końca białka (ang. *c-Jun N-terminal kinases*), kinazy MAP — kinazy aktywowane przez mitogen (ang. *mitogen activated protein kinases*), LBD — domena wiążąca ligand (ang. *ligand binding domain*), SFRE — element odpowiadający na SF1 (ang. *SF1 responsive element*), SHR — receptory hormonów steroidowych (ang. *steroid hormone receptors*).

I. Wstęp

Znanych jest obecnie około 150 białek należących do grupy receptorów jądrowych. Nazwano je tak ze względu na miejsce działania oraz lokalizację. Ich ligandy to małe, lipofilne cząsteczki przechodzące przez błonę cytoplazmatyczną na zasadzie dyfuzji. Należą do nich hormony steroidowe i tyroidowe, retinoidy, witamina D₃ i niektóre prostaglandyny [1-7]. Receptory dla tych substancji po utworzeniu kompleksu z ligandem są zdolne do oddziaływania z DNA i regulowania transkrypcji. Ostatnio zwrócono uwagę na zaskakującą lokalizację jednego z tych re-

Contens:

- I. Introduction
- II. Nuclear receptor family
- III. Estrogen receptors — function in the cell
- IV. Two estrogen receptors — comparison
- V. ER β isoforms
- VI. Interaction of ER β with other proteins
- VI. Concluding remarks

ceptorów, receptora estrogenowego, [8] w błonie cytoplazmatycznej oraz jego zdolność do pobudzania kaskady wtórnych przekaźników [9-12]. Wydaje się, więc, że receptory estrogenowe mogą występować w dwóch kompartmentach komórkowych i funkcjonować na dwa różne sposoby. Po pierwsze jako czynniki transkrypcyjne oraz dodatkowo jako receptory błonowe. Estrogeny i receptory estrogenowe odgrywają ważną rolę w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu żeńskich tkanek rozrodczych m.in. kształtowaniu się gruczołu mlekowego podczas embriogenezy oraz dojrzewaniu pęcherzyków Graafa w trakcie cyklu miesięcznego. Odgrywają one także ważną rolę w utrzymaniu homeostazy wapniowej, co ma znaczenie m.in. dla prawidłowego funkcjonowania tkanki kostnej [13-15]. Choroby takie jak osteoporoza, nowotwory piersi i endometrium oraz choroby krążenia są często związane z zaburzeniami w funkcjonowaniu receptorów estrogenowych.

II. Rodzina receptorów jądrowych

Receptory jądrowe zbudowane są z 6 domen oznaczonych literami od A do F [5, 16] (Ryc. 1). Domeny A i B, zlokalizowane na końcu aminowym białka, mają funkcje aktywujące transkrypcję (ang. *activation function 1* — AF1) niezależne od przyłączenia liganda. Domena C jest zaangażowana w dimeryzację receptora oraz za przyłączenie kompleksu ligand-receptor do specyficznej sekwencji w DNA (ang. *DNA binding domain* — DBD). Domena ta jest w dużym stopniu zachowywana w toku ewolucji. We wszystkich receptorach jądrowych ma budowę tzw.

¹Mgr, ²Mgr, Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Doświadczalnej, im. M. Nenckiego, Pasteura 3 02-093 Warszawa, tel. 659 8571 wew. 356, e-mail martat@nencki.gov.pl, e-mail kalitak@nencki.gov.pl

palców cynkowych [17, 18]. Również właściwość wiązania DNA wykazuje w pewnym stopniu domena D nazywana też zawiasem (ang. *hinge*). Jej sekwencja jest bardziej zmienna niż sekwencja domeny C, region ten zawiera sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. *nuclear localization signal*). Następna, w kierunku karboksylowego końca białka, jest zachowywana w toku ewolucji domena E. Domena ta zawiera strukturę hydrofobowej kieszeni przyłączającej specyficzny ligand (ang. *ligand binding domain* — LBD). Domena E umożliwia także dimeryzację receptorów jądrowych, a jej fragment położony na końcu karboksylowym jest odpowiedzialny za aktywację transkrypcji, zależną od przyłączenia liganda (ang. *activation function 2* — AF2). Co ciekawe, receptory sztucznie pozbawione LBD są konstytutywnymi transaktywatorami tzn. aktywują transkrypcję mimo nieobecności liganda. Niektóre receptory, w tym i receptory estrogenowe (ang. *estrogen receptor* — ER), zawierają również domenę F, której rola nie jest do końca wyjaśniona.

III. Receptory estrogenowe — funkcjonowanie w komórce

Nie związane z ligandem receptory estrogenowe znajdują się w jądrze komórkowym, gdzie połączone są z dużym kompleksem białek opiekuńczych z rodziny Hsp. W ten sposób utrzymywane są w stanie nieaktywnym, ale w zdolności do przyłączenia liganda [19].

Podobnie jak inne receptory jądrowe, receptory estrogenowe są czynnikami transkrypcyjnymi, które po przyłączeniu jednego z estrogenów zdolne są do regulowania transkrypcji innych genów (Ryc. 2). Przyłączenie liganda jest także warunkiem dimeryzacji, która jest niezbędna do utworzenia funkcjonalnego czynnika transkrypcyjnego. Dimery przyłączają się do odcinków DNA mających budowę odwróconych powtórzeń czyli sekwencji palindromowych. Receptory estrogenowe przyłączają się do fragmentu DNA określanego jako element odpowiadający na estrogen (ang. *estrogen responsive element* — ERE) o następującej sekwencji:

5' GGTCAnnnTGACC 3',

3' CCAGTnnnACTGG 5'

gdzie n oznacza dowolny nukleotyd. Kolejność pięciu nukleotydów końca 5' jednej nici jest taka sama,

jak kolejność pięciu nukleotydów końca 5' drugiej nici, ale w odwróconym porządku. Co za tym idzie analogiczną prawidłowość wykazują odcinki z końców 3'.

Jak już zasygnalizowano receptor estrogenowy może pełnić jeszcze drugą funkcję, działać jako receptor błonowy. Przypuszczenie to potwierdzają doniesienia o aktywacji wtórnych przekaźników po podaniu estrogenów w przeciągu kilku minut. Przekaznikami tymi są: cAMP [20], Ca²⁺ [21], diacyloglicerol (DAG) oraz inozytolotrifosforan (IP3) [22, 23]. Najnowsze dane wskazują nie tylko na występowanie receptorów estrogenowych w błonie komórkowej, ale także na ich aktywność w tym kompartmentcie komórkowym. W badaniach tych jako model doświadczalny wybrano linię komórkową, w której nie wykryto obecności żadnego z ER. Aby uzyskać ich ekspresję wprowadzono do komórek cDNA kodujące te białka. Reakcja z przeciwciałem i przyłączanie wyznakowanego radioaktywnie estradiolu wykazały ich obecność w błonie komórkowej. Co ważniejsze po raz pierwszy stwierdzono, że receptory estrogenowe zlokalizowane w błonie komórkowej są aktywne. Po przyłączeniu estradiolu wydają się pobudzać białka G, zewnątrzkomórkowo regulowane kinazy ERK (ang. *extracellular regulated kinases* — ERK) i kinazy JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases* — JNK) [8]. Ta sama grupa badaczy zaobserwowała, że endogenne receptory estrogenowe może również być zlokalizowany w błonie komórkowej komórek w hodowli tkankowej [24]. Niestety dane o pobudzaniu wtórnych przekaźników przez receptory estrogenowe zlokalizowane w błonie komórkowej pochodzą z jednego laboratorium i są na razie niepotwierdzone przez innych badaczy, aczkolwiek wcześniejsze badania wskazywały obecność ER również w błonie komórkowej [25-28].

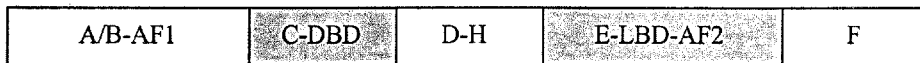
IV. Dwa receptory estrogenowe, porównanie

Przez wiele lat uważano, że istnieje tylko jeden receptor, przez który estrogeny mogą oddziaływać na komórki [1, 5]. W 1996 r., w kilku laboratoriach niezależnie, odkryto u szczura, myszy i człowieka drugi, specyficzny dla estrogenów, receptor [29-31]. Wcześniej poznane i scharakteryzowane białko określono jako receptor estrogenowy α (ER α) zaś to nowe jako receptor estrogenowy beta (ER β). Recep-

*Praca na temat receptora estrogenowego alfa (ER α) zastała opublikowana w *Postęпах Biochemii*, Kulig E., „Receptor estrogenowy: budowa i funkcje w normalnej i neoplastycznej tkance” 1994 (40): 222-229.

tory α i β nie są wzajemnymi izoformami, lecz dwoma różnymi białkami, kodowanymi przez dwa odrębne geny zlokalizowane na różnych chromosomach. Gen kodujący receptor estrogenowy beta ($ER\beta$) znajduje się w genomie myszy na 12 chromosomie, natomiast u człowieka na 14. Składa się z 8 eksonów rozmieszczonych na obszarze około 40 kb (Ryc. 6a). Oba receptory, pod względem budowy i oddziaływań na poziomie molekularnym, są podobne do siebie, ale występujące różnice wskazują na odmienne, specyficzne dla każdego z nich funkcje biologiczne. Budowa obu receptorów wykazuje cechy wspólne ze wszystkimi receptorami jądrowymi (por. Ryc. 1 i Ryc. 3). Mysi $ER\alpha$ składa się z 599 amino-

Jedną z właściwości biochemicznych, wspólnych dla obu receptorów, jest przyłączanie się do charakterystycznej sekwencji DNA, czyli wspomnianej już ERE. Omówiona już sekwencja: 5' GGTCAnnnT-GACC 3' została nazwana sekwencją konsensusową. Występuje ona np. w promotorze genu vitellogeniny. Receptory estrogenowe łączą się również z szeregiem sekwencji ERE różniących się budową od sekwencji konsensusowej występujących w promotorach innych genów [31]. Jednak powinowactwo $ER\alpha$ do tych sekwencji jest inne niż powinowactwo $ER\beta$ [31, 33]. Odkryto również, że do sekwencji złożonej z jednej połowy palindromu ERE poprzedzonej trynukleotydom sekwencją TCA [34] $ER\alpha$ przyłącza

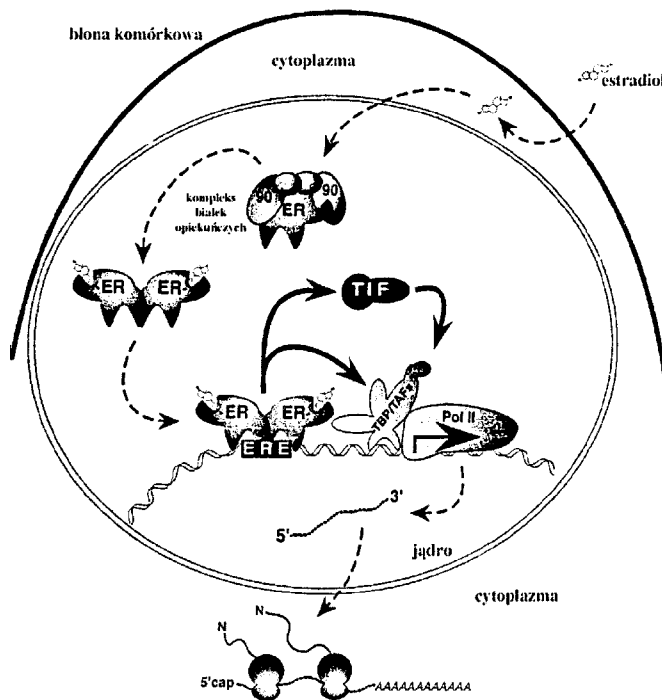


Ryc. 1. Schemat budowy receptorów jądrowych. A/B-AF1 — domeny A i B — funkcja aktywacji transkrypcji 1, C-DBD — domena C — przyłączenie do DNA, D-H — domena D — zawias, E-LBD-AF2 — domena E — przyłączenie liganda, funkcja aktywacji transkrypcji 2, F — domena F

kwasy, natomiast $ER\beta$ jest nieco mniejszy i składa się z 485 aminokwasów. Największą homologię receptory te wykazują w obrębie domeny C-DBD — 97% i E-LBD — 60%. Najmniej zaś zachowany w toku ewolucji jest koniec aminowy tych białek, w ob-

ję się aktywując transkrypcję, natomiast nie obserwuje się przyłączenia $ER\beta$ [32].

Ważną właściwością biochemiczną wspólną dla obu receptorów estrogenowych jest przyłączenie liganda. Naturalnie występującymi ligandami dla obu



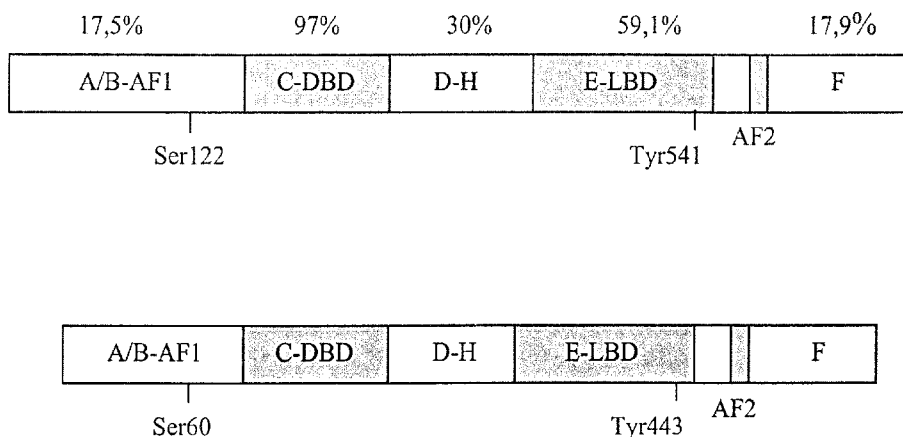
Ryc. 2. Schemat funkcjonowania receptorów estrogenowych w komórce. ER — receptor estrogenowy, 90 — białko Hsp90, TIF — czynniki inicjujące transkrypcję (ang. *transcription initiation factors*), TBP — białko łączące się z sekwencją TATA (ang. *TATA binding protein*), TAFs — czynniki aktywujące transkrypcję (ang. *transcription activating factors*), Pol II — polimeraza II.

jębie którego znajduje się domena transaktywująca AF1. Te cechy pokazują, że białka te mimo dużego podobieństwa mogą pełnić różne funkcje.

z nich jest 17 β estradiol, estron i estriol (Ryc. 4), jednak powinowactwo tych ligandów do każdego z ER wydaje się być różne. Wykazano na przykład mniej-

sze powinowactwo estradiolu do ER β niż ER α [31]. Poznane, endogennie występujące ligandy ER są w większości tkanek agonistami, czyli ligandami aktywującymi receptor. Znanych jest też szereg syntetycznych związków będących ligandami ER. Niektóre z nich są agonistami, inne antagonistami czyli li-

mi. Hipotezę tę potwierdza istnienie trzech grup peptydów — (1) łączących się z oboma receptorami związanymi z estradiolem, (2) specyficznych dla ER α i (3) specyficznych dla ER β . Jeżeli w doświadczeniu zmienimy ligand i zamiast estradiolu ER będą związane z OHT to ER α i ER β oddziałują z inny-



Ryc. 3. Porównanie budowy receptora estrogenowego α i receptora estrogenowego β . A/B-AF1 — domeny A i B, funkcja aktywująca transkrypcję 1, C-DBD — domena C, funkcja przyłączania do DNA D-H — domena D, zawias, E-LBD — domena E, funkcja przyłączania liganda, F — domena F, AF2 — funkcja aktywująca transkrypcję 2. Dane w procentach wskazują na stopień homologii poszczególnych domen. Zaznaczono również pozycje aminokwasów ważnych w modulowaniu funkcji receptora.

gandami hamującymi te receptory. W przypadku receptorów estrogenowych ten sam ligand może pełnić rolę raz agonisty, raz antagonisty w zależności od tego, czy łączy się z ER α czy z ER β . Przykładem może tu być estradiol. Występując w kompleksie z ER β spełnia rolę agonisty, ponieważ aktywuje transkrypcję genu vitellogeniny, w którego promotorze znajduje się sekwencja ERE. Jednocześnie będąc w tym samym kompleksie z ER β hamuje transkrypcję genu TNF- α , w którego promotorze znajduje się spe-

mi peptydami [37]. Zjawisko to wynika zapewne z budowy struktur pierwszorzędowych tych dwóch receptorów, wykazujących daleko idące homologie, ale jednak odmiennych i sugeruje istnienie wielu dalszych różnic w regulacji transkrypcji przez receptory estrogenowe.

Przyłączenie liganda powoduje aktywację ER. Istnieją jednak także inne mechanizmy modulujące ich funkcje. Jednym z nich jest fosforylacja. Analiza delecyjna i mutacyjna ER α wykazała dwa miejsca fos-



Ryc. 4. Schemat struktury naturalnych estrogenów.

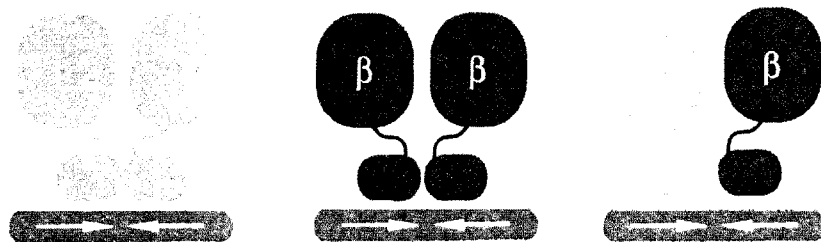
cyficzna sekwencja DNA odpowiedzialna za tę inhibicję [35]. Podobnie 4-hydroksytamoksifen (OHT) wykazuje właściwości agonisty ER α , a nie wykazuje takich właściwości dla ER β w tych samych warunkach [32, 36].

Uważa się, że różne efekty biologiczne działania ER α i ER β zależą bezpośrednio od różnych dla każdego z receptorów zmian konformacyjnych powodowanych przez różne ligandy, a co za tym idzie, oddziaływać z różnymi koaktywatorami i korepresora-

forylacji wpływające na aktywację transkrypcji. Jednym z nich jest Ser118 w ludzkim ER α , która wydaje się być ważna dla pełnej aktywności AF1 [38] będąc substratem dla kinaz MAP (ang. *mitogen activated protein kinases*) [39, 40]. Drugim jest Tyr537 w ludzkim ER α położona w bezpośrednim sąsiedztwie AF2, będąca substratem dla rodziny src kinaz tyrozynowych [41]. Zamiana tej reszty aminokwasowej, na zawierającą mniejsze łańcuchy boczne np. alaninę lub mające mniejszą hydrofobowość np. asparagi-

nian lub glutaminian, powoduje powstanie białka aktywującego transkrypcję niezależnie od przyłączenia liganda [42, 43]. Także w ER β występują reszty aminokwasowe odpowiadające wspomnianym miejscom fosforylacji. Jest to Ser105 i Tyr488 w mysim białku [31, 44, 45].

Receptory estrogenowe, podobnie do innych receptorów steroidowych, wykazują zdolność do heterodimeryzacji. Po przyłączeniu liganda mogą one tworzyć zarówno homodimery α - α i β - β , jak i heterodimery α - β *in vitro* i *in vivo* [46-48] (Ryc. 5). Wydaje się, że odrębne funkcje domeny AF1 są zachowywane po utworzeniu heterodimeru i obie domeny A/B niezależnie przejawiają swoje specyficzne aktywności. Jeżeli chodzi o AF2 obie funkcjonalne domeny są niezbędne do aktywacji transkrypcji *in vivo*, ale heterodimer spełnia rolę aktywującą, gdy tylko



Ryc. 5. Schemat dimeryzacji ER α i ER β . Strzałkami oznaczono połowy palindromu ERE.

jeden z partnerów przyłączył ligand [49]. Odrębne ścieżki regulacji i właściwości biochemiczne obu receptorów mogą więc być połączone, gdy aktywują one transkrypcję jako heterodimer.

V. Izoformy ER β

W wyniku obróbki posttranskrypcyjnej mRNA genów, kodujących zarówno białka ER α i ER β , może powstać wiele różnych izoform. Proces tworzenia izoform, w którym z pierwotnego transkryptu zostają usunięte introny oraz niektóre eksony nazywamy alternatywnym składaniem (ang. *alternative splicing*). Informacja genetyczna zawarta w genie, w tym wypadku receptora estrogenowego alfa i beta, może być „przedstawiona” jako kilka różnych cząsteczek mRNA, na podstawie których, po translacji, powstaną różne białka. Receptor estrogenowy beta, jak już wspomniano wcześniej, ma bardzo dobrze scharakteryzowane domeny (Ryc. 6b), silnie zachowane w toku ewolucji, które mają duże znaczenie w jego funkcjonowaniu. Dlatego też można oczekiwać, iż białka pozbawione pewnych obszarów będą pełnić odmienne funkcje. Do tej pory udało się wy-

izolować kilka różnych izoform ER β zarówno u człowieka [50] jak i u szczura [51, 52] (Ryc. 6c).

Różnice w funkcjonowaniu poszczególnych izoform nie są jeszcze do końca poznane. Na przykład, szczurze białko ER β 2, posiadające w porównaniu z ER β 1, dodatkowo 18 aminokwasów w obrębie domeny wiążącej ligand (ang. *ligand binding domain* — LBD) tworzy homo- i heterodimery. Natomiast jego zdolność przyłączania estrogenu jest zmniejszona w stosunku do formy ER β 1. ER β 2 działa najprawdopodobniej jako negatywny dominujący mutant, hamując aktywność transkrypcyjną po utworzeniu dimerów z aktywującymi izoformami receptora estrogenowego zarówno α jak i β , czyli jest negatywnym regulatorem funkcji estrogenu. Izoformy ER β 2 δ 3 oraz ER β 1 δ 3, pozbawione fragmentu odpowiedzialnego za łączenie się z DNA (ang. *DNA bin-*

ding domain — DBD) — struktury palca cynkowego — posiadają zdolność do dimeryzacji z ER α i ER β , same zaś nie łączą się z sekwencją ERE. Wydaje się, że po związaniu z innym receptorem estrogenowym hamują jego zdolność do transaktywacji. Natomiast izoforma ER β 1 δ 4 posiada delecję w obrębie regionu H, czyli pozbawiona jest sygnału lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal* — NLS). Białko to można zlokalizować w jądrze i cytoplazmie w przeciwieństwie do ER β 1, które jest obecne tylko w jądrze.

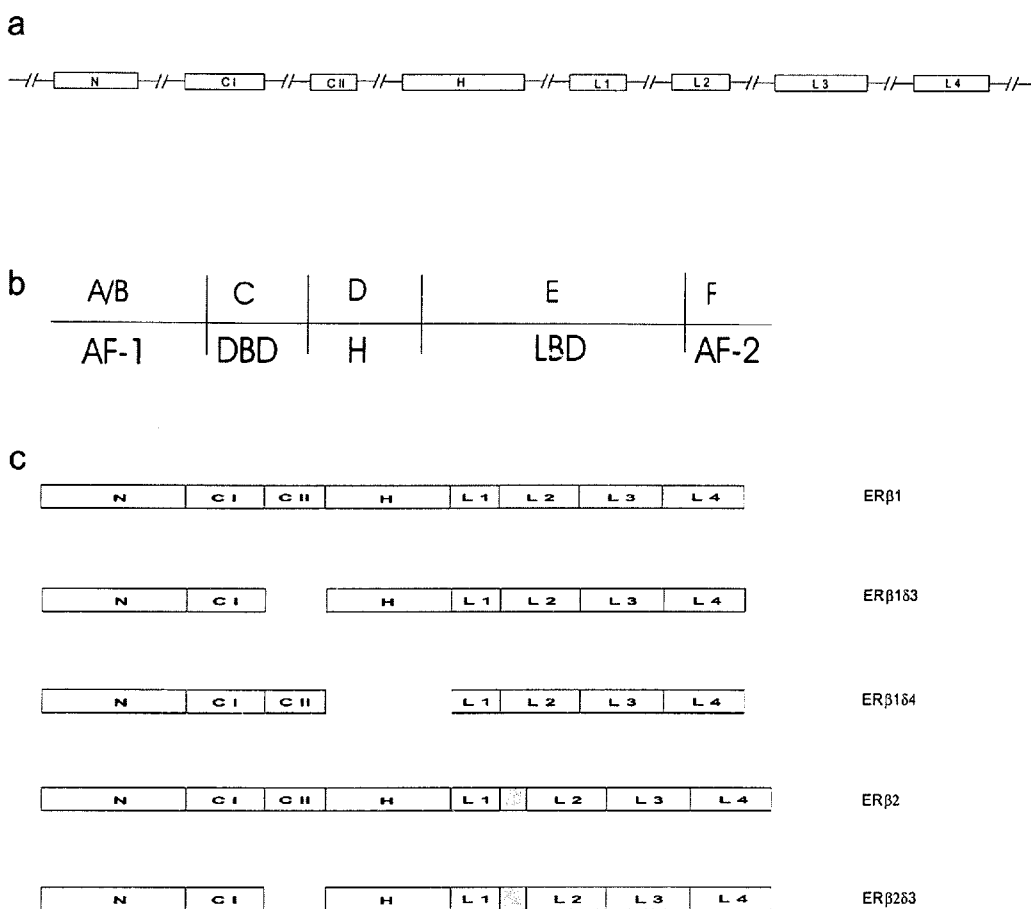
Co ciekawe, izoformy ER β zidentyfikowane u szczura różnią się od tych występujących u człowieka. Do tej pory scharakteryzowano trzy, które posiadają delecję w obrębie domeny LBD, natomiast pozostałe różnią się między sobą głównie w obrębie domeny F (na końcu karboksylowym białka). Najczęściej nie posiadają one ostatniego eksonu. Utworzone sztucznie mutanty ER β pozbawione z karboksylowego końca białka 50 aminokwasów są zdolne do dimeryzacji z receptorem α i β , natomiast blokują zdolność do transaktywacji tych kompleksów [53]. Mechanizm tego procesu nie jest poznany, reakcja taka może na przykład zachodzić poprzez kompety-

cję o ERE, tworzenie nieaktywnych heterodimerów z dzikim ER lub wyciszeniu transkrypcji (ang. *silencing*).

Istnienie tak wielu izoform receptora estrogenowego beta daje potencjalną możliwość różnorodności w sile przyłączania liganda, oddziaływania z sekwencją ERE jak również aktywności transkrypcyjnej. Możliwe, że specyficzne typy komórek znaj-

da. Jest to wyjątkowa sytuacja wśród receptorów jądrowych — aktywacja transkrypcji przez czynniki niesteroidowe wymagająca przyłączenia koaktywatora [54].

Inne oddziaływanie zaobserwowane do tej pory w przypadku ER β zachodzi prawdopodobnie z czynnikiem transkrypcyjnym AP1. Podobnie, jak w przypadku SRC1, ER α i ER β oddziałują z tym białkiem



Ryc. 6. Schemat budowy genu ER β i jego izoform u szczura. a) Schemat budowy genu kodującego ER β u szczura. b) Schemat budowy białka ER β . c) Sklonowane izoformy ER β u szczura.

dujące się w określonym stanie fizjologicznym zwiększając poziom ekspresji poszczególnych izoform. Występowanie tak dużej różnorodności białek ER β być może być istotnym czynnikiem regulującym komórkową odpowiedź na estrogen.

VI. Oddziaływanie ER β z innymi białkami

Jak do tej pory znane są dwa białka oddziaływające z ER β . Jednym z nich jest koaktywator receptorów steroidowych 1 (ang. *steroid receptor coactivator 1* — SRC1), który oddziałuje z szeregiem receptorów steroidowych. Do zaistnienia oddziaływania z ER β konieczna i wystarczająca jest domena AF1 fosforylowana przez kinazę MAP. Oddziaływanie to jest niezależne od przyłączenia ligan-

w odmienny sposób. Jeżeli bowiem ligandem jest naturalnie występujący 17 β — estradiol, to ER α powoduje wzrost poziomu transkrypcji genu, w którego promotorze występuje miejsce przyłączenia AP-1, natomiast ER β powoduje obniżenie poziomu transkrypcji tego genu. Co więcej trzej sztucznie otrzymani antagoniści ER α tj. tamoxifen, raloxifen i ICI 164384 powodują aktywację transkrypcji w przypadku ER β oddziałującym z białkiem AP-1 [55].

VII. Podsumowanie

Różnice w funkcjonowaniu dwóch typów receptorów estrogenowych na poziomie molekularnym mają także swoje konsekwencje na poziomie organizmu. Świadczą o tym fenotypy myszy sztucznie pozba-

wionych genów ER α i ER β . Pozbawienie myszy ER α powoduje całkowitą bezpłodność. Samice nie wytwarzają ciała żółtego i cierpią na torbiele jajników. Samce wykazują atrofię jąder, zmniejszoną spermatogenezę i mniejszą gęstość plemników w spermie [14]. Poza tym obserwuje się u tych zwierząt aberracje w zachowaniach reprodukcyjnych i rozwoju gruczołów mlecznych [56].

Natomiast pozbawienie myszy ER β nie powoduje całkowitej bezpłodności tych zwierząt [57]. Samice wykazują zmniejszoną płodność spowodowaną zablokowaniem ostatniego etapu dojrzewania pęcherzyka Graafa przed owulacją, wobec tego wytwarzają niewiele, albo wcale nie występuje u nich ciało żółte. Samce są całkowicie płodne. Sugeruje się jednak udział ER β w przeroście prostaty [29, 58].

Niezależnie od mechanizmów kompensujących brak danego białka w trakcie rozwoju zwierzęcia wyniki przedstawionych wyżej badań wskazują, że fenotyp myszy bez ER α jest diametralnie różny od fenotypu myszy bez ER β . Świadczy to o odmiennym wpływie obu receptorów na funkcjonowanie organizmu. Wyniki tych badań mogą być jednak kwestionowane, ponieważ u osobników można wykryć niektóre izoformy usuwanego receptora estrogenowego. Na przykład w macicy jednego ze szczepów mysich pozbawionych ER α można wykryć to białko przy pomocy przeciwciała. Nie wiadomo jednak, czy użyte przeciwciało jest całkowicie specyficzne tylko dla ER α [14]. Natomiast w jajnikach jednego ze szczepów myszy pozbawionych ER β wykryto przy pomocy techniki RT-PCR istnienie fragmentów końca 5' mRNA dla tego białka [59].

Dodatkowym potwierdzeniem hipotezy o różnej funkcji, którą pełnią oba receptory jest ich różna lokalizacja tkankowa. Wydaje się, że ER α ulega ekspresji w większej ilości tkanek niż ER β . Występują tkanki gdzie nie wykryto obecności mRNA dla ER β , w których jednak występuje mRNA dla ER α np. gruczoł mleczny, nerka i aorta [60]. W różnych tkankach występuje także odmienny poziom mRNA dla każdego z tych dwóch białek. Na przykład dominującą formą receptora estrogenowego w jajniku i w płucach pod względem ilości mRNA jest ER β , w prostatie i w jądrze występują równe ilości obu transkryptów, a w podwzgórzu u obu płci obserwuje się dwukrotnie większą ekspresję ER α niż ER β [60].

Wszystkie te dane zarówno na poziomie molekularnym, jak i całego organizmu świadczą o dwóch drogach oddziaływania estrogenów na funkcjonowanie komórek. Drogi te są z jednej strony odmienne, a z drugiej strony ściśle zajązają się ze sobą.

Piśmiennictwo

1. Beato M, Truss M, Chavez S (1996) *Ann N Y Acad Sci USA* 784: 93-123
2. Forman B M, Tontono P, Chen J, Brun R P, Spiegelman B M, Evans R M (1995) *Cell* 83(5): 803-12
3. Gronemeyer H (1991) *Annu Rev Genet* 25: 89-123
4. Kliewer S A, Lenhard J M, Willson T M, Patel I, Morris D C, Lehmann J M (1995) *Cell* 83(5): 813-9
5. Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans R M (1995) *Cell* 83(6): 835-9
6. Mangelsdorf D J, Evans R M (1995) *Cell* 83(6): 841-50
7. Wahli W, Martinez E (1991) *Faseb J* 5(9): 2243-9
8. Razandi M, Pedram A, Greene G L, Levin E R (1999) *Mol Endocrinol* 13(2): 307-19
9. Gametchu B (1987) *Science* 236(4800): 456-61
10. Blackmore P F, Lattanzio F A (1991) *Biochem Biophys Res Commun* 181(1): 331-6
11. Nemere I, Dormanen M C, Hammond M W, Okamura W H, Norman A W (1994) *J Biol Chem* 269(38): 23750-6
12. Wehling M (1995) *Steroids* 60(1): 153-6
13. Korach K S (1994) *Science* 266(5190): 1524-7
14. Lubahn D B, Moyer J S, Golding T S, Couse J F, Korach K S, Smithies O (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90(23): 11162-6
15. Smith E P, Boyd J, Frank G R, Takahashi H, Cohen R M, Specker B, Williams T C, Lubahn D B, Korach K S (1994) *N Engl J Med* 331(16): 1056-61
16. Beato M, Herrlich P, Schutz G (1995) *Cell* 83(6): 851-7
17. Berg J M (1989) *Cell* 57(7): 1065-8
18. Klug A, Schwabe J W (1995) *Faseb J* 9(8): 597-604
19. Pratt W B (1993) *J Biol Chem* 268(29): 21455-8
20. Aronica S M, Kraus W L, Katzenellenbogen B S (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91(18): 8517-21
21. Tesarik J, Mendoza C (1995) *J Clin Endocrinol Metab* 80(4): 1438-43
22. Lieberherr M, Grosse B, Kachkache M, Balsan S (1993) *J Bone Miner Res* 8(11): 1365-76
23. Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M (1997) *J Biol Chem* 272(18): 11902-7
24. Morey A K, Pedram A, Razandi M, Prins B A, Hu R M, Biesiada E, Levin E R (1997) *Endocrinology* 138(8): 3330-9
25. Pietras R J, Szego C M (1977) *Nature* 265(5589): 69-72
26. Pietras R J, Szego C M (1980) *Biochem J* 191(3): 743-60
27. Berthois Y, Poureau-Schneider N, Gandilhon P, Mitre H, Tubiana N, Martin P M (1986) *J Steroid Biochem* 25(6): 963-72
28. Pappas T C, Gametchu B, Watson C S (1995) *Faseb J* 9(5): 404-10
29. Kuiper G G J M, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-C (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12): 5925-30
30. Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) *FEBS Lett* 392(1): 49-53
31. Tremblay G B, Tremblay A, Copeland N G, Gilbert D J, Jenkins N A, Labrie F, Giguere V (1997) *Mol Endocrinol* 11(3): 353-65
32. Vanacker J M, Pettersson K, Gustafsson J-C, Laudet V (1999) *Embo J* 18(15): 4270-9
33. Hyder S M, Chiappetta C, Stancel G M (1999) *Biochem Pharmacol* 57(6): 597-601
34. Wilson T E, Fahrner T J, Milbrandt J (1993) *Mol Cell Biol* 13(9): 5794-804

35. Jinping A, Ralff C J, Ribeiro, Webb P, Gustafsson J-C, Kushner P J, Baxter J D, Leitman D C (1999) *PNAS* **96**(26): 15161-15166
36. Watanabe T, Inoue S, Ogawa S, Ishii Y, Hiroi H, Ikeda K, Orimo A, Muramatsu M (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **236**(1): 140-5
37. Paige L A, Christensen D J, Grqn H, Norris J D, Gottlin E B, Padilla K M, Chang C-Y, Ballas L M, Hamilton P T, McDonnell D P, Fowlkes D M (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3999-4004
38. Ali S, Metzger D, Bornert J-M, Chambon P (1993) *Embo J* **12**(3): 1153-60
39. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P (1995) *Science* **270**(5241): 1491-4
40. Bunone G, Briand P-A, Miksicek R J, Picard D (1996) *Embo J* **15**(9): 2174-83
41. Arnold S F, Vorobjeikina D P, Notides A C (1995) *J Biol Chem* **270**(50): 30205-12
42. White R, Sjöberg M, Kalkhoven E, Parker M G (1997) *Embo J* **16**(6): 1427-35
43. Weis K E, Ekena K, Thomas J A, Lazennec G, Katzenellenbogen B S (1996) *Mol Endocrinol* **10**(11): 1388-98
44. Tremblay G B, Tremblay A, Labrie F, Giguère V (1998) *Cancer Res* **58**(5): 877-81
45. Giguere V, Tremblay A, Tremblay G B (1998) *Steroids* **63**(5-6): 335-9
46. Cowley S M, Hoare S, Mosselman S, Parker M G (1997) *J Biol Chem* **272**(32): 19858-62
47. Pettersson K, Grandien K, Kuiper G G, Gustafsson J-C (1997) *Mol Endocrinol* **11**(10): 1486-96
48. Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes R C, Ali S (1997) *J Biol Chem* **272**(41): 25832-8
49. Tremblay G B, Tremblay A, Labrie F, GiguPre V (1999) *Mol Cell Biol* **19**(3): 1919-27
50. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-C (1997) *J Clin Endocrinol Metab* **82**(12): 4258-65
51. Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka H, Kanou H, Shimaya E, Hashimoto S, Kato S, Kawashima H (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **246**(1): 142-7
52. Petersen D N, Tkalcevic G T, Koza-Taylor P H, Turi T G, Brown T A (1998) *Endocrinology* **139**(3): 1082-92
53. Ogawa S, Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M (1998) *FEBS Lett* **423**(2): 129-32
54. Tremblay A, Tremblay G B, Labrie F, GiguPre V (1999) *Mol Cell* **3**(4): 513-9
55. Moore J T, McKee D D, Slentz-Kesler K, Moore L B, Jones S A, Horne E L, Su J L, Kliewer S A, Lehmann J M, Willson T M (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1): 75-8
56. Paech K, Webb P, Kuiper G G J M, Nilsson S, Gustafsson J-C, Kushner P J, Scanlan T S (1997) *Science* **277**(5331): 1508-10
57. Ogawa S, Taylor J A, Lubahn D B, Korach K S, Pfaff D W (1996) *Neuroendocrinology* **64**(6): 467-70
58. Bocchinfuso W P, Korach K S (1997) *Endocrine Related Cancer* (4): 387-406
59. Krege J H, Hodgin J B, Couse J F, Enmark E, Warner M, Mahler J F, Sar M, Korach K S, Gustafsson J-C, Smithies O (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15677-82
60. Couse J F, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J-C, Korach K S (1997) *Endocrinology* **138**(11): 4613-21

Rola receptorów chemokin w procesie infekcji HIV oraz leczeniu AIDS

Role of chemokine receptors in HIV-1 infection and AIDS therapy

PAWEŁ P. JAGODZIŃSKI

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Chemokiny i ich receptory
- III. Receptory chemokin wiążące wirusa HIV-1
- IV. Rola koreceptorów wirusa HIV-1 w terapii AIDS
- V. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: AIDS — (ang. *Acquired immunodeficiency syndrome*), ALX40 — 4C-polipeptyd wyizolowany z *Limulus polyphemus*, AMD3100 — fenylobis-(metyleno)-bis-(1,4,8,11)-tetraazocycloheptadecan, AOP — RANTES (RANTES z przyłączonym na N-końcu aminooksyntanem), CD4 — białko (antygen) różnicowania limfocytów T, α (CXC) — grupa chemokin zawierająca w łańcuchu polipeptydowym dwie pierwsze reszty cysteiny N-końca rozdzielone jedną resztą aminokwasową, β (CC) — grupa chemokin zawierająca na N-końcu łańcucha polipeptydowego obok siebie, dwie reszty cysteiny, γ (CX₃C) — grupa chemokin zawierająca w łańcuchu polipeptydowym dwie pierwsze reszty cysteiny N-końca rozdzielone trzema resztami aminokwasowymi, δ (C) — grupa chemokin zawierająca na N-końcu łańcucha polipeptydowego jedną resztę cyteiny, CCR — receptory chemokin należących do grupy β (CC), CCR5 — receptor chemokin wiążący monocyto/makrofagotropowe wirusy HIV-1, CCR2B, CCR3 i CCR8 — receptory chemokin wiążące duotropowe wirusy HIV-1, CXCR — receptory chemokin wiążące chemokiny grupy α (CXC), CXCR4 — receptor chemokin wiążący limfocytotropowe wirusy HIV-1, 2D7 — monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko CCR5, DARC — (ang. *Duffy Antigen/Receptor for Chemokines*), ELR — rodzaj chemokin α (CXC) zawierająca tripeptyd (Glu, Leu, Arg) na N-końcu łańcucha polipeptydowego, 12G5 — monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko CXCR4, gag — sekwencja kodująca białka strukturalne nukleokapsydu i kapsydu, gp41 — glikoproteina 41, gp120 — glikoproteina 120, met — RANTES (RANTES z przyłączoną na N-końcu resztą metioniny), MIP — 1 α , β (zapalne białka makrofagów), nonELR — rodzaj chemokin α (CXC) nie zawierają

Contents:

- I. Introduction
- II. Chemokines and their receptors
- III. Chemokine receptors binding HIV-1 virus
- IV. Role of chemokine receptor in AIDS therapy
- V. Concluding remarks

rająca tripeptydu (Glu, Leu, Arg) na N-końcu łańcucha polipeptydowego, R5 — monocyto/makrofagotropowe szczepy wirusa HIV-1, RANTES — (czynnik chemotaktyczny wydzielany przez aktywowane limfocyty T), R5X4 — duotropowe szczepy wirusa HIV-1, SDF-1 — (ang. *stromal cell — derived factor 1*), T-22 — syntetyczny peptyd stanowiący analog domeny czynnika transkrypcyjnego TAT, TAT — czynnik transkrypcyjny wirusa HIV-1, vMIP — II (ang. *viral macrophage inflammatory protein II*), VS pęcherzykowe zapalenie jamy ustnej (ang. *vesicular stomatitis*), X4 — limfocytotropowe szczepy wirusa HIV-1.

I. Wprowadzenie

Cytokiny to peptydy lub białka o małej masie cząsteczkowej biorące udział w międzykomórkowym przekazywaniu informacji oraz utrzymaniu homeostazy w organizmie. Ze względu na ich działanie wyróżniamy: interleukiny, interferony, czynniki wzrostu, czynniki chemotaktyczne i czynniki martwicy nowotworów. Podobieństwa w strukturze trzeciorzędowej pozwalają uznać za cytokiny także interleukiny 1, hematopoetynę, czynnik martwicy nowotworów, transformujący czynnik wzrostu- β i transformujący czynnik wzrostu- α .

W ostatnich latach wykryto w materiale biologicznym wiele małych cząsteczkowych białek (masa cząsteczkowa od 8 do 12kD) o podobnej strukturze trzeciorzędowej, które zaliczono do rodziny chemokin. Wiążą się one ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek układu odpornościowego powodując ich proliferację i różnicowanie oraz przy-

ciąganie do ognisk zapalnych (chemotaksję) [1-5]. Wykazano, że receptory chemokin odgrywają ważną rolę w procesie infekcji wirusem HIV-1 (wirusem nabytego zespołu upośledzonej odporności), wywołującym AIDS.

Stwierdzono, że występujące na powierzchni komórek układu odpornościowego białko CD4 będące antygenem różnicowania limfocytów T oraz niektóre receptory wiążą się podczas infekcji z glikoproteiną gp120 otoczki wirusa HIV-1 [6-8].

Odkrycie udziału receptorów chemokin w infekcji komórek wirusem HIV-1, otworzyło nowe perspektywy leczenia AIDS. Pomimo ukazania się prac opisujących funkcje chemokin i ich receptorów, nadal brak jest opracowań dotyczących możliwości ich wykorzystania w terapii AIDS [2-4]. W niniejszej pracy podjęto próbę podsumowania stanu wiedzy na temat udziału receptorów chemokin w infekcji komórek wirusem HIV-1 oraz ich funkcji w leczeniu AIDS.

II. Chemokiny i ich receptory

Charakterystyczną cechą struktury chemokin jest obecność w łańcuchu polipeptydowym czterech reszt cysteiny (C) tworzących dwa wewnątrz-

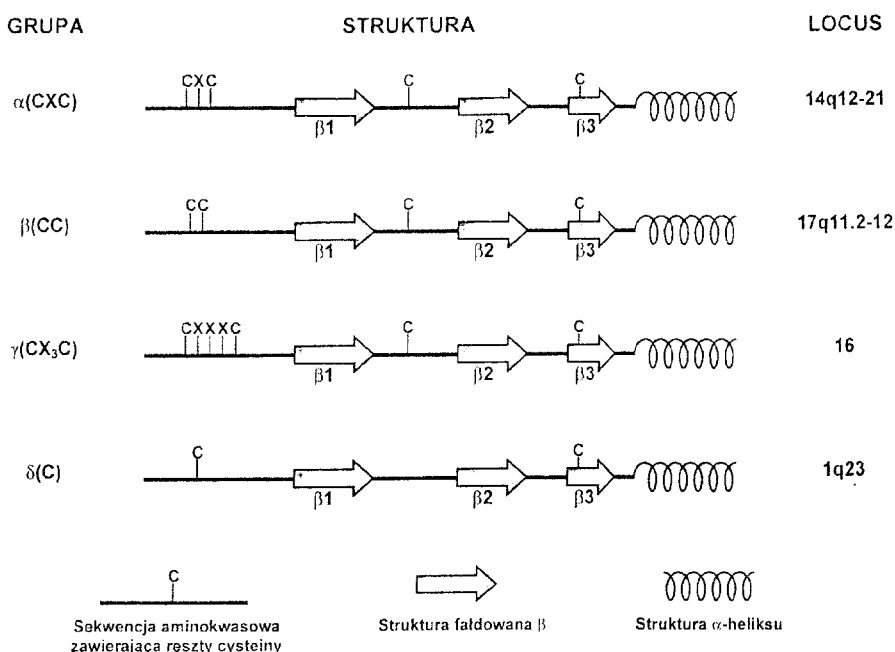
równoległych struktur β (β_1 , β_2 , β_3), rozdzielone dwiema resztami C (Ryc. 1). Na końcu karboksylowym cząsteczki natomiast występuje struktura α -helisy (Ryc. 1) [9, 10].

Klasyfikacja chemokin, wyróżniająca cztery grupy: α (CXC), β (CC), γ (CX₃C) i δ (C), opiera się głównie na liczbie reszt aminokwasów znajdujących się pomiędzy dwiema resztami cysteiny N-końca (Ryc. 1) [3, 11, 12].

1. Polipeptydy grupy α (CXC) zawierają dwie pierwsze cysteiny N-końca rozdzielone jedną resztą aminokwasową. W grupie tej rozróżniamy dwa rodzaje chemokin: *ELR* zawierająca tripeptyd (Glu, Leu, Arg) pomiędzy N-końcową resztą aminokwasową a pierwszą resztą Cys oraz *nonELR* nie zawierająca tego motywu [3, 11, 12]. Chemokiny grupy α (CXC) przyciągają do miejsc zapalnych niektóre komórki, zwłaszcza neutrofile, limfocyty T, monocyty i komórki NK.

2. Występowanie obok siebie dwóch nierozdzielonych reszt cysteiny N-końca łańcucha polipeptydowego jest cechą charakterystyczną chemokin grupy β (CC).

Cząsteczki te indukują migrację głównie monocytów i limfocytów T, jak również bazofili, eozynofili i komórek NK do miejsc zapalnych [3].



Ryc. 1. Schemat struktury i lokalizacja genów chemokin zaliczanych do poszczególnych podrodzini. Chemokiny zawierają na N-końcu trzy regiony o strukturze fałdowej: β_1 β_2 i β_3 rozdzielone resztami cysteiny (C), a na końcu karboksylowym region o strukturze α -helisy. W zależności od liczby reszt aminokwasów, pomiędzy dwiema resztami cysteiny na N-końcu chemokiny wyróżniamy grupy: α (CXC), β (CC) i γ (CX₃C). Wyjątek stanowi podrodzina δ (C), która na N-końcu zawiera tylko jedną resztę cysteiny.

cząsteczkowe wiązania dwusiarczkowe, nadające im strukturę trzeciorzędową warunkującą ich aktywność biologiczną (Ryc. 1). Na N-końcu cząsteczki znajdują się dwie reszty C oraz trzy regiony przeciw-

3. Przedstawicielem grupy γ (CX₃C) jest fraktalkina zawierająca w łańcuchu polipeptydowym dwie pierwsze reszty cysteiny N-końca rozdzielone trzema resztami aminokwasowymi. Fraktalkina jest inte-

gralną glikoproteiną błon komórkowych wiążącą monocyty, limfocyty T, neutrofile oraz komórki NK [3].

4. Przedstawicielem grupy δ (C) jest limfotaktyna różniąca się od innych grup chemokin obecnością tylko jednej reszty cysteiny na N-końcu łańcucha polipeptydowego. Limfotaktyna indukuje przyciąganie do miejsc zapalnych limfocytów CD4 [3].

Receptorami chemokin są białka zawierające siedem polipeptydowych segmentów przezbłonowych, sprzężone z białkami G. Według nazewnictwa ujednoliconego w 1996 r. receptory, które wiążą chemokiny CXC, zaliczono do grupy CXCR, natomiast oddziaływujące z chemokinami CC do grupy CCR [13, 14].

Receptory te charakteryzują się małą specyficznością, gdyż jak wykazano, ten sam receptor może wiązać różne chemokiny należące do tej samej grupy, jak i receptory stanowiące grupę mogą być aktywowane przez tą samą chemokinę. Chemokiny aktywujące receptory CXCR nie wiążą się z receptorami CCR. Wyjątkiem jest występujący na powierzchni krwinek czerwonych oraz komórek śródbłonna naczyń postkapilarnych antygen Duffy, znany także jako DARC (*Duffy Antigen/Receptor for Chemokines*), wykazujący duże powinowactwo zarówno do chemokin grup: α (CXC) jak i β (CC). Wydaje się, że funkcjonuje on również jako „bufor chemokinowy” kontrolujący stężenie chemokin w osoczu krwi [15-17].

III. Receptory chemokin wiążące wirusa HIV-1

Głównymi komórkami docelowymi wirusa HIV-1 są limfocyty CD4 oraz monocyty i makrofagi [2]. Ze względu na rodzaj infekowanych komórek wyróżnia się następujące wirusy HIV-1:

1. Limfocytotropowe infekujące limfocyty CD4 oraz komórki ustalonych linii białaczkowych T, nie infekujące natomiast monocytów i makrofagów [18].

2. Monocyto/makrofagotropowe infekujące monocyty i makrofagi oraz limfocyty CD4, a nie infekujące komórek ustalonych linii białaczkowych T [18].

3. Duotropowe wykazujące cechy limfocytotropowych i monocyto/makrofagotropowych wirusów i infekujące zarówno monocyty i makrofagi, jak i komórki ustalonych linii białaczkowych pochodzących od limfocytów T [18].

Zauważono, że komórki izolowane z organizmów zwierząt nie należących do naczelnych, transfekowane cDNA białka CD4 nie dają się infekować

HIV-1, co sugeruje występowanie na powierzchni komórek docelowych dodatkowych białek (koreceptorów), które wspólnie z białkiem CD4 wiążą HIV-1 [2]. W roku 1996 odkryto, że receptory chemokin CXCR4 i CCR5 są koreceptorami wirusa HIV-1. Wykazano również, że infekcja wirusami limfocytotropowymi (X4) wymaga obecności na powierzchni komórek docelowych białka CD4 i receptora chemokin CXCR4, natomiast białko CD4 i receptor chemokin CCR5 konieczne są do infekcji komórek docelowych wirusami monocyto/makrofagotropowymi (R5) [19, 20]. Wirusy duotropowe (R5X4) wykorzystują do infekcji komórek docelowych oprócz białka CD4 następujące receptory chemokin: CCR2B, CCR3 oraz CCR8 (Tabela 1) [21].

Zaobserwowano, że infekcja komórek docelowych HIV-2 wymaga wyłącznie receptora CXCR4 co potwierdziło rolę receptorów chemokin w infekcji HIV [22].

Uważa się, że wirusy R5 odpowiedzialne są za infekcję organizmu człowieka, natomiast wirusy X4 za progresję AIDS [23]. Receptor chemokin CCR5 występuje na ogół na powierzchni limfocytów CD4 pamięci immunologicznej ($CD45RA^+/CD45RO^+$ i $CD26^+$) a receptor CXCR4 na powierzchni komórek limfocytów CD4 dziewiczych ($CD45RA^+/CD45RO^-$ i $CD26^-$) co może świadczyć o ich różnej roli w progresji AIDS [24]. W Tabeli 1 zestawiono zidentyfikowane receptory chemokin wiążące wirusa HIV.

Odkrycie koreceptorów HIV-1 umożliwiło dokładniejsze określenie mechanizmu wiązania się wirusa z komórkami docelowymi. Obecnie uważa się, że HIV-1 wiąże się z białkiem CD4 za pomocą gp 120. Przyłączenie się wirusa prowadzi do określonych zmian konformacji regionów gp120 oznaczonych V1/V2 i V3. Zmiany konformacyjne regionu V3 prowadzą do ekspozycji ukrytych sekwencji, które wiążąc się z odpowiednim receptorem chemokin prowadzą do połączenia hydrofobowej glikoproteiny gp41 z błoną komórkową i ostatecznie do fuzji wirusa z komórką docelową (Ryc. 2) [25].

IV. Rola koreceptorów wirusa HIV-1 w terapii AIDS

Odkrycie koreceptorów wirusa HIV-1, odpowiedzialnych za fuzję wirusów HIV-1 z komórkami docelowymi, stworzyło nowe możliwości leczenia AIDS. Jedną z metod jest obniżenie ilości koreceptorów wirusa HIV-1 na powierzchni komórek docelowych (Tabela 2, Ryc. 3). Wykazano, że inkubacja limfocytów CD4 z przeciwciałami anti-CD28 i anti-CD3 prowadzi do zmniejszenia ilości transkryptu

Tabela 1

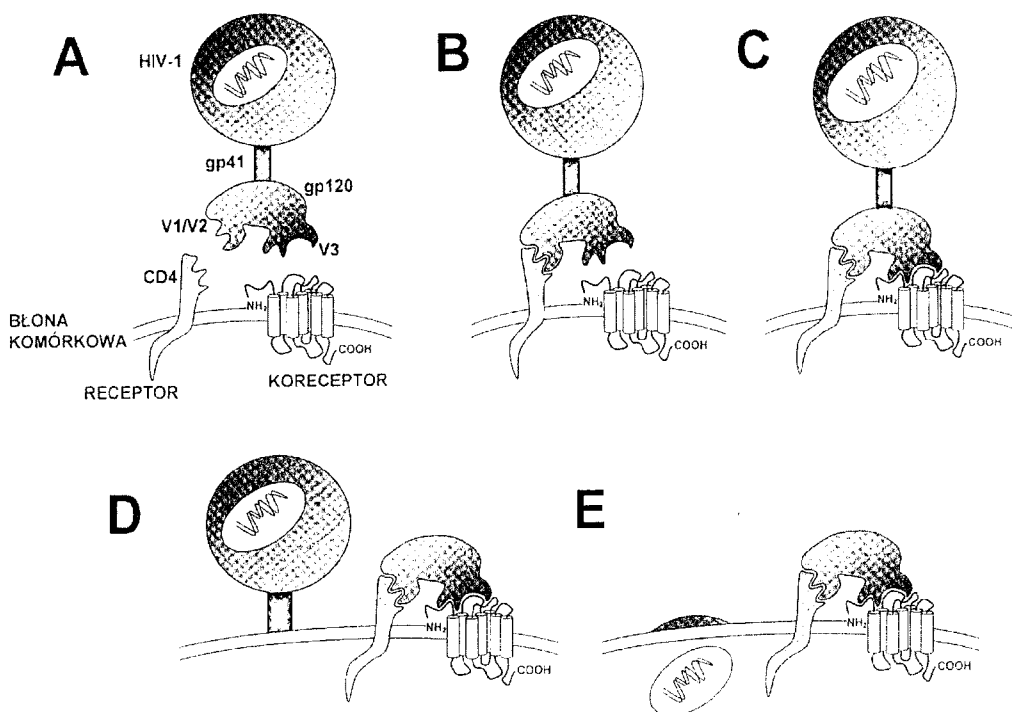
Udział receptorów chemokin w infekcji komórek docelowych. Zestawienie receptorów chemokin biorących razem z białkiem CD4 udział w infekcji komórek docelowych wirusami HIV-1. W pierwszej kolumnie umieszczono receptory chemokin, w drugiej przynależność chemokin do określonej grupy, w trzeciej chemokiny wiążące się z danym receptorem chemokin, w czwartej wirusy HIV, w piątej piśmiennictwo

| Receptor chemokin | Podrodzina chemokin | Chemokina | Wirus | Piśmiennictwo |
|-----------------------|---------------------|--|----------------|---------------|
| CXCR4 | α | SDF1 | X4,R5X4 | [3] |
| CCR2 | β | MCP-1,MCP-2, MCP-3 | R5X4 | [21] |
| CCR3 | β | RANTES, MIP-1 α , MCP-3, MCP-4 | R5X4 | [21] |
| CCR5 | β | RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β | R5,R5X4, HIV-2 | [4] |
| CCR8 | | I-309 | R5X4,HIV-2 | [26] |
| BOB/GPR-15 | ? | ? | R5X4 | [27, 28] |
| V28/CX3CR | γ | Fraktalkina | R5X4,HIV-2 | [29] |
| STRL33/BONZO | ? | ? | R5X4 | [27] |
| U28 (cytomegalowirus) | β | RANTES, MIP-1 α , MCP-1 | R5X4 | [30] |

geny i produktu białkowego *CCR5* na powierzchni limfocytów CD4 [31, 32]. Podanie chorym autologicznych limfocytów stymulowanych przeciwciałami anty-CD28 i anty-CD3 doprowadziło do

wpływać na zwiększenie ich zawartości u osób chorych [31-33].

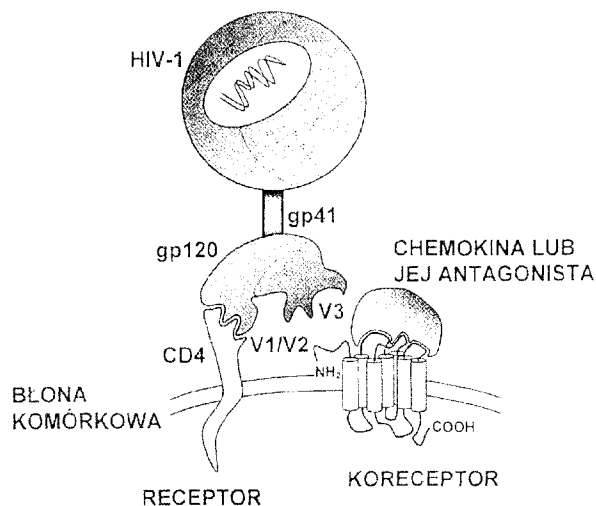
Innym podejściem w leczeniu AIDS jest zastosowanie ekspresji cytoplazmatycznych ligandów (in-



Ryc. 2. Oddziaływanie HIV-1 z komórką docelową. HIV-1 wiąże się z białkiem CD4 na powierzchni komórki docelowej poprzez gp120 (A-B). Wiązanie to zmienia konformację regionów V1/V2 gp 120, co prowadzi do zmiany konformacji regionu V3 i ekspozycji reszt aminokwasowych wiążących się z koreceptorem (C). Konsekwencją zmian konformacyjnych jest odłączenie hydrofobowej gp41 od gp120 i związanie jej z błoną komórkową (D) oraz fuzja wirusa z komórką docelową (E).

zmniejszenia zawartości cząstek wirusowych w osoczu krwi. Niższa zawartość wirusa stwarzała mniejsze zagrożenie infekcją limfocytów CD4 co mogło

trakin), które mogą wiązać się z receptorami chemokin *CCR5* i *CXCR4* w komórkach docelowych wirusa HIV-1, a takie kompleksy mogą w siateczce śród-



Ryc. 3. Możliwości wykorzystania koreceptorów HIV-1 w terapii AIDS. HIV-1 wykorzystuje receptory chemokin jako cząsteczki umożliwiające fuzję z komórkami docelowymi. Zablokowanie koreceptora za pomocą związku o budowie podobnej do chemokin lub cząsteczki zawierającej reszty aminokwasów o sekwencji przypominającej kolejność aminokwasów regionu V3 gp120, uniemożliwia fuzję wirusa z komórką docelową.

plazmatycznej ulegać enzymatycznej hydrolizie. Skonstruowano wektory zawierające zmodyfikowany cDNA chemokin: RANTES i SDF-1, których

Tabela 2

Receptory chemokin wykorzystywane w terapii AIDS. W pierwszej kolumnie umieszczono sposoby leczenia AIDS, w drugiej kolumnie przedstawiono mechanizmy terapii, w trzeciej docelowy receptor chemokin, w czwartej stopień zaawansowania w leczeniu.

| Strategia terapii | Mechanizm terapii | Cząsteczka docelowa | Etap badań |
|---|---|---|---|
| Immunoterapia | Przeciwciała monoklonalne | CCR5, CXCR4 | przedkliniczne |
| Odbudowa układu odpornościowego | Endocytoza koreceptorów CCR5 | CCR5 | kliniczne |
| Hamowanie fuzji wirusa HIV-1 z komórką docelową | met-RANTES AOP-RANTES T-22 ALX40-4C | CCR5 CCR5 CXCR4 CXCR4 | przedkliniczne przedkliniczne przedkliniczne przedkliniczne |
| Cząsteczki niepeptydowe hamujące fuzję wirusa HIV-1 | AMD3100 | CXCR4 | przedkliniczne |
| Terapia genowa | Rybozomy Intrakiny Antysensowy RNA Cytoplazmatyczne łańcuchy przeciwciał | CCR5, CXCR4 CCR5, CXCR4 CCR5, CXCR4 CCR5, CXCR4 CCR5, CXCR4 | przedkliniczne przedkliniczne konceptja konceptja konceptja |

białkowe produkty ekspresji wykazują właściwości intrakiny. Limfocyty CD4 transfekowane takimi wektorami produkują zmodyfikowane RANTES i SDF-1, łączące się w cytoplazmie z receptorami chemokin. Hydroliza kompleksów tych chemokin i ich receptorów uniemożliwia nie tylko migrację cząste-

czek CCR5 i CXCR4 na powierzchnię komórki ale również infekcję limfocytów CD4 wirusami R5 lub X4 [34, 35].

Komórki replikujące wirusa HIV-1 można także transfekować wektorami zawierającymi zmodyfikowany cDNA przeciwciał (intraprzeciwciał). Cząsteczki intraprzeciwciał pozostają w cytoplazmie, gdzie wiążąc białka wirusa zapobiegają jego dojrzewaniu [36-38]. Zwrócono również uwagę na możliwość wiązania się „intraprzeciwciał” z receptorami chemokin w cytozolu, co zapobiega infekcji komórek docelowych wirusem HIV-1 [36-39].

W terapii AIDS można też użyć cząsteczek RNA (rybozymów) specyficznie rozcinających RNA. Rybozomy po raz pierwszy wykorzystano do enzymatycznego trawienia sekwencji RNA gag wirusa HIV-1 [40] ale można ich także użyć do trawienia RNA receptora chemokin CCR5, co zapobiega infekcji komórek docelowych [33].

Do celów terapeutycznych próbuje się również użyć RNA antysensowny wobec mRNA CCR5 i CXCR4 [40]. Zaobserwowano, że komórki linii COS posiadające na powierzchni cząsteczki CXCR4 i CD4 inkubowane z RNA antysensownym wobec mRNA CXCR4 nie ulegały infekcji wirusami HIV-1 [41].

Pomyślne próby leczenia AIDS przeciwciałami neutralizującymi wirusa HIV-1 zwróciły uwagę na możliwość zastosowania ich w wiązaniu z domenami zewnątrzkomórkowym receptorów CCR5 i CXCR4 [42]. Wyprodukowane w mysie przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorom CXCR4 i

CCR5, oznaczono odpowiednio symbolami 12G5 i 2D7 [22, 43]. Przeciwciała 2D7 blokuje wiązanie i chemotaksję indukowaną chemokinami RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β oraz infekcję komórek docelowych niektórymi wirusami R5 i R5X4 [43].

Wykazano również, że komórki zainfekowane HIV-1 eksponujące na powierzchni wirusowe gp120 można niszczyć przy pomocy „wektorów zabójców”.

Do konstrukcji takich wektorów użyto zmienione genetycznie wirusy wścieklizny oraz pęcherzykowego zapalenia błony śluzowej jamy ustnej (VS). Zmodyfikowane wirusy zawierają w osłonce lipidowej cząsteczki CD4 i CXCR4, pozwalające na wiązanie się z gp120 obecną na powierzchni limfocytów, co prowadzi do śmierci zainfekowanych komórek [44-46]. Rozważa się również możliwość eliminacji zakażonych limfocytów, poprzez wiązanie cząsteczek CD4, CCR5 lub CXCR4 połączonych z toksynami do eksponowanej na powierzchni komórek gp120 [22].

Zwiększoną oporność na infekcje HIV-1 można uzyskać wykorzystując hamowanie transdukcji sygnału przez receptor CCR5 (ang. *down regulation*) wywołanej podaniem zmodyfikowanych chemokin met-RANTES i AOP-RANTES [47, 48,]. Met-RANTES powstaje przez dodanie reszty metioniny do N-końca chemokiny RANTES natomiast AOP-RANTES uzyskano przyłączając aminooksypentan do N-końcowej reszty aminokwasowej chemokiny. Zmienione w ten sposób chemokiny są antagonistami naturalnych chemokin-hamują infekcję komórek docelowych wirusami R5 oraz nie wykazują właściwości chemotaktycznych. Na przykład (AOP)-RANTES hamuje infekcje monocytów, makrofagów oraz limfocytów CD4 szczepami wirusów R5 [48-50].

Odkryto również, że peptyd LGASWHRP-DKCLGYQKRPLP stanowiący fragment N-końca chemokiny vMIP-II (ang. *viral macrophage inflammatory protein-II*) wiąże się z receptorem CXCR4 i hamuje infekcję komórek docelowych wirusami X4 i R5X4 [49]. Wydaje się, że peptyd taki podawany dożylnie mógłby ograniczać replikację wirusów X4 u osób z pełnoobjawowym AIDS. Peptyd T-22, składający się z 18 reszt aminokwasowych, wyizolowany z krwinek ostrogonu (*Limulus polyphemus*) oraz syntetyczny peptyd ALX40-4C-stanowiący fragment czynnika transkrypcyjnego TAT wirusa HIV-1 hamują *in vitro* fuzję wirusów X4 z komórką docelową. Na etapie badań przedklinicznych sprawdza się skuteczność podawania cząsteczek T-22 i ALX40-4C [51, 52]. Bada się również hamo-

wanie infekcji komórek docelowych niebiałkowymi związkami chemicznymi. Wiadomo np że AMD3100 (fenylobis(metyleno)-bis-(1,4,8,11-tetraazocyclootetradekan) wiąże się z koreceptorem CXCR4, hamuje fuzję wirusów X4 z komórką docelową, a także blokuje wiązanie SDF-1 z CXCR4 i chemotaksję komórek docelowych [53,54]. Badania farmakokinetyczne podanego ludziom dożylnie lub doustnie AMD 3100 dały pomyślne rezultaty [53, 54]. Obecnie związek ten jest sprawdzany w II fazie badań klinicznych na pacjentach z AIDS [53, 54].

V. Uwagi końcowe

W artykule krótko opisano budowę chemokin i funkcje odpowiadających im receptorów w infekcji komórek docelowych wirusem HIV-1 oraz omówiono możliwości ich wykorzystania w terapii AIDS. Starano się przedstawić najnowsze poglądy na mechanizm infekcji komórek docelowych wirusem HIV-1, dlatego pominięto wiele szczegółów dotyczących charakterystyki chemokin umieszczonych we wcześniejszych pracach poglądowych [5-7].

Wirus HIV-1 podczas infekcji wiąże się z białkiem CD4 i z odpowiednim receptorem chemokin: CXCR4, CCR5, CCR3 lub CCR2B, pozwoliło to wyróżnić następujące szczepy wirusa: X4, R5, R5X4 (Tabela 1). Receptory chemokin używane przez HIV-1 do fuzji z komórką docelową stały się elementem, który może być wykorzystany w leczeniu AIDS (Tabela 2). Opisane metody polegają na zmniejszeniu ilości receptorów chemokin, albo wiązaniu do nich, w sposób kompetycyjny, związków organicznych lub nieorganicznych blokujących fuzję HIV-1 z komórką docelową (Ryc. 3). Uniemożliwienie fuzji wirusa może wspomagać działanie inhibitorów odwrotnej transkryptazy i wirusowej proteazy, używanych w terapii AIDS.

Podziękowania

Dziękuję pani prof. dr hab. Halinie Karoń, panu prof. dr hab. Wiesławowi H. Trzeciakowi za cenne uwagi krytyczne oraz lekarzowi medycyny Mariuszowi Łacińskiemu za pomoc w wykonaniu rycin. Praca finansowana z grantu KBN 4 P05B4315 oraz projektu badawczego 501-1-08-05.

Artykuł otrzymano 19 czerwca 2000 r.

Zaakceptowano do druku 17 stycznia 2001 r.

Piśmiennictwo

1. Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, Van Damme J, Valitutti S, Lanzavecchia A (1995) *J Immunol* **155**: 3292-3295

2. Zieliński T M, Wachowicz B (1999) *Postępy Biologii Komórki* 26: 759-774
3. Waśniowska K (1999) *Post Hig Med Dośw* 53: 583-600
4. Piasecki E (1999) *Problemy HIV i AIDS* 5: 69-74
5. Oppenheim J J, Zachariae C O, Mukaida N, Matsushima K (1991) *Annu Rev Immunol* 9: 617-648
6. Sattentau Q J, Clapham P R, Weiss R A, Beverley P C, Montagnier L, Alhalabi M F, Gluckmann J C, Klatzmann D (1988) *AIDS* 2: 101-105
7. Feng Y, Broder C C, Kennedy P E, Berger E A (1996) *Science* 272: 872-277
8. Alkhatib G, Combadiere C, Broder C C, Feng Y, Kennedy P E, Murphy P M, Berger E (1996) *Science* 272: 1955-1958
9. Ernst C A, Zhang Y J, Hancock P R, Rutledge B J, Corless C L, Rollins B J (1994) *J Immunol* 152: 3541-3549
10. Kelner G S, Kennedy J, Bacon K B, Kleyensteuber S, Largaespada D A, Jenkins N A, Copeland N G, Bazan J F, Moore K W, Schall T J (1994) *Science* 266: 1395-1399
11. Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M, Moser B (1991) *J Biol Chem* 266: 23128-23134
12. Hebert C A, Vitangcol R V, Baker J B (1999) *J Biol Chem* 266: 18989-18994
13. Lyman S D (1995) *Int J Hematol* 62: 63-73
14. Lyman S D, Brasel ?, Rousseau A M, Williams D E (1994) *Stem Cells* 12: 99-110
15. Neote K, Darbonne W, Ogez J, Horuk R, Schall T J (1993) *J Biol Chem* 268: 12247-12249
16. Neote K, DiGregorio D, Mak J Y, Horuk R, Schall T J (1993) *Cell* 72: 415-425
17. Horuk R, Chitnis C E, Darbonne W C, Colby T J, Rybicki A, Hadley T J, Miller L H (1993) *Science* 261: 1182-1184
18. Hwang S S, Boyle T J, Lysterly H K, Cullen B R (1992) *Science* 257: 535-537
19. Feng Y, Broder C C, Kennedy P E, Berger E A (1996) *Science* 272: 872-277
20. Alkhatib G, Combadiere C, Broder C C, Feng Y, Kennedy P E, Murphy P M, Berger E (1996) *Science* 272: 1955-1958
21. Doranz B J, Rucker J, Yi Y, Smyth R J, Samson M, Peiper S C, Parmentier M, Collman R G, Doms R W (1996) *Cell* 85: 1149-1158
22. Endres M J, Clapham P R, Marsh M, Ahuja M, Turner J D, McKnight A, Thomas J F, Stoebe-nau-Haggarty B, Choe S, Vance P J, Wells T N, Power C A, Sutterwala S S, Doms R W, Landau N R, Hoxie J A (1996) *Cell* 87: 745-756
23. Connor R I, Sheridan K E, Ceradini D, Choe S, Landau N R (1997) *J Exp Med* 185: 621-628
24. Bleul C C, Wu L, Hoxe A J, Springer A T, Mackay R C (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1925-1930
25. Kristiansen T B, Knudsen T B, Eugen-Olsen J (1998) *Scand J Immunol* 48: 339-346
26. Tiffany H L, Lautens L L, Gao J L, Pease J, Locati M, Combadiere C, Modi W, Bonner T I, Murphy P M (1997) *J Exp Med* 186: 165-170
27. Pohlmann S, Krumbiegel M, Kirchhoff F (1999) *J Gen Virol* 80: 1241-1251
28. Farzan M, Farzan M, Choe H, Martin K, Marcon L, Hofmann W, Karlsson G, Sun Y, Barrett P, Marchand N, Sullivan N, Gerard N, Gerard C, Sodroski J (1997) *J Exp Med* 186: 405-411
29. Rucker J, Edinger A L, Sharron M, Samson M, Lee B, Berson J F, Yi Y, Margulies B, Collman R G, Doranz B J, Parmentier M, Doms R W (1997) *J Virol* 71: 8999-9007
30. Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alison M (1997) *Science* 276: 1874-1878
31. Levine B L, Mosca J D, Riley J L, Carroll R G, Vahey M T, Jagodzinski L L, Wagner K F, Mayers D L, Burke D S, Weislow O S, St Louis D C, June C H (1996) *Science* 272: 1939-1943
32. Carroll R G, Riley J L, Levine B L, Feng Y, Kausshal S, Ritchey D W, Bernstein W, Weislow O S, Brown C R, Berger E A, June C H, St Louis D C (1997) *Science* 276: 273-276
33. Cairns J S, M. P. D'Souza (1998) *Nature Med* 4: 563-568
34. Chen J D, Bai X, Yang A G, Cong Y, Chen S Y (1997) *Nature Med* 3: 1110-1116
35. Yang A G, Bai X, Huang X F, Yao C, Chen S Y (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11567-11572
36. Chen J D, Yang Q, Yang A G, Marasco W A, Chen S C (1996) *Human Gene Ther* 7: 1515-1525
37. Marasco W A, Haseltine W A, Chen S Y (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7889-7893
38. Inouye R T, Du B, Boldt-Houle D, Ferrante A, Park I W, Hammer S M, Duan L, Groopman J E, Pomerantz R J, Terwilliger E F (1997) *J Virol* 71: 4071-4078
39. Duan L, Bagasra O, Laughlin M A, Oakes J W, Pomerantz R J (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5075-5079
40. Sarver N, Cantin E M, Chang P S, Zaia J A, Ladne P A, Stephens D A, Rossi J (1990) *Science* 247: 1222-1225
41. Kusunoki A, Wada A, Kurosaki N, Kimura T, Takai K, Yamamoto N, Takaku H (1999) *Nucleosides Nucleotides* 18: 1705-1708
42. Hinkula J, Bratt G, Gilljam G, Nordlund S, Bro-liden P, Holmberg V, Olausson-Hansson E, Albert J, Sandstrom E, Wahren B (1994) *J Acquir Immune Defic Syndr* 7: 940-951
43. Wu L, LaRosa G, Kassam N, Gordon C J, Heath H, Ruffing N, Chen H, Humblis J, Samson M, Parmentier M, Moore J P, Mackay C R (1997) *J Exp Med* 186: 1373-1381
44. Mebastion T, Finke S, Weilend F, Conzelmann K K (1997) *Cell* 90: 841-847
45. Schnell M J, Johnson J E, Buonocore L, Rose J K (1997) *Cell* 90: 849-857
46. Endres M J, Jaffer S, Haggarty B, Turner J D, Doranz B J, O'Brien P J, Kolson D L, Hoxie J A (1997) *Science* 278: 1462-1464
47. Arenzana-Seisdedos F, Virelizier J L, Rousset D, Clark-Lewis I, Loetscher P, Moser B, Baggiolini M (1996) *Nature* 383: 400-402
48. Simmons G, Clapham P R, Picard L, Offord R E, Rosenkilde M M, Schwartz T W, Buser R, Wells T N C, Proudfoot A E (1997) *Science* 276: 276-279
49. Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, Chen D, Wei Y, Isdell F, O'Doherty U, Paxton W, Koup R, Mojssov S, Bhardwaj N, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Steinman R M (1996) *J Exp Med* 184: 2433-2438
50. Zhou N, Luo Z, Luo J, Hall J W, Huang Z (2000) *Biochemistry* 39: 3782-3787
51. O'Brien W A, Sumner-Smith M, Mao S H, Sade-ghi S, Zhao J Q, Chen I S (1996) *J Virol* 70: 2825-2831
52. Tamamura H., Imai M., Ishihara T, Masuda M, Funakoshi H, Oyake H, Murakami T, Arakaki R, Nakashima H, Otaka A, Ibuka T, Waki M, Matsumoto A, Yamamoto N, Fujii N (1998) *Bioorg Med Chem* 6: 1033-1041
53. Arakaki R, Tamamura H, Premanathan M, Kanbara K, Ramanan S, Mochizuki K, Baba M, Fujii N, Nakashima H. (1999) *J Virol* 73: 1719-1723
54. Hendrix C W, Flexner C, MacFarland R T, Gian-donico C, Fuchs E J, Redpath E, Bridger G, Henson G W (2000) *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1667-1673

Rodzicielskie piętno genomowe w zespole Pradera-Williego

Genomic imprinting in Prader-Willi syndrome

AGNIESZKA SZPECHT-POTOCKA

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Modyfikacje DNA
- III. Zespół Pradera-Williego (PWS) — model w badaniu rodzicielskiego piętna genomowego u człowieka
 - III-1. Obraz kliniczny PWS
 - III-2. Defekty odpowiedzialne za PWS
 - III-3. Geny odpowiedzialne za prawidłową funkcję PWCR
 - III-3.1. Gen *SNRPN*
 - III-3.2. Gen *IPW*
 - III-3.3. Gen *NDN*
 - III-4. Mutacje regulatorowe odpowiedzialne za zaburzenie rodzicielskiego piętna genomowego (GI) w PWS
- IV. Region IC
- V. Hipotetyczne mechanizmy ustanawiania wzoru GI w liniach komórek płciowych
- VI. Konsekwencje zaburzenia wzoru GI w regionie 15q
- VII. Postępowanie diagnostyczne w PWS
- VIII. Mutacje regulatorowe a ryzyko genetyczne
- IX. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. DNA modification
- III. Prader-Willi syndrome (PWS) — the model of genomic imprinting research in humans
 - III-1. Clinical symptoms of PWS
 - III-2. Molecular defects in PWS
 - III-3. The genes responsible for correct function of PWCR
 - III-3.1. *SNRPN* gene
 - III-3.2. *IPW* gene
 - III-3.3. *NDN* gene
 - III-4. Imprinting mutations responsible for the disorder of genomic imprinting (GI) in PWS
- IV. IC region
- V. The hipotetic mechanisms of fixing of GI pattern in germ lines
- VI. The consequences of the disorder of GI pattern in the 15q region
- VII. Diagnostic procedure in PWS
- VIII. Imprinting mutations and recurrence risk
- IX. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: AS — zespół Angelmana (ang. *Angelman syndrome*); AS-SRO — minimalny obszar ulegający delecji w AS (ang. *AS the smallest region of deletion overlap*); *BD* — gen regulator ekspresji piętnowanej domeny transkrypcyjnej w PWCR (ang. *Barbel Dittrich gene*); bp — pary zasad (ang. *base pair*); DMR — sekwencja podlegająca specyficznej metylacji DNA zależnej od rodzicielskiego pochodzenia genu (ang. *differentially methylated region*), *DNMT1* — gen kodujący metylotransferazę 1; GI — rodzicielskie piętno genomowe¹ (ang. *genomic imprinting*); IC — centrum piętnowania (ang. *imprinting center*); IM — mutacja regulatorowa rodzicielskiego piętna genomowego (ang. *imprinting mutation*); *IPW* — piętnowany gen zespołu Pradera-Williego (ang. *imprinted Prader-Willi gene*); kb — tysiąc par zasad (ang. *kilo-base pair*); Mb — milion par zasad (ang. *mega-base pair*); mUPD — matczyzna disomia (ang. *maternal disomy*); *NDN* — gen kodujący nektynę (ang. *necdin gene*); ORFs — otwarte ramki odczytu (ang. *open reading frames*); PWCR — region chromosomu 15 związany z zespołem Pradera-Williego (ang. *Prader-Willi chromosome re-*

gion); PWS — zespół Pradera-Williego (ang. *Prader-Willi syndrome*); PWS-SRO — minimalny obszar ulegający delecji w PWS (ang. *PWS the smallest region of deletion overlap*); RFLP — analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*); SIS — miejsce inicjacji przełączenia rodzicielskiego piętna genomowego (ang. *swich initiation site*); *SNRPN* — gen kodujący mały jądrowy polipeptyd N (ang. *small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N gene*); UPD — jednorodzicielska disomia (ang. *uniparental disomy*); XX — żeńska linia komórek rozrodczych; XY — męska linia komórek rozrodczych

Słownik niektórych terminów stosowanych w tekście: Czynniki epigenetyczne — czynniki odpowiedzialne za modyfikacje genomu nie związane ze zmianami sekwencji nukleotydów. Do czynników epigenetycznych zalicza się: metylację DNA, modyfikacje postranslacyjne białek histonowych, strukturę chromatynu, czas i miejsce replikacji DNA. **Epimutacje** — zmiany w zakresie czynników epigenetycznych modyfikujących DNA,

¹W nomenklaturze polskiej dopuszcza się również określenia: piętno genomowe lub też piętnowanie genomowe (na określenie procesu, którego efektem jest ostateczne ustalenie wzoru GI).

których efektem jest ustanowienie niewłaściwego wzoru rodzicielskiego piętna genomowego i nieprawidłowa ekspresja genów podlegających regulacji przez GI. **Jednorodzielska (matczyna lub ojcowska) disomia** — zjawisko polegające na dziedziczeniu obu alleli genu lub obu chromosomów tej samej pary tylko od jednego z rodziców. Wyróżnia się heterodisomię, w której dwa różne allele genu dziedziczone są od jednego rodzica, oraz izodisomię, w której od matki lub ojca dziedziczony jest jeden allel podlegający następnie podwojeniu. **Matczynie lub ojcowskie piętno genomowe** — ekspresja tylko ojcowskich lub matczyńskich kopii genu (domeny, regionu, chromosomu). **Matczyny lub ojcowski wzór rodzicielskiego piętna genomowego** — wypadkowa epigenetycznych modyfikacji DNA, specyficznych dla matczynego lub ojcowskiego pochodzenia regionu. **Piętnowany gen (domena, region, chromosom)** — fragment genomu, którego ekspresja jest regulowana przez mechanizm rodzicielskiego piętna genomowego. **Pseudoekson** — „fałszywy” ekson wyznaczony przez miejsca „pseudosplicingowe” charakteryzujące się dużym podobieństwem do konserwowanych sekwencji styku intron/ekson. Powstawanie pseudoeksonów wynika z faktu, że sekwencje styku intron/ekson nie są wystarczające do stałego bezbłędnego rozpoznawania miejsc wycinania intronów w typowych, dużych transkryptach wyższych eukariota.

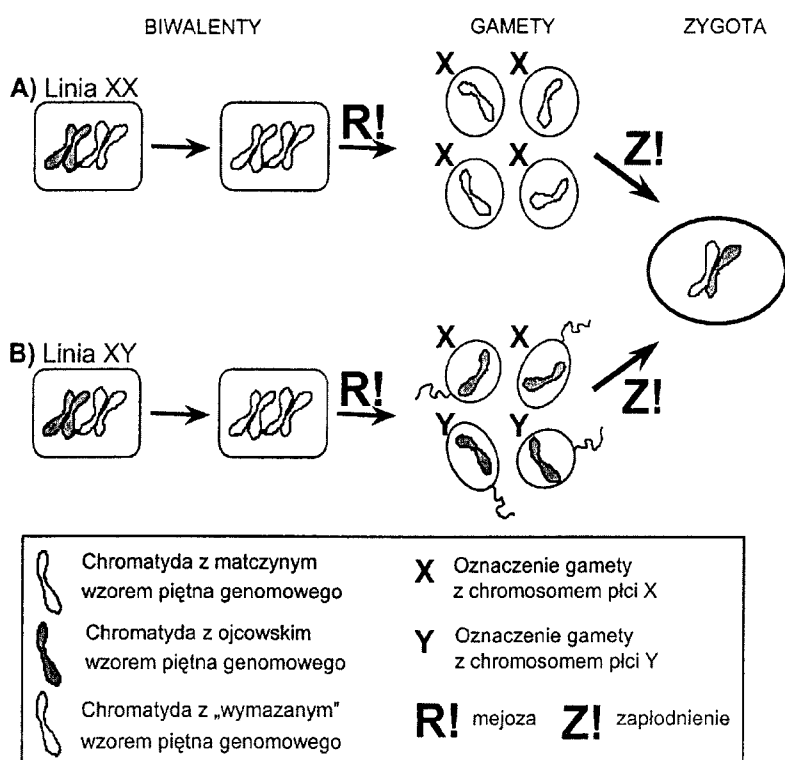
I. Wstęp

Rodzicielskie (matczynie lub ojcowskie) piętno genomowe (GI) jest zjawiskiem polegającym na spe-

nów, zależną od ich rodzicielskiego pochodzenia. Jest to jeden z mechanizmów regulacji ekspresji genów opisany u roślin, owadów i ssaków. Nazwą czynniki epigenetyczne określa się czynniki decydujące o modyfikacjach genomu, innych niż zmiana sekwencji nukleotydów w DNA. Zalicza się do nich metylację DNA, acetylację histonów, samą strukturę chromatyny, oraz kolejność replikacji poszczególnych obszarów genomu [1, 2]. Wypadkową wzajemnych oddziaływań tych czynników jest monoalleliczna (matczyna lub ojcowska) ekspresja genu.

Wzór modyfikacji genomu, stanowiący istotę GI, ustanawiany jest w czasie gametogenezy i wczesnego rozwoju zarodkowego i nie jest przekazywany z pokolenia na pokolenie. Wzór ten jest natomiast specyficzny płciowo, a więc zależny od tego czy jest ustanawiany w czasie spermatogenezy, czy oogenezy.

Mechanizm ustanawiania wzoru rodzicielskiego piętna genomowego jest prawdopodobnie dwuetapowy (Ryc. 1). Najpierw usuwany jest wzór GI charakterystyczny dla komórek somatycznych, a następnie ustanawiany jest wzór specyficzny dla linii komórek rozrodczych, kopiowany w procesie replikacji DNA w komórkach somatycznych. Warunkuje to właściwą



Ryc. 1. Powstawanie wzoru rodzicielskiego piętna genomowego (GI) w liniach rozrodczych. A — W czasie oogenezy (linia XX). B — W czasie spermatogenezy (linia XY).

cyficznej, epigenetycznej modyfikacji genomu powodującej monoalleliczną ekspresję niektórych ge-

organizację informacji genetycznej i, co się z tym wiąże, prawidłowy rozwój organizmu.

II. Modyfikacje DNA

Metylacja jest najczęściej występującą u Eukaryota modyfikacją DNA i polega na enzymatycznym przyłączaniu reszt metylowych (-CH₃) do nukleotydów. Zwykle metylowana jest cytozyna w pozycji 5 (C5) w obrębie dinukleotydowych sekwencji CG. Wzór metylacji DNA ustanawiany jest u ssaków w czasie gametogenezy i wczesnego rozwoju zarodkowego [3, 4]. Po zapłodnieniu, w czasie pierwszych podziałów komórek, dochodzi do całkowitej demetylacji DNA. Następstwem tego są procesy metylacji *de novo*, występujące po implantacji zarodka. Aktywność metylacyjna nie utrzymuje się na jednokowym poziomie przez cały okres rozwoju zarodkowego — np. po gastrulacji ulega obniżeniu [5]. Ostateczny wzór metylacji DNA ustala się w okresie 6-14 tygodnia życia płodowego [2].

Molekularne mechanizmy kierujące demetylacją i metylacją *de novo* specyficznych sekwencji są mało znane [6-10]. Wiadomo jednak, że za procesy metylacji i demetylacji odpowiedzialne są w komórce metylotransferazy DNMT. U człowieka brak aktywnego genu *DNMT1* prowadzi do niekontrolowanej demetylacji genomu, czego konsekwencją jest zaburzenie transkrypcji. Badania nad mysimi mutantami genów *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* wskazują, że do każdorazowej całkowitej demetylacji i metylacji *de novo* wymagana jest obecność enzymów kodowanych przez te geny. Mysz z mutacją w genie *Dnmt3a* lub *Dnmt3b* może remetylować demetylowane, powtarzające się sekwencje CpG. Mysz z defektem w obu genach całkowicie traci aktywność metylowania DNA *de novo*, co prowadzi do śmierci płodu we wczesnym stadium postimplantacyjnym. Prawdopodobnie enzymy *Dnmt3a* i *Dnmt3b* wykazują specyficzność tkankową podczas późniejszych etapów rozwoju zarodka, oraz zmienną aktywność w różnych stadiach rozwojowych [11].

U kręgowców niemetylowane sekwencje CpG stanowią zaledwie 1-2% genomu, tworząc tzw. wyspy CpG [12]. Położone są one preferencyjnie w kierunku 5' od początku genów lub pokrywają się z regionami promotorowymi genów metabolizmu podstawowego i większości genów tkankowo specyficznych [2, 13]. W ich obrębie stwierdza się niewielką gęstość upakowania nukleosomów, wysoki stopień acetylacji histonów korowych H3 i H4, a także niedobór histonu H1, co jest charakterystyczne dla transkrypcyjnie aktywnej chromatyny [14]. Acetylacja histonów jest rodzajem posttranslacyjnej modyfikacji i ważnym elementem rodzicielskiego piętna genomowego tj. elementem regulacji ekspresji infor-

macji genetycznej. Acetylacja powoduje zmianę oddziaływań histonów z DNA [15, 16]. Potencjalnie może być więc również odpowiedzialna za zmianę układu nukleosomów we włóknie chromatyny [17]. Acetylacja histonów korowych, powodując powstawanie specyficznych struktur chromatyny, ułatwia czynnikiem transkrypcyjnym dostęp do matrycy, a tym samym wpływa na aktywność transkrypcyjną występujących w tym obszarze genów [18].

W szczególnych przypadkach wyspy CpG ulegają metylacji, co prowadzi do represji genów, w których występują. Przykładem tego jest metylacja wysp CpG genów regulowanych przez GI [19]. W genach tych metylacji ulegają wyspy CpG tylko jednego z rodzicielskich alleli, czyniąc go nieaktywnym transkrypcyjnie. Sposób, w jaki metylotransferaza wyróżnia wyspy CpG mające ulec metylacji, nie jest znany.

Tkankowo specyficzne oraz zależne od pochodzenia rodzicielskiego wzory metylacji stanowią więc element kontroli ekspresji genów w czasie rozwoju organizmu [20-26]. Związek metylacji DNA z tworzeniem niedostępnej dla czynników regulatorowych konformacji chromatyny, głównie poprzez specyficzne rozmieszczenie białek histonowych w obrębie nukleosomów zawierających metylowane wyspy CpG, decyduje również o kolejności replikacji różnych obszarów DNA [27]. W fazie S podziału komórkowego silnie metylowane, nieaktywne obszary DNA, ze względu na skondensowaną konformację chromatyny, ulegają replikacji później niż regiony aktywnej euchromatyny [2]. Dlatego też w piętnowanych regionach genomu obserwuje się asynchroniczną replikację rodzicielskich alleli [28].

III. Zespół Pradera-Williego (PWS) — naturalny model do badania rodzicielskiego piętna genomowego u człowieka

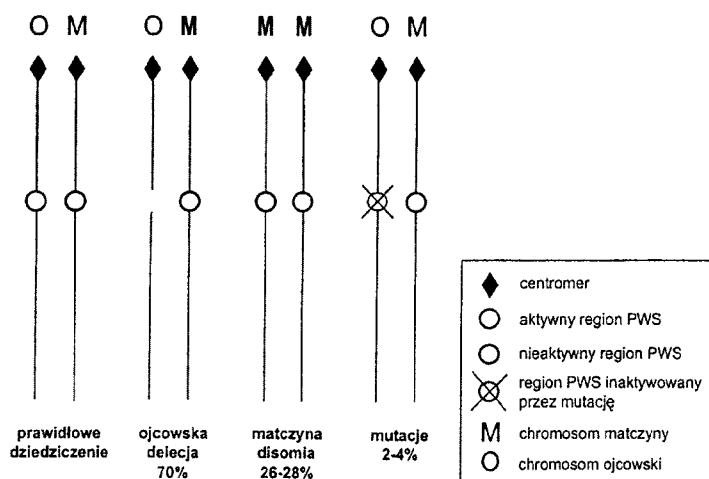
Zespół Pradera-Williego, obok zespołu Angelmana (AS), jest najlepiej poznanym w genetyce człowieka przykładem i zarazem modelem do badania monoallelicznej ekspresji genów uwarunkowanej rodzicielskim piętnem genomowym. Defekty odpowiedzialne za zespół Pradera-Williego dotyczą zaburzeń matczynego piętna genomowego w podcentromerowym regionie q11-13 chromosomu 15 pochodzącego od ojca.

PWS jest wieloukładowym schorzeniem o podłożu genetycznym, w szczególności dotyczącym rozwoju i funkcjonowania układu nerwowego, w tym głównie podwzgórze. Zespół Angelmana, który dotyczy zaburzenia mechanizmu ojcowskiego piętna

genomowego w regionie q11-13 chromosomu 15 pochodzącego od matki, jest chorobą o odmiennym od PWS obrazie klinicznym².

III-1. Obraz kliniczny PWS

PWS charakteryzuje się głęboką hipotonią mięśni i słabym odruchem ssania w okresie noworodkowym, które przeradzają się w nadmierne, a następnie patologiczne łaknienie prowadzące do karykaturalnej otyłości w okresie dziecięcym. Typowym objawem klinicznym zespołu jest także upośledzenie rozwoju umysłowego i emocjonalnego. Przeciętnie



Ryc. 2. Rodzaje i częstość występowania defektów molekularnych w zespole Pradera-Williego (PWS).

50-55% chorych wykazuje upośledzenie umysłowe w stopniu lekkim i umiarkowanym, a u 5% pacjentów jest ono znaczne lub głębokie. U około 30% chorych z PWS iloraz inteligencji kształtuje się na granicy normy, a prawidłowy rozwój umysłowy stwierdza się w 5% przypadków. Wśród cech fenotypowych PWS stwierdza się także hipogenitalizm i hipogonadyzm, niski wzrost, oraz małe dłonie i stopy. Zespół Pradera-Williego jest chorobą rzadką. Częstość występowania szacuje się na 1/ 15 000 żywych urodzeń [29].

III-2. Defekty odpowiedzialne za PWS

Przyczyną PWS jest fizyczny lub funkcjonalny brak regionu 15q11-13 pochodzącego od ojca. Brak fizyczny może być spowodowany delecją ojcowskiej kopii tego regionu (70% przypadków) lub matczyną

disomią (mUPD) chromosomu 15 (26-28% przypadków). Natomiast brak funkcji tego regionu może wynikać z utraty aktywności genów znajdujących się w tym obszarze na skutek mutacji o charakterze regulatorowym (2-4% przypadków) (Ryc. 2). Efektem mutacji regulatorowych (IM) jest zaburzenie wzoru rodzicielskiego piętna genomowego w genach zlokalizowanych w chromosomie ojcowskim w regionie PWS [30].

U osób z zespołem Pradera-Williego stwierdza się także, choć rzadko, inne niż przedstawione wyżej, zmiany cytogenetyczne w regionie 15q11-13. Opisa- no takie rearanżacje jak inwersje, duplikacje, trans-

lokacje oraz dodatkowe małe markery pochodzące z chromosomu 15. Aberracje, w które zaangażowane są inne chromosomy, lub które dotyczą dużych obszarów chromosomu 15, mogą być odpowiedzialne za rodzinne występowanie dużych delecji towarzyszących nieprawidłowościom kariotypu i zwiększone ryzyko powtórzenia choroby w rodzinie. Mogą też wskazywać na wystąpienie rekombinacji somatycznej w chromosomach 15 pary [31, 32].

III-3. Geny odpowiedzialne za prawidłową funkcję PWCR

Cytogenetyczny regionu 15q11-13, odpowiedzialny za występowanie zespołu Pradera-Williego (PWCR), stanowi prawdopodobnie jedną wielką, rozciągającą się na przestrzeni ponad 300 kb, domenę transkrypcyjną o monoallelicznej ojcowskiej eks-

²Borg K., Szpecht-Potocka A. „Przyczyna zespołu Angelmana — nowe spojrzenie na mechanizm rodzicielskiego piętna genomowego”, str. 98.

presji. Sugeruje to, że fenotyp PWS jest uwarunkowany przez wiele genów. Za najważniejsze uważa się trzy geny: *SNRPN*, *IPW*, oraz *NDN*.

III-3.1. Gen *SNRPN*

Produktem genu *SNRPN* jest mały jądrowy polipeptyd N, będący komponentem kompleksu białek zaangażowanych w proces składania RNA w komórkach układu nerwowego, serca i w tkankach płodowych. Uważa się, że mutacje w *SNRPN* mogą być odpowiedzialne za zmiany w rozwoju i funkcjonowaniu tych układów, a w szczególności układu nerwowego. Matczyzna kopia *SNRPN* ulega metylacji, co prowadzi do jej inaktywacji [33].

SNRPN ma wielkość około 30 kb i składa się z 10 eksonów oznaczonych E1-E10. Ekson 1 jest częścią wyspy CpG. Region DNA rozciągający się na długości 35 kb wokół wyspy CpG genu *SNRPN* jest szczególnie bogaty w sekwencje powtarzające się. Obecność takich sekwencji jest charakterystyczna dla piętnowanych regionów genomu. Promotor genu *SNRPN* należy do klasy promotorów pozbawionych sekwencji TATA, natomiast bogaty w zasady G + C. Metylacja *in vitro* znosi jego aktywność. Sugeruje to, że represja matczynej kopii *SNRPN* może być bezpośrednią konsekwencją metylacji jego promotora. Eksony 4-10 genu *SNRPN* mają otwarte ramki odczytu (ORFs) i ulegają transkrypcji tylko z ojcowskich alleli co oznacza, że *SNRPN* wykazuje matczyne piętno genomowe [34, 35].

III-3.2. Gen *IPW*

Piętnowany gen zespołu Pradera-Williego (*IPW*) położony jest dystalnie (150 kb) w stosunku do *SNRPN* i składa się z 3 eksonów [36]. Każdy ekson posiada kodon "stop" dla wszystkich trzech otwartych ramek odczytu. Pierwotny transkrypt genu *IPW* podlega składaniu i poliadenylacji. W komórkach człowieka stwierdza się obecność od dwóch do trzech frakcji mRNA-*IPW* o różnej długości. Ponieważ najdłuższy możliwy zakodowany przez gen *IPW* peptyd mógłby mieć zaledwie 45 aminokwasów, wydaje się więc, że raczej cząsteczka mRNA tego genu a nie peptyd pełni funkcje regulatorowe w PWCR. U chorych z PWS, u których stwierdza się delecje 15q11-13, nie znajduje się produktów *IPW* co sugeruje zależną od pochodzenia rodzicielskiego, monoalleliczną ekspresję tego genu. Wiadomo, że we wszystkich analizowanych tkankach człowieka (kości, tkanki chrzęstne, mięśnie, nerka, śledziona, grasica, przedmózgowie, mózdzek, pępowina i łoży-

ska) *IPW* wykazuje matczyne piętno genomowe, tj. ekspresji ulega tylko ojcowska kopia genu.

III-3.3. Gen *NDN*

Odkryty w 1997 roku, gen kodujący nektynę (*NDN*) położony jest proksymalnie w stosunku do regulatorowej sekwencji określanej jako centrum piętnowania (IC) i ulega ekspresji we wszystkich tkankach człowieka, z wyjątkiem leukocytów krwi obwodowej [37]. Szczególnie wysoki poziom ekspresji obserwuje się w komórkach mózgu i łożyska. Mysi homolog *Ndn* wyrażany jest prawie wyłącznie w komórkach centralnego systemu nerwowego [38]. W komórkach mózgu i fibroblastach człowieka stwierdza się aktywność transkrypcyjną tylko ojcowskiego allelu, co wraz z asynchroniczną replikacją *NDN* (allel ojcowski replikowany jest wcześniej niż matczynej) stanowi dowód matczynej piętna genomowego [37, 39]. I rzeczywiście, u chorych z PWS wykazano całkowitą metylację matczynej kopii *NDN* [40]. Funkcja produktu tego genu nie jest całkowicie wyjaśniona. Mysia nektyna prawdopodobnie pełni rolę w ustanawianiu albo utrzymywaniu (trwaniu) postmitotycznego spoczynkowego wzrostu komórek nerwowych. Brak ekspresji ludzkiego genu kodującego nektynę mógłby więc być jedną z przyczyn nieprawidłowego rozwoju mózgu u chorych z PWS.

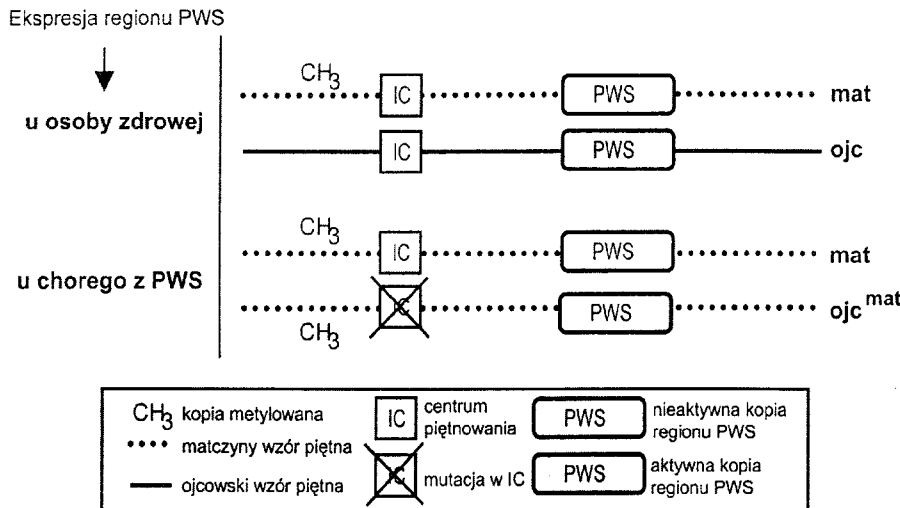
III-4. Mutacje regulatorowe odpowiedzialne za zaburzenie rodzicielskiego piętna genomowego (GI) w PWS

U około 2% przypadków chorych z kliniczną ekspresją PWS, prawidłowo dziedziczących chromosom 15 od obojga rodziców, obserwuje się zaburzenia metylacji DNA polegające na obecności w PWCR tylko matczynej wzoru piętna genomowego. Oznacza to, że u osób tych matczynej wzór metylacji DNA ma także chromosom ojcowski [41, 42]. Przyjmuje się, że w tych przypadkach za zaburzenia metylacji DNA odpowiedzialne są mutacje regulatorowe (IM). Powstają one *de novo* na etapie gametogenezy w pokoleniu rodziców lub na etapie bardzo wczesnego rozwoju zarodkowego, bądź też są dziedziczone od dziadków. Prawie wszystkie opisane dotąd w PWS mutacje regulatorowe mają charakter mikrodelecji. Uniemożliwiają one zmianę wzoru rodzicielskiego piętna genomowego z matczynej na ojcowski, w czasie spermatogenezy. W konsekwencji, na ojcowskim chromosomie 15 jest nieprawidłowy, matczynej wzór modyfikacji DNA (Ryc. 3).

Znane są jednak pojedyncze przypadki IM bez zmian strukturalnych w centrum piętnowania (rozdział VI).

W przypadkach dziedzicznych mutacje regulatorowe powstają w czasie tworzenia gamet w pokoleniu dziadków tj. u babki od strony ojca i przekazywa-

region IC. Eksony regionu IC położone przed 5' końcem *SNRPN* zaangażowane są w formowanie alternatywnych transkryptów, związanych z ustanowieniem w czasie gametogenezy prawidłowego wzoru GI w piętnowanej domenie chromosomu 15. Eksony



Ryc. 3. Efekt mutacji regulatorowej (IM) w centrum piętnowania (IC). U chorego z PWS, ojcowski chromosom ma matczyny wzór piętna genomowego (wyrażony matczynym wzorem metylacji DNA), co powoduje brak aktywności regionu PWS i ekspresję kliniczną choroby. Oznaczenia: mat — chromosom matczyny, ojc — chromosom ojcowski.

ne są przez pokolenie rodziców tj. ojca będącego ich nosicielem. Podczas gdy u chorego mutacja występuje w chromosomie ojcowskim, zarówno jego ojciec, jak i babka (matka ojca) przenoszą tę mutację w chromosomie pochodzenia matczynego. W defektach rodzinnych mikrodelecje obejmują zawsze ekson 1 genu *SNRPN* [43].

IV. Region IC

W odległości około 160 kb od końca 5' genu *SNRPN*, znajduje się sekwencja regulatorowa — centrum piętnowania (IC). Wykazuje ona dwuczęściową strukturę. Składa się z regionu PWS-SRO o wielkości <4,3 kb obejmującego wyspę CpG genu *SNRPN*, oraz z regionu AS-SRO (około 900 bp) znajdującego się dystalnie w stosunku do alternatywnego eksonu IC3 (Ryc. 4) [44]. Delecje w PWS-SRO i AS-SRO mają charakter mutacji regulatorowych bowiem uniemożliwiają ustanowienie właściwego wzoru GI w liniach komórek rozrodczych. Zarówno eksony regionu IC, jak i sekwencje wokół nich, wykazują wysoki stopień homologii co sugeruje, że region ten powstał w wyniku wielokrotnych duplikacji bloków sekwencji [44]. W obrębie IC wykazano istnienie 17 alternatywnych transkryptów, z których żaden nie zawiera eksonu 1 genu *SNRPN*, natomiast wszystkie zawierają sekwencje eksonu 2 tego genu. We wszystkich transkryptach IC eksony genu *SNRPN* występują na 3' końcu. *SNRPN* jest więc częścią złożonej jednostki transkrypcyjnej, obejmującej

te nie biorą bezpośrednio udziału w regulacji transkrypcji głównego mRNA genu *SNRPN*, którego produktem jest mały jądrowy polipeptyd N.

IC ulega ekspresji w komórkach płodowych mózgu, wątroby, płuc, nerek, a u dorosłych w prostaty, jądrach i jajnikach. Szczególnie silną ekspresję obserwuje się w komórkach mięśnia sercowego i mózgu. W innych badanych tkankach dorosłego człowieka, takich jak: wątroba, płuca, nerki, trzustka, śledziona, grasica, mięśnie szkieletowe, krew obwodowa, oraz w łożysku transkryptów IC nie wykryto [43].

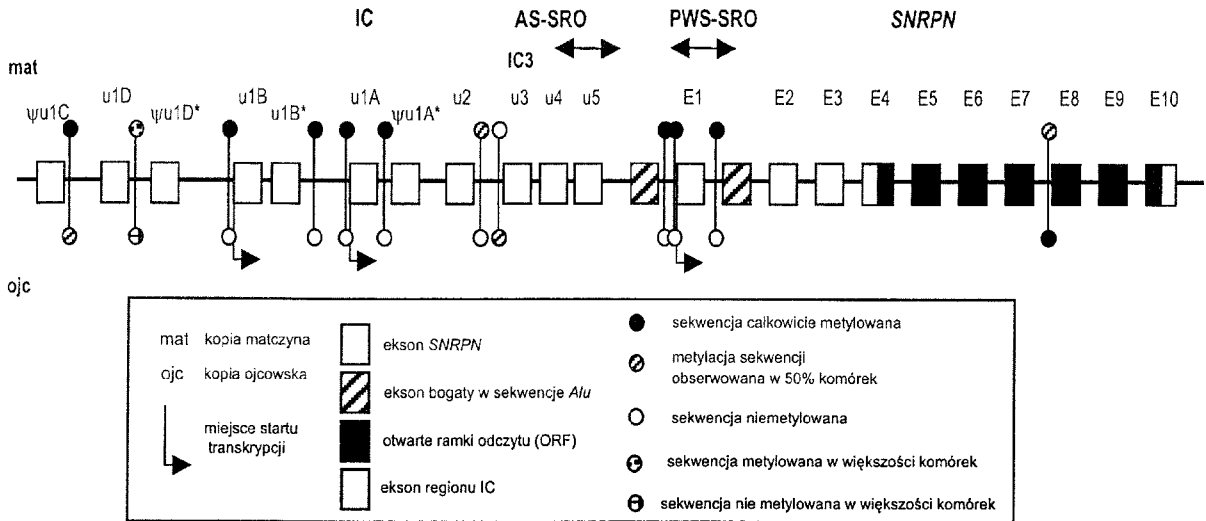
V. Hipotetyczne mechanizmy ustanawiania wzoru GI w liniach komórek płciowych

Przypuszcza się, że ekspresja genów w piętnowanej domenie chromosomu 15 jest regulowana przez oddziaływanie *cis* na obszarze IC. Wszystkie proponowane hipotezy, mające na celu wyjaśnienie mechanizmu zmiany wzoru rodzicielskiego piętna genomowego w liniach komórek płciowych, sugerują więc dwuczęściową strukturę IC.

W modelu „przełączania wzoru GI” proponowanym przez B. Ditttrich i wsp. [44] autorzy zakładają, że centrum piętnowania zawiera sekwencję *BD* (eksony „u”), tzw. imprintor (z ang. *imprintor*) oraz miejsce inicjacji przełączania piętna (SIS). Gen *BD* ulega ekspresji tylko z ojcowskiego chromosomu i działa w układzie *cis* na miejsce inicjacji transkrypcji, którą stanowi promotor *SNRPN*. Wprowa-

dza to lokalne zmiany konformacji chromatyny, prawdopodobnie wpływające bezpośrednio na tran-

GI, polegający na „wymazaniu” istniejącego a następnie nadaniu nowego wzoru, odpowiadającego li-

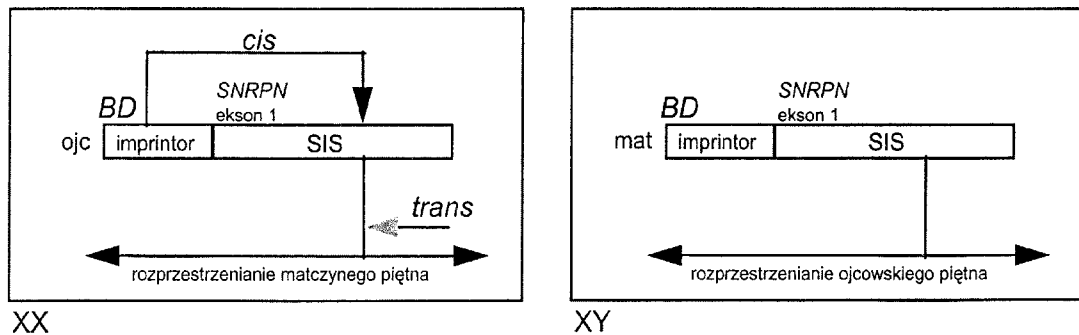


Ryc. 4. Struktura centrum piętnowania (IC) i genu *SNRPN*. W obrębie IC znajdują się: PWS-SRO, AS-SRO, alternatywny region IC3 oraz nie ulegające translacji eksony: u1B (BD1B), u1A (BD1A), u2 (BD2), u4 (BD3), u5, u1D i pseudoksony [45]: u1B* (BD1B*), ψu1C, ψu1A*, ψu1D*. Pseudokson u1B* jest 27 nukleotydową sekwencją, stanowiącą duplikację końca 5' eksonu 2 genu *SNRPN*.

skrypt BD i jego oddziaływanie z DNA (Ryc. 5). Hipoteza B. D i t t r i c h zakłada, że promotor *SNRPN* zawiera elementy regulatorowe, krytyczne dla ustanowienia wzoru GI w męskiej linii rozrodczej. Natomiast za powstanie wzoru GI w żeńskiej linii komórek rozrodczych odpowiedzialny jest hipotetyczny,

nii komórek rozrodczych, w której powstaje (Ryc. 6). Hipoteza ta również zakłada istnienie sekwencji: imprintora oraz SIS, jednak bez udziału czynnika *trans*.

Hipoteza nosząca nazwę „konkurencji wzmacniacza o promotory” autorstwa S. Tilghmana i



Ryc. 5. Hipoteza „przełączania” wzoru rodzicielskiego piętna genomowego. Według B. D i t t r i c h [44] w żeńskiej linii komórek rozrodczych (XX), hipotetyczny czynnik działający w układzie *trans*, zaangażowany jest w „przełączenie” wzoru piętna genomowego (GI) i/ albo inicjację dwukierunkowego „rozprzestrzenianie się” (z ang. *spread*) matczyne wzoru GI w chromosomie pochodzenia ojcowskiego. Efektem tego jest inaktywacja imprintora (sekwencja regulatorowa BD, jeden z dwóch elementów regionu IC). Jeśli brak jest czynnika *trans* (męska linia komórek rozrodczych XY), matczyne piętno w chromosomie pochodzącym od matki jest „tracone”, począwszy od miejsca SIS (drugi element regionu IC), w którym rozpoczyna się „rozprzestrzenianie” ojcowskiego wzoru GI. To przełączenie wzoru GI z matczyne na ojcowski może być spowodowane nieobecnością specyficznego dla płci żeńskiej czynnika *trans*, lub obecnością innych, bliżej nie określonych czynników regulatorowych. Oznaczenia: mat — chromosom matczyne, ojc — chromosom ojcowski.

specyficzny dla tej linii czynnik, działający w układzie *trans*.

Hipoteza „zamiany wzoru GI”, której autorką jest A. Ferguson-Smith [46] proponuje dwuczępowy mechanizm powstania prawidłowego wzoru

wsp. [47] próbuje wyjaśnić, w jaki sposób czynniki epigenetyczne np. metylacja DNA, modyfikujące rodzicielskie chromosomy, wpływają na elementy *cis* procesu transkrypcji tj. promotor, wzmacniacz, czy wyciszacz. Dwuczęściową strukturę regionu IC sta-

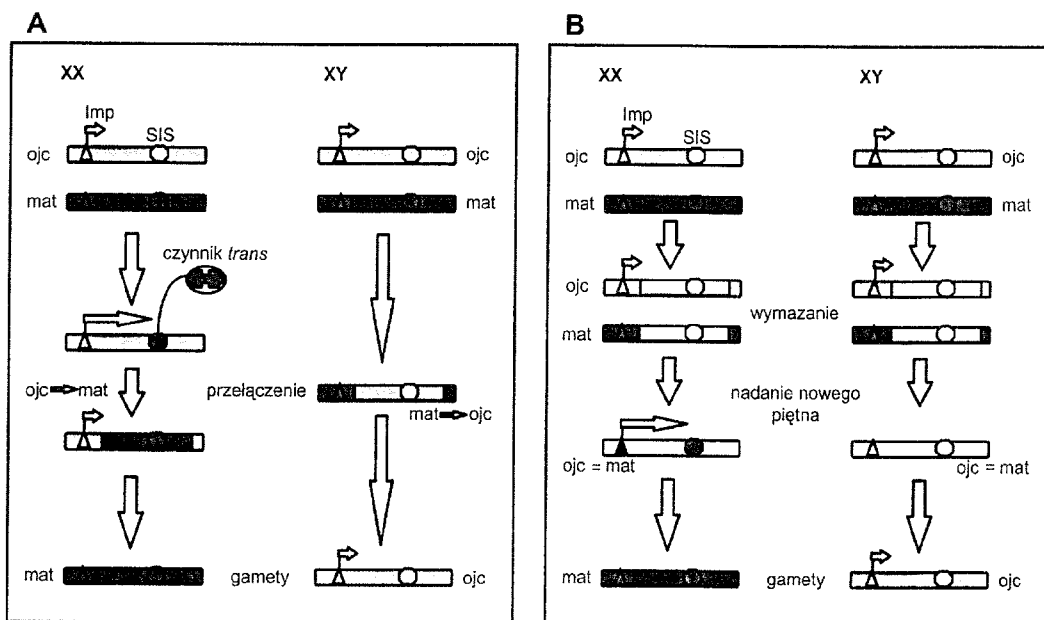
nowi hipotetyczny wzmacniacz i promotor jednego z dwóch genów: *SNRPN* i *UBE3A*, związanych z zespołami odpowiednio PWS i AS. Jest to jedyna hipoteza bezpośrednio zakładająca udział innego genu, poza *SNRPN*, w regulacji ekspresji regionu 15q11-13 (Ryc. 7) [47].

Proponowane mechanizmy zmiany wzoru rodzicielskiego piętna genomowego nie tłumaczą wszystkich szczegółów tego zjawiska. Hipoteza „konkurencji wzmacniacza” nie wyjaśnia, dlaczego mikrodelekcje w IC u chorych z PWS inaktywują również geny położone w dużej odległości przed wzmacniaczem

jego ekspresja ma miejsce tylko w chromosomie ojcowskim.

VI. Konsekwencje zaburzenia wzoru GI w regionie 15q

Niezależnie od mechanizmu zmiany wzoru piętna genomowego w rodzicielskich chromosomach, wydaje się, że mikrodelekcje w centrum piętnowania nie są wystarczającą przyczyną PWS. Przyczyną jest zachowanie niewłaściwego lub usunięcie właściwego dla płci wzoru GI w czasie gametogenezy. Dowodem



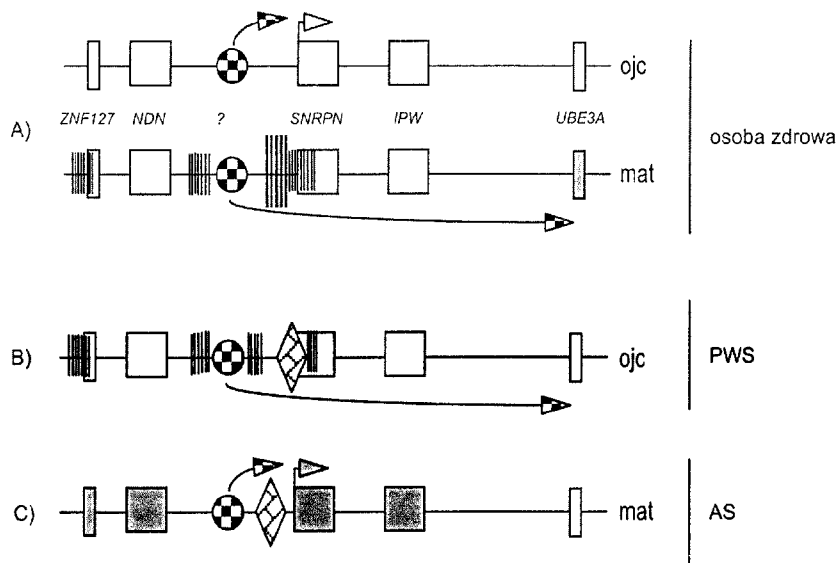
Ryc. 6. Porównanie hipotez „przelączenia” (A) i „zamiany” (B) wzoru rodzicielskiego piętna genomowego w żeńskiej (XX) i męskiej (XY) linii komórek rozrodczych. A. Hipoteza „przelączenia” wzoru piętna genomowego (GI) [44]. W linii XX imprinter (sekwencja regulatorowa *BD*, element regionu IC) jest aktywny w chromosomie pochodzenia ojcowskiego. Aktywność imprintora umożliwia oddziaływanie regionu SIS (drugi element regionu IC) ze specyficznym dla linii rozrodczej żeńskiej czynnikiem *trans*. Inicjuje to „rozprzestrzenianie się” matczynego wzoru GI. W chromosomie pochodzenia matczynego wzór rodzicielskiego piętna genomowego zostaje zachowany (nie pokazane na rysunku). W linii XY matczyzny wzór GI jest zastępowany przez męski, począwszy od miejsca inicjacji SIS. Hipoteza nie wyjaśnia tego etapu. Ojcowski chromosom nie ulega modyfikacji w męskiej linii komórek rozrodczych. Ekspresja imprintora nie ma tu znaczenia przy braku, specyficznego dla żeńskiej linii rozrodczej, czynnika *trans*. B. Hipoteza „zamiany” wzoru piętna genomowego (GI). W liniach rozrodczych XX oraz XY rodzicielski wzór GI jest najpierw „wymazywany”, począwszy od miejsca SIS. Imprinter jest aktywny (długa strzałka) w żeńskiej linii komórek rozrodczych, co powoduje ustanowienie matczynego wzoru piętna. Nadanie ojcowskiego wzoru GI w linii rozrodczej męskiej związane jest z brakiem aktywności imprintora. Oznaczenia: mat –chromosom matczynej, ojc –chromosom ojcowski, Imp — imprinter (oznaczono trójkątem), SIS — miejsce inicjacji transkrypcji (oznaczono kółkiem), kolor czarny — matczynej wzór GI, kolor szary — ojcowski wzór GI, XX oraz XY — odpowiednio żeńska oraz męska linia komórek rozrodczych.

(np. gen *IPW*) i wpływają na metylację oraz na kolejność replikacji poszczególnych regionów DNA w całej domenie transkrypcyjnej [48-50]. Model B. D i t t r i c h tłumaczy to faktem położenia promotora *SNRPN* w obrębie sekwencji SIS, stanowiącej centrum zmian kondensacji heterochromatyny, których konsekwencją są zmiany metylacji i kolejność replikacji DNA. Jednak i ta hipoteza nie jest spójna. Sprzeczna wydaje się np. możliwość oddziaływania genu *BD* w żeńskiej linii rozrodczej, podczas gdy

na to jest po pierwsze fakt występowania wśród chorych z PWS mutacji regulatorowych bez zmian strukturalnych w IC. Opisane dotychczas przypadki miały jednak charakter sporadyczny i mogły być rezultatem spontanicznych pre- lub postzygotycznych błędów, których efektem byłyby zmiany oddziaływań *cis* poza centrum piętnowania. Przyczyną tego typu defektów mogą być również epimutacje lub mutacje genów kodujących czynniki *trans* [51, 52]. Po drugie, zaobserwowano, że we wszystkich

przypadkach IM w PWS, zarówno z delecją jak i bez delecji w IC, chromosom z nieprawidłowym wzorem GI, pochodzi zawsze od babki ze strony ojca [52]. W przeciwieństwie do PWS, w AS nieprawidłowy chromosom z delecją w IC dziedziczony jest od dziadka ze strony matki, a chromosom z nieprawidłowym

czym to, że delecje w IC mogą być niewystarczające do uszkodzenia mechanizmu zmiany wzoru rodzicielskiego piętna genomowego w czasie gametogenezy, a więc nie są także bezpośrednią i/lub jedyną przyczyną PWS. Dowodzi to również, że mechanizm zmiany wzoru GI na właściwy płci, w której powstaje,



Ryc. 7. Hipoteza „konkurencji wzmacniacza o promotory genów”. A. Ekspresja genów u osoby zdrowej. Szarym kolorem zaznaczono geny ulegające ekspresji z kopii ojcowskiej, czarnym — z kopii matczynej. Kółkiem oznaczono hipotetyczny wzmacniacz. Strzałki wyznaczają oddziaływanie wzmacniacza na promotor genu. Długie pionowe kreski — matczyne piętno genomowe wyrażone metylacją DNA; krótkie pionowe kreski — metylacja somatyczna; mat — chromosom matczynej, ojc — chromosom ojcowski. B. Efekt delecji w obrębie promotora genu *SNRPN* w chromosomie ojcowskim. W kształcie rombu zaznaczono obszar ulegający delecji. C. Efekt delecji w regionie leżącym w kierunku 5' od promotora *SNRPN* w chromosomie matczynie. W kształcie rombu zaznaczono obszar ulegający delecji. Hipoteza zakłada, że wzór modyfikacji DNA w obrębie promotora *SNRPN* reguluje dostęp wzmacniacza do sekwencji promotora. Hipotetyczny wzmacniacz stanowi jeden z dwóch elementów dwuczęściowej struktury IC. Wzmacniacz ten, położony przed 5' końcem genu *SNRPN*, oddziałuje z promotorem genu *SNRPN*, stanowiącym drugi element IC. U osoby zdrowej promotor *SNRPN* nie jest metylowany w chromosomie ojcowskim, a więc jest dostępny dla wzmacniacza, co umożliwia ekspresję genu. Metylacja promotora *UBE3A* (genu, w którym mutacje odpowiedzialne są za AS), umożliwiając jego ekspresję (A). Mikrodelecje obejmujące sekwencję promotorową genu *SNRPN* inaktywują sam promotor, a pozostawiają aktywne geny zlokalizowane w zasięgu oddziaływania wspólnego wzmacniacza tj. gen *UBE3A* (B). Efektem tego jest fenotyp PWS. U chorych z AS, delecja w matczynie chromosomie przed promotorem *SNRPN* powoduje zaburzenie metylacji DNA. W efekcie tego chromosom matczynej pozostaje niemetylowany i jest dziedziczony od matki z nieprawidłowym ojcowskim wzorem modyfikacji DNA. Powoduje to brak ekspresji genu *UBE3A* w chromosomie matczynie, co stanowi przyczynę AS (C).

wzorem GI ale bez delecji w IC pochodzi od babki ze strony matki. Wyniki te rzucają światło na mechanizm zmiany rodzicielskiego piętna genomowego w czasie gametogenezy. Sugerują, że fragmenty DNA zaangażowane w ten proces i działające w konformacji *cis*, nie są ściśle zależne od ich sekwencji albo, że obejmują PWS-SRO tylko częściowo. Aktywność regionu odpowiedzialnego za zmianę wzoru GI w liniach rozrodczych jest bowiem zależna od wielkości obszaru ulegającego defektowi. Mimo, że za inaktywację elementów *cis* związanych z ustanawianiem prawidłowego wzoru GI w PWS-SRO, odpowiedzialny jest fragment 215 bp obejmujący promotor *SNRPN*, to jednak mutacje obejmujące większy obszar wywołują znacznie silniejszy efekt [50]. Oznacza

to, że delecje w IC mogą być niewystarczające do uszkodzenia mechanizmu zmiany wzoru rodzicielskiego piętna genomowego w czasie gametogenezy, a więc nie są także bezpośrednią i/lub jedyną przyczyną PWS. Dowodzi to również, że mechanizm zmiany wzoru GI na właściwy płci, w której powstaje,

jest dwuetapowy i składa się z usunięcia istniejącego (I etap) oraz aktywnego nadawania nowego (II etap) wzoru GI. Aktywność regionu IC odpowiedzialna jest za pierwszy z tych procesów. Pochodzenie od babki ze strony matki chromosomu z nieprawidłowym (ojcowskim) wzorem piętna genomowego u chorych z AS wskazuje, że pierwotnym, „domyślnie” ustanawianym jest ojcowski wzór GI. Powstaje on zarówno w męskiej jak i w żeńskiej linii komórek rozrodczych w przypadku, gdy brak jest matczynego czynnika *trans*-działającego (linia XY) lub gdy miała miejsce mutacja regulatorowa, powodująca defekt w nadawaniu właściwego wzoru GI (linia XX u chorych z AS z IM) [51].

Ustanowienie ojcowskiego wzoru piętna genomowego w czasie spermatogenezy w chromosomie pochodzącym od babki wymaga „wymazania” wzoru matczynego, czyli oddziaływania w konformacji *cis* sekwencji PWS-SRO. W przypadku braku prawidłowej sekwencji (chorzy z PWS z mikrodelecją w IC), matczyne wzór piętna genomowego w chromosomie ojca pochodzącym od babki nie jest usuwany w męskiej linii rozrodczej i chromosom z nieprawidłowym wzorem GI przekazywany jest potomstwu, u którego wywołuje efekt kliniczny. U chorych z PWS z mutacją regulatorową ale bez delecji w IC, przyczyna „niewymazania” matczynego wzoru GI nie jest znana.

Nadanie matczynego wzoru piętna genomowego w czasie oogenezy wymaga oddziaływania w konformacji *cis* sekwencji AS-SRO oraz specyficznego dla linii XX czynnika *trans*. Fizyczny brak elementu *cis* (chorzy z AS z delecją w IC) lub inna nieznaną przyczyną uniemożliwiająca oddziaływania *cis* w AS-SRO (chorzy z AS bez delecji w IC) powoduje, że „wyczyszczony” ze wzoru rodzicielskiego piętna genomowego chromosom (niezależnie od tego czy pochodzi od dziadka czy od babki za strony matki) błędnie nabywa pierwotny, nadawany domyślnie ojcowski wzór GI.

VII. Postępowanie diagnostyczne w PWS

Weryfikacja rozpoznania klinicznego PWS polega na ustaleniu rodzicielskiego pochodzenia badanego regionu q11-13 chromosomu 15, co umożliwia analiza metylacji DNA. Obecność tylko matczynego wzoru metylacji DNA stanowi potwierdzenie PWS i wymaga dalszej analizy DNA celem określenia rodzaju defektu molekularnego. Badania te oparte są na analizie dawki genu, analizie polimorfizmu mikrosatelitów oraz RFLP.

VIII. Mutacje regulatorowe a ryzyko genetyczne

Istnienie dwóch klas mutacji regulatorowych tj. z delecją w IC oraz bez delecji, pociąga za sobą ważne konsekwencje dla poradnictwa genetycznego. W przypadku powstałej *de novo* delecji w regionie IC, ryzyko genetyczne jest populacyjne, tzn. < 1%. Dziecięcej delecji w IC (jedno z rodziców jest nosicielem mutacji) towarzyszy 50% ryzyko genetyczne. W rodzinach, w których nie stwierdza się delecji w regionie IC, ryzyko wydaje się być niskie (do 5%). Brak znajomości natury tych defektów, nie pozwala jednak na dokładne określenie ryzyka i absolutne

wykluczenie możliwości powtórzenia choroby w rodzinie [51].

IX. Uwagi końcowe

Mimo, że zespół Pradera-Williego jest chorobą nieuleczalną, to jednak jego wczesne rozpoznanie daje szansę złagodzenia, bardzo niekorzystnych dla zdrowia chorego, skutków choroby. Weryfikacja diagnozy klinicznej jest podstawą do zaplanowania postępowania przeciwdziałającego rozwojowi nadmiernej otyłości i związanych z nią powikłań ze strony układu krążenia, oddechowego oraz kostnego. Ustalenie rodzaju defektu molekularnego umożliwia określenie wielkości ryzyka genetycznego, co stanowi jeden z podstawowych elementów poradnictwa genetycznego oraz jeden z warunków zakwalifikowania chorego z PWS do terapii hormonem wzrostu.

Artykuł otrzymano 13 września 1999 r.

Zaakceptowano do druku 8 stycznia 2001 r.

Piśmiennictwo

1. Nicholls R (1994) *Am J Hum Genet* **54**: 733-740
2. Wójcik C (1993) *Postępy Biologii Komórki* **1**: 3-23
3. Bestor T, Ingram V (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 559-563
4. Chaillet J, Vogt T, Beier D, Leder P (1991) *Cell* **66**: 77-83
5. Razin A, Cedar H (1994) *Cell* **77**: 473
6. Posfai J, Bhagwat A, Posfai G, Leder P (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 2421-2435
7. Lauster R, Trautner T, Noyer-Widner M (1989) *J Mol Biol* **206**: 305-312
8. Leonhardt H, Page A, Weier H-U, Bestor T (1992) *Cell* **71**: 865-873
9. Carlson L, Page A, Bestor T (1992) *Genes Devel* **6**: 2536-2541
10. Li E, Bestor T, Jaenisch R (1992) *Cell* **12**, **69**: 915-926
11. Moncla A, Malzac P, Voelckel MA, Auquier P, Girargot L, Mattei MG, Mattei JF, Lalande M, Levet MO (1999) *Eur J Hum Genet* **7**: 131-139
12. Szyf M (1991) *Biochem Cell Biology* **69**: 764-767
13. Cross S, Bird A (1995) *Curr Opin Genet Dev* **5**: 309-314
14. Perry C, Annunziato A (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 4275-4291
15. Moore G, Procunier J, Cross D, Grigliatti T (1979) *Nature* **282**: 312-314
16. Mottus R, Reeves R, Grigliatti T (1980) *Mol Genet* **178**: 465-469
17. Wolffe A (1992) *London: Academic Press*
18. Lee D, Hayes J, Pruss D, Wolffe A (1993) *Cell* **72**: 73-84
19. Ghazi H, Gonzales F, Jones P (1992) *Gene* **15**, 114: 203-210
20. Richard-Foy H, Hager G (1987) *EMBO J* **6**: 2321-2328
21. Straka C, Horz W (1991) *EMBO J* **10**: 361-368
22. McPherson C, Shim E, Friedman D, Zaret K (1993) *Cell* **75**: 387-398
23. Simpson R (1991) *Prog Nucl Acids Res Mol Biol* **40**: 143-184
24. Workman J, Roeder R (1987) *Cell* **51**: 613-622
25. Wallrath L, Lu Q, Granock H, Elgin S (1994) *BioEssays* **16**: 165-170.

26. Feil R, Khosla S (1999) *TIG* 15: 431-435
27. Leana-Cox J, Jenkis L, Palmer C, Plattner R, Sheppard L, Flejter W, Zackowski J, Tsien F, Schwartz S (1994) *Am J Hum Genet* 54: 748-756
28. Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, Keshet I, Simon I, Driscoll D, Nicholls R, Cedar H (1993) *Nature* 364: 459-463
29. Holm V, Cassidy S, Butler M, Hanchett J, Greenswag L, Whitman B, Greenberg F (1993) *Pediatrics* 1: 398-402
30. Mascari M, Gottlieb W, Rogan P, Butler M, Waller D, Armour J, Jeffreys A, Ladda R, Nicholls R (1992) *New England J Med* 326: 1599-1607
31. Scrable H, Witte D, Lampkin B, Cavaneer W (1987) *Nature* 329: 645-647
32. Kucherlapati R (1989) *Prog Nucl Acid Res Biol* 36: 301-310
33. Nakao M, Sutcliffe J, Durtchi B, Mutirangura A, Ledbetter D, Beaudet A (1994) *Hum Mol Genet* 2: 309-315
34. Glenn C, Saitoh S, Jong M, Filbrandt M, Surti U, Driscoll D, Nicholls R (1996) *Am J Hum Genet* 58: 335-346
35. Özcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U (1992) *Nature Genet* 2: 265-269
36. Wervick R, Kerns JA, Francke U (1994) *Hum Mol Genet* 3: 1877-1882
37. Jay P, Rouquelle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei M, Malzac P, Roeckel N, Taviaux S, Lefranc J, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F (1997) *Nature Genet* 17: 357-361
38. Aizawa T, Maruyama K, Kondo H, Yoshikawa K (1992) *Dev Brain Res* 68: 265-274
39. Watrin F, Roeckel N, Lacroix L, Mignon C, Mattei M, Disteche C, Muscatelli F (1997) *Eur J Hum Genet* 5: 324-332
40. Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei M-G, Malzac P, Roeckel N, Taviaux S, Lefranc J-L, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F (1997) *Nature Genet* 17: 357-361
41. Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls R, Horsthemke B (1995) *Nature Genet* 9: 395-400
42. Reis A, Dittrich B, Greger V, Buiting K, Lalande M, Gillesen-Kaesbach G, Anvret M, Horsthemke B (1994) *Am J Hum Genet* 54: 741-74
43. Färber C, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B (1999) *Hum Mol Genet* 8, 2: 337-343
44. Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, Saitoh S, Nicholls R, Poustka A, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1996) *Nature Genet* 14:163-170
45. Sun H, Chasin LA (2000) *Mol Cell Biol* 20(17):6414-6425
46. Ferguson-Smith A (1996) *Nature Genet* 14:119-121
47. Tilghman S, Caspary T, Ingram R (1998) *Nature Genet* 8: 206-208
48. Saitoh S, Buiting K, Rogan P, Buxton J, Driscoll D, Arnemann J, Köni R, Malcolm S, Horsthemke B, Nicholls RD (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7811-7815
49. Sutcliffe J, Nakao M, Christian S, Orstavik K, Tommerup N, Ledbetter D, Beaudet A (1994) *Nature Genet* 8: 52-58
50. Gunaratne P, Nakao M, Ledbetter D, Sutcliffe J, Chinault A (1995) *Genes Dev* 9: 808-820
51. Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Färber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Bürger J, Nöthen M, Barth-Witte U, Janssen B, Abelliovich D, Lerer I, van den Ouweland A, Halley D, Schrander-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalande M, Nicholls R, Friend K, Schulze A, Matthijs G, Kokkonen H, Hilbert P, van Maldergem L, Glover G, Carbonell P, Willems P, Gillesen-Kaesbach G, Horsthemke B (1998) *Am J Hum Genet* 63: 170-180
52. Ohta T, Gray T, Rogan P, Buiting K, Gabriel J, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll D, Horsthemke B, Butler M, Nicholls R (1999) *Am J Hum Genet* 64: 397-413

Uzupełnienie

Po oddaniu pracy do Redakcji ukazały się istotne dla omawianych zagadnień artykuły:

- Reik W, Murrel A (2000) *Nature* 45: 408-409
 Pfeifer K (2000) *Am J Hum Genet* 67: 777-787
 Mann M, Bartolomei M (2000) *Nat Genet* 25: 4-5

Przyczyna zespołu Angelmana — nowe spojrzenie na mechanizm rodzicielskiego piętna genomowego

The cause of Angelman syndrome — the new look on the mechanism of genomic imprinting

KATARZYNA BORG¹, AGNIESZKA SZPECHT- POTOCKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Podłoże molekularne AS
- III. Rodzicielskie piętno genomowe w regionie 15q
 - III-1. *UBE3A* — nietypowy piętnowany gen
 - III-1.1. Produkt *UBE3A*
 - III-1.2. Budowa i ekspresja *UBE3A*
 - III-1.3. Mutacje w *UBE3A*
 - III-2. Mutacje regulatorowe rodzicielskiego piętna genomowego w regionie IC
- IV. Diagnostyka molekularna AS
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. The molecular base of AS
- III. The genomic imprinting in the region 15q
 - III-1. *UBE3A* — untypical imprinted gene
 - III-1.1. The product of the *UBE3A*
 - III-1.2. The structure and expression of the *UBE3A*
 - III-1.3. Mutations of the *UBE3A*
 - III-2. Imprinting mutations in IC region
- IV. The molecular diagnosis of AS
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: AS — zespół Angelmana (ang. *Angelman syndrome*); AS-SRO — minimalny obszar ulegający delecji w AS (ang. *AS the smallest region of deletion overlap*); bp — pary zasad (ang. *base pair*); BWS — zespół Bekwitha-Wiedemana (ang. *Bekwith-Wiedeman syndrome*); CNS — centralny układ nerwowy (ang. *central nervous system*); DMR — region odmiennie metylowany (ang. *differential methylated region*); FISH — fluorescencyjna hybridyzacja *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*); GI — rodzicielskie piętno genomowe (ang. *genomic imprinting*); IC — centrum piętnowania (ang. *imprinting center*); IM — mutacja regulatorowa rodzicielskiego piętna genomowego (ang. *imprinting mutation*); kbp — tysiąc par zasad (ang. *kilo-base pair*); kb — tysiąc zasad; Mb — milion par zasad (ang. *mega-base pair*); pUPD — ojcowska disomia (ang. *paternal disomy*); PWS — zespół Pradera-Williego (ang. *Prader-Willi syndrome*); PWS-SRO — minimalny obszar ulegający delecji w PWS (ang. *PWS the smallest region of deletion overlap*); UPD — jednorodzielska disomia (ang. *uniparental disomy*).

I. Wstęp

Zespół Angelmana jest rzadką neurogenetyczną chorobą występującą z częstością około 1 : 15000 ży-

wych urodzeń. Obraz kliniczny charakteryzuje się głębokim upośledzeniem umysłowym z zaburzeniami rozwoju mowy i opóźnionym rozwojem ruchowym oraz cechami dysmorfii twarzy. Objawami towarzyszącymi są: nieprawidłowy, charakterystyczny zapis EEG, częste drgawki padaczkowe oraz zaburzenia snu. Zespół Angelmana jest, obok zespołu Pradera-Williego (PWS) i zespołu Bekwitha-Wiedemana (BWS), jednym z najlepiej poznanych przykładów chorób człowieka związanych z zaburzeniami rodzicielskiego piętna genomowego. Region, którego defekt odpowiedzialny jest za AS wykazuje ojcowskie piętno genomowe co oznacza, że geny położone w jego obszarze wykazują monoalleliczną ekspresję tylko z matczynej kopii. AS spowodowany jest więc dysfunkcją regionu o przeciwnym piętnie genomowym w stosunku do regionu odpowiedzialnego za PWS.

II. Podłoże molekularne AS

Za zespół Angelmana odpowiedzialne są defekty molekularne w regionie q11-13 chromosomu 15 pochodzącego od matki (Ryc. 1). W 70% przypadków defekt stanowi rozległa delecja powstała *de novo*. Rzadko delecje mają charakter rodzinny i dziedziczone

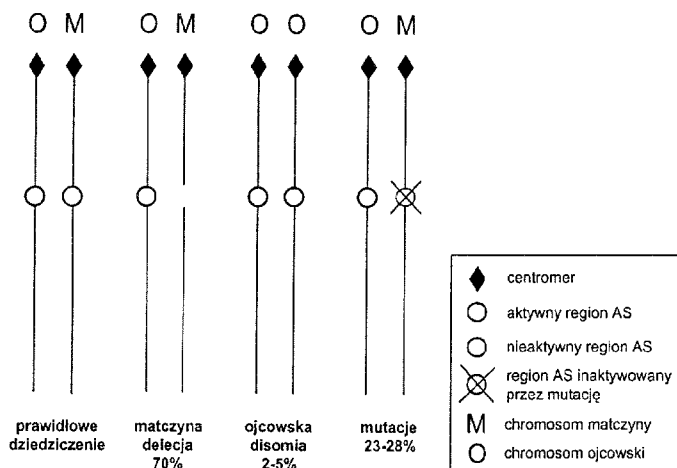
¹Mgr biologii, ²Dr n. biol., Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, 01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17A, e-mail: aspotocka@hotmail.com

czony są wówczas po matce. W 2-5% przypadków przyczyną AS związana jest z występowaniem jednorodzielskiej disomii chromosomu 15.

Jednorodzielska disomia (UPD) polega na dziedziczeniu obu alleli genu lub obu chromosomów tej samej pary tylko od jednego z rodziców. Przyczyną UPD jest błąd segregacji chromosomów (nondysjunkcja) podczas redukcyjnego podziału komórkowego [1]. Wyróżnia się heterodisomię i

III. Rodzicielskie piętno genomowe w regionie 15q

Region q11-13, o wielkości około 4 Mb, jest piętnowanym obszarem chromosomu 15 człowieka. Zjawisko rodzicielskiego piętna genomowego polega na monoallelicznej ekspresji genu, zależnej od jego rodzicielskiego pochodzenia i jest wynikiem specyficznej, epigenetycznej modyfikacji genomu¹. Wzór

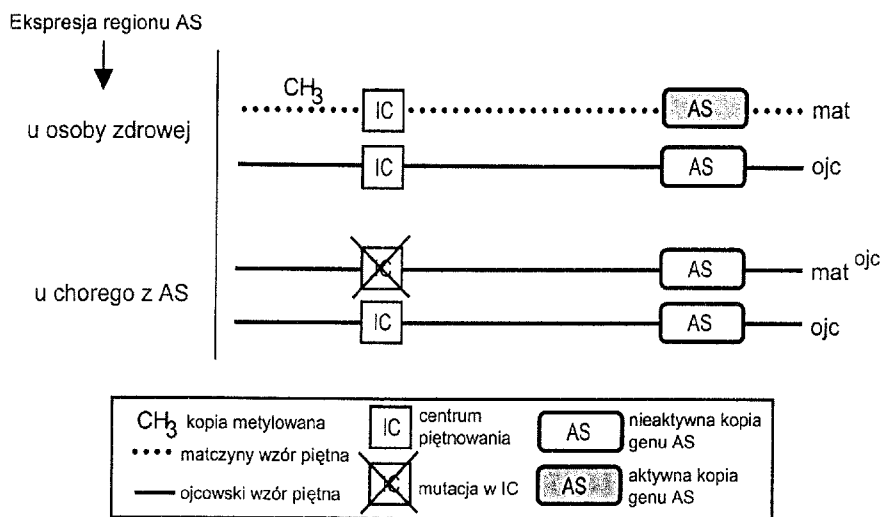


Ryc. 1. Rodzaje i częstość występowania defektów molekularnych w zespole Angelmana (AS).

izodisomię. W zespole Angelmana stwierdza się występowanie disomii pochodzenia ojcowskiego (pUPD).

W 2-4% przypadków AS uwarunkowany jest utratą funkcji regionu w chromosomie matczym,

GI ustanawiany jest podczas gametogenezy i wczesnego rozwoju zarodkowego. Prawidłowa ekspresja piętnowanego regionu 15q11-13 wymaga zmiany wzoru rodzicielskiego piętna genomowego na właściwy danej płci w czasie „przejścia” chromoso-



Ryc. 2. Efekt mutacji regulatorowej (IM) w centrum piętnowania (IC) w zespole AS. U chorego z AS, matczyny chromosom ma ojcowski wzór piętna genomowego (wyrażony ojcowskim wzorem metylacji DNA), co powoduje brak aktywności regionu AS i ekspresję kliniczną choroby. Oznaczenia: mat — chromosom matczyny, ojc — chromosom ojcowski.

na skutek mutacji regulatorowej rodzicielskiego piętna genomowego (IM) w centrum piętnowania. U 23-26% chorych z AS przyczyną choroby są mutacje punktowe w obrębie genu *UBE3A*. Mutacje te (podobnie jak IM) mogą mieć charakter dziedziczny, lub mogą powstawać *de novo* (Ryc. 2) [2].

mu przez oogenezę lub spermatogenezę.

Jednym z najlepiej poznanych czynników regulacji ekspresji genów jest metylacja DNA. Razem z innymi mechanizmami prowadzi do okresowej lub konstytutywnej inaktywacji jednego z alleli piętnowanego genu. Metylacja jest mechanizmem końco-

¹por. artykuł Szpecht-Potocka A. „Rodzicielskie piętno genomowe w zespole Pradera-Williego”, str. 87.

wym i ostatecznie stabilizującym wzór rodzicielskiego piętna genomowego. Prawie wszystkie piętnowane geny eukariotyczne wykazują specyficzną, zależną od rodzicielskiego pochodzenia, metylację DNA [3]. Ezymami odpowiedzialnymi za utrzymanie w komórce odpowiedniego poziomu metylacji DNA są metylotransferazy.

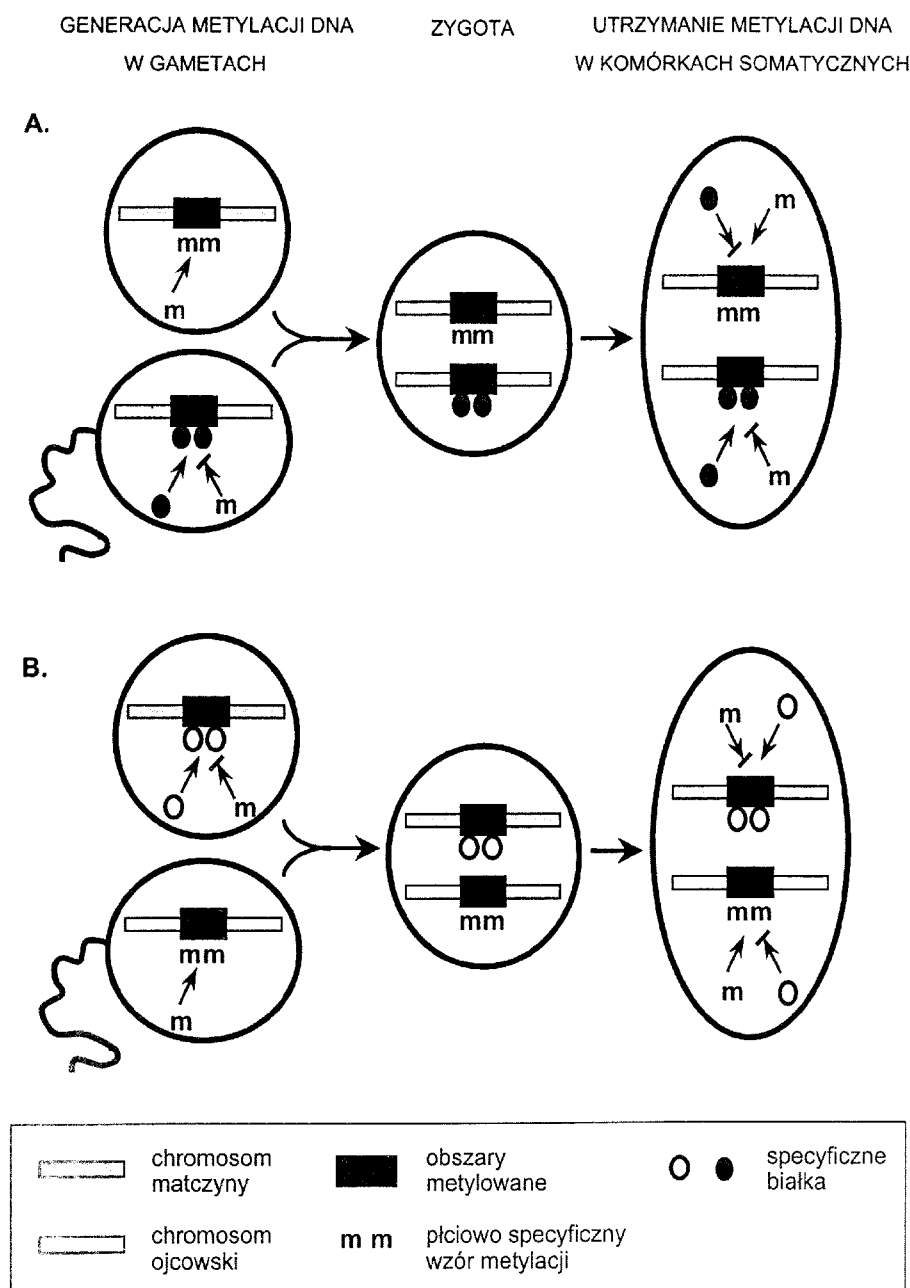
Ustanowiony pierwotnie wzór metylacji *de novo* nie może być modyfikowany w kolejnych podziałach komórkowych, lecz jest replikowany razem z matrycą DNA [4]. Próba wy tłumaczenia mechanizmu ustanawiania w gametach wzoru GI specyficznego dla płci i utrzymywania go w komórkach somatycznych jest model wzajemnego wykluczania (Ryc. 3). Hipoteza ta zakłada, że w obrębie piętnowanych domen znajdują się regiony, których kopie matczyne i ojcowskie są odmiennie metylowane [5].

III-1. *UBE3A* — nietypowy piętnowany gen

Odkrycie genu *UBE3A*, którego mutacje odpowiedzialne są za kliniczną ekspresję zespołu Angelmana, zmodyfikowało dotychczasowe poglądy na temat podłoża molekularnego AS a także, uwarunkowanej rodzicielskim piętnem genomowym, regulacji ekspresji genów. W wielu tkankach, gen *UBE3A* ulega bowiem ekspresji z obu rodzicielskich kopii [6].

III-1.1. Produkt *UBE3A*

Produktem genu *UBE3A* jest ligaza E3 (ligaza białko:ubikwityna). Została ona zidentyfikowana dzięki swej zdolności do reakcji z białkiem E6 ludzkiego brodawczaka i inicjacji degradacji w komórce białka p53 [7]. Ligaza E3 zaliczana jest do jednej z



Ryc. 3. Hipoteza „wzajemnego wykluczania”. A. Metylacja chromosomu matczynego. B. Metylacja chromosomu ojcowskiego. Hipoteza wzajemnego wykluczania opiera się na zjawisku konkurencji (i jednocześnie, wzajemnym wykluczeniu) między dwoma czynnikami: metylacją DNA a białkami niehistonowymi o oddziaływanie z regionami DMR. Przyłączenie do DMR specyficznych białek niehistonowych powoduje przyjęcie określonej konformacji chromatyny i zapobiega metylacji alleli. Natomiast metylacja jednego z rodzicielskich alleli i związany z tym podwyższony stopień kondensacji chromatyny zapobiega wiązaniu białek niehistonowych do DMR. Te dwa kompetycyjne czynniki — metylacja DNA i konformacja chromatyny — są zaangażowane w ustanowienie i utrzymanie matczynego i ojcowskiego wzoru rodzicielskiego piętna genomowego w czasie rozwoju i całego życia organizmu [5].

czterech klas białek współdziałających w selekcjonowaniu na drodze ubiquitynizacji substratów białkowych przeznaczonych do degradacji [8]. Proces degradacji rozpoczyna się od utworzenia wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego pomiędzy aktywnym końcem cysteinowym jednego z enzymów klasy E1, a C końcowym aminokwasem ubiquityny. Zaktywowana w ten sposób ubiquityna jest przenoszona przez szereg enzymów klasy E2 na ligazę E3. Kompleks ten specyficznie rozpoznaje substraty białkowe przeznaczone w komórce do degradacji. Ligaza E3 modyfikuje substrat poprzez kowalencyjne przyłączenie ubiquityny [9]. Takie połączenie aktywuje proteolizę białka.

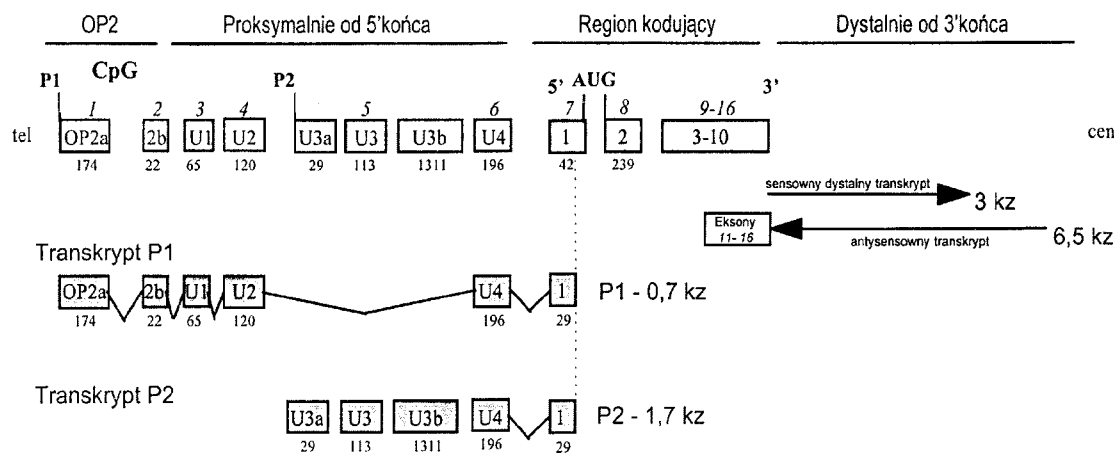
Ligaza E3 odbiera ubiquitynę od kilku enzymów klasy E2, wyznaczając do degradacji co najmniej cztery białka komórkowe. Mechanizm ten może mieć jednak o wiele szerszy zasięg tj. dotyczyć degradacji innych, niż dotychczas znane, białek komórkowych [10]. Brak funkcji *UBE3A* może więc u chorych z AS być odpowiedzialny za zaburzenia tego procesu. Byłby to pierwszy przykład choroby genetycznej człowieka związanej z proteolizą zależną od ubiquityny.

III-1.2. Budowa i ekspresja *UBE3A*

Gen *UBE3A* składa się z 10 eksonów (oznaczonych od 1-10) kodujących podstawowy transkrypt, eksonów U1-U4 położonych w kierunku 5' w sto-

Transkrypt *UBE3A* występuje zasadniczo w dwóch formach. We wszystkich tkankach organizmu wykazano obecność dwóch frakcji mRNA: o wielkości około 4,5 kZ oraz około 10 kZ. Różnica pomiędzy wielkością transkryptów wynika prawdopodobnie z istnienia alternatywnych sygnałów poliadenylacji. Sonda komplementarna do regionu kodującego wykrywa również dodatkowy, mały transkrypt o wielkości około 1 kZ, o nieznannej funkcji [11]. W tkankach płodowych stwierdza się ponadto obecność dwóch transkryptów nie ulegających translacji. Transkrypt o wielkości 0,7 kZ powstaje z promotora P1 i obejmuje region OP2, eksony U1-U2-U4 oraz ekson 1. Transkrypt większy, o wielkości 1,7 kZ pochodzi z promotora P2 i obejmuje eksony U3-U4, a także U3a i U3b, oraz ekson 1 (Ryc. 4). Wykrycie miejsc alternatywnego składania genu, położonych przed końcem 5' genu *UBE3A* (eksony U3a i U3b), sugeruje możliwość powstawania białkowych izoform produktu genu.

W wielu komórkach (fibroblastach, limfoblastach, kardiomiocytach i hepatocytach) gen *UBE3A* nie jest piętnowany i ulega ekspresji z obu rodzicielskich kopii. Natomiast w mózgu ekspresji ulega tylko matczynej allel *UBE3A* co oznacza, że gen ten wykazuje ojcowskie piętno genomowe [7, 12]. Stwierdzono, że u myszy objawy choroby, podobne do występujących u ludzi z zespołem AS, są bezpośrednio skorelowane z objawami towarzyszącymi utracie



Ryc. 4. Struktura genu *UBE3A* i jego transkryptów nie ulegających translacji oraz transkryptów sensownych i antysensownych. Eksony oznakowane są wg dwóch systemów numeracji, z których jeden wyróżnia region OP2, nie ulegające translacji eksony U i ulegające translacji eksony 1-10, a drugi numeruje wszystkie eksony w kolejności od 1-16 (pochyłym drukiem). Pod eksonami zaznaczono ich wielkość wyrażoną w parach zasad. P1, P2 — sekwencje promotorowe oraz kierunek transkrypcji (zaznaczony chorągiewką). Inne oznaczenia: tel — telomer, cen — centromer, kZ — tysiące zasad.

sunku do eksonu 1, oraz dwóch eksonów regionu OP2 tj. OP2a i OP2b (Ryc. 4). W regionie OP2 znajduje się wyspa CpG. Transkrypcja genu *UBE3A* przebiega w kierunku od telomeru do centromeru [11].

ekspresji matczynej kopii genu *UBE3A* w hipokampie (róg Ammona) i mózdku [13].

Fakt, że gen *UBE3A* w niektórych tkankach nie jest piętnowany, a w innych podlega temu zjawisku, przejawia się obecnością dwóch rodzajów transkryp-

tów: niepiętnowanych — pochodzących z obu rodzicielskich kopii oraz piętnowanych — matczynej kopii mRNA.

Regulacja ekspresji genu *UBE3A* jest również nietypowa dla piętnowanego genu. Analiza wzorów metylacji alleli matczynej i ojcowskiej wykazuje bowiem brak preferencji w metylacji wyspy CpG na którymkolwiek z rodzicielskich homologów [11]. Najnowsze badania genu *UBE3A* wskazują, że w regulację ekspresji piętnowanych genów zaangażowane są sensowne i antysensowne transkrypty tego genu [14]. Pierwotny transkrypt *UBE3A* nie podlega wycinaniu intronów i pochodzi tylko z antysensownej nici. Obejmuje on przynajmniej połowę genu, od eksonu 11 (wg najnowszej numeracji „po kolei”) do końca 3’, oraz dodatkową sekwencję położoną dystalnie w stosunku do 3’ końca. Transkrypt ten ma wielkość 6,5 kb (Ryc. 4). W mózgu, gdzie gen *UBE3A* wykazuje ojcowskie piętno genomowe (ekspresji ulega matczyzna kopia genu), antysensowny

transkrypt powstaje tylko z alleli ojcowskich, czyli wykazuje piętno matczyne. Oznacza to, że wzór rodzicielskiego piętna genomowego antysensownego transkryptu jest przeciwny do wzoru GI samego genu. Brak tego transkryptu w komórkach mózgu mógłby więc powodować, że gen *UBE3A* byłby transkrybowany z obu rodzicielskich alleli, co jest obserwowane w innych niż mózgowy tkankach ludzkiego organizmu [15]. Nie jest jednak znany mechanizm, w jaki antysensowny transkrypt warunkuje w komórkach mózgu ekspresję *UBE3A* tylko z matczynej kopii allelu.

III-1.3. Mutacje w genie *UBE3A*

Mutacje, znalezione dotychczas w genie *UBE3A*, rozproszone są na całym obszarze ulegającym translacji (Ryc. 5) [16]. Są zróżnicowane zarówno pod względem typu jak i pochodzenia.

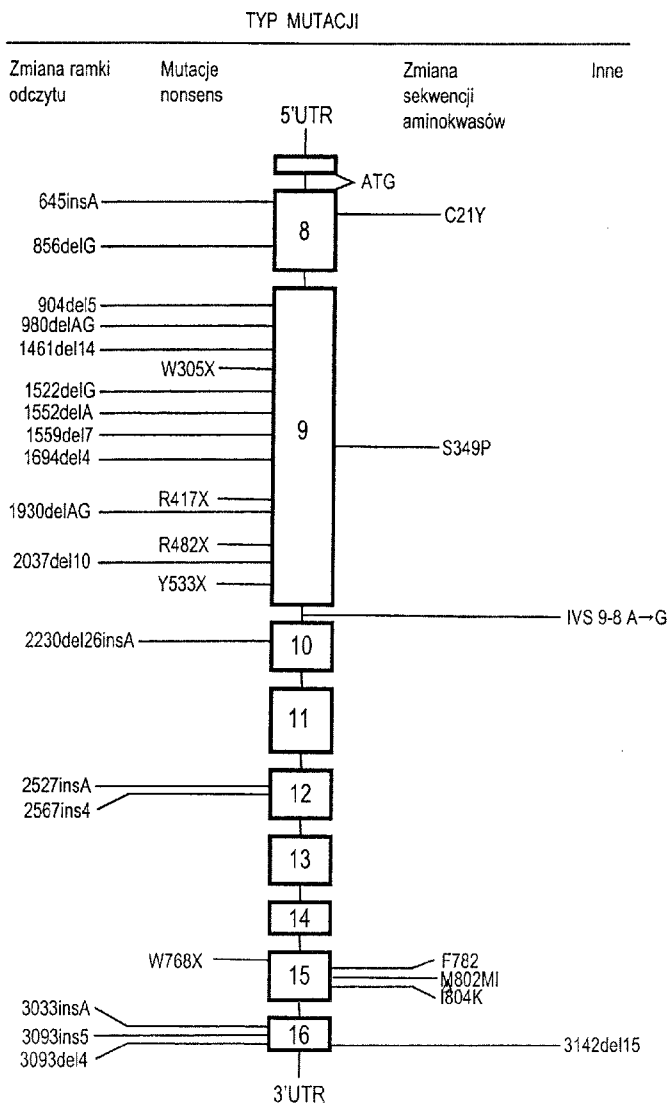
Do końca 1999 roku wykryto 41 mutacji w genie *UBE3A*. Zmiany mają głównie charakter mikrodelecji powodujących zmiany sensu oraz zmiany typu nonsens. Zdecydowana większość mutacji w genie *UBE3A* prowadzi do przedwczesnej terminacji translacji na skutek zmiany ramki odczytu. W 42% przypadków mutację stanowią delecje o wielkości od 1-26 nukleotydów. Drugą pozycję pod względem częstości występowania zajmują insercje. Największą zmienność wykazują eksony 9 i 16, co może być uwarunkowane ich wielkością i pozycją w genie.

III-2. Mutacje regulatorowe rodzicielskiego piętna genomowego w regionie IC

Za prawidłową ekspresję piętnowanego regionu 15q11-13 odpowiedzialny jest element regulatorowy IC, którego szczególnie silną ekspresję obserwuje się w komórkach mięśnia sercowego i mózgu (Ryc. 6).

IC znajduje się w odległości około 160 kb od końca 5’ genu *SNRPN* i wykazuje dwuczęściową strukturę. Składa się z regionu PWS-SRO o wielkości <4,3 kb obejmującego wyspę CpG genu *SNRPN* oraz z regionu AS-SRO (880 bp) położonego dystalnie w stosunku do alternatywnego eksonu IC3 [17].

Delecje *de novo* obejmujące obszar AS-SRO stanowią mutacje regulatorowe rodzicielskiego piętna genomowego [18]. Uniemożliwiają one zmianę wzoru GI z ojcowskiego na matczynej w żeńskiej linii komórek rozrodczych. W przypadkach rodzinnych AS, mikrodelecja powstaje w czasie spermatogenezy u dziadka chorego dziecka od strony matki. Defekt w IC przekazany matce (bezobjawowy nosiciel) uniemożliwia zmianę wzoru GI z ojcowskiego na mat-

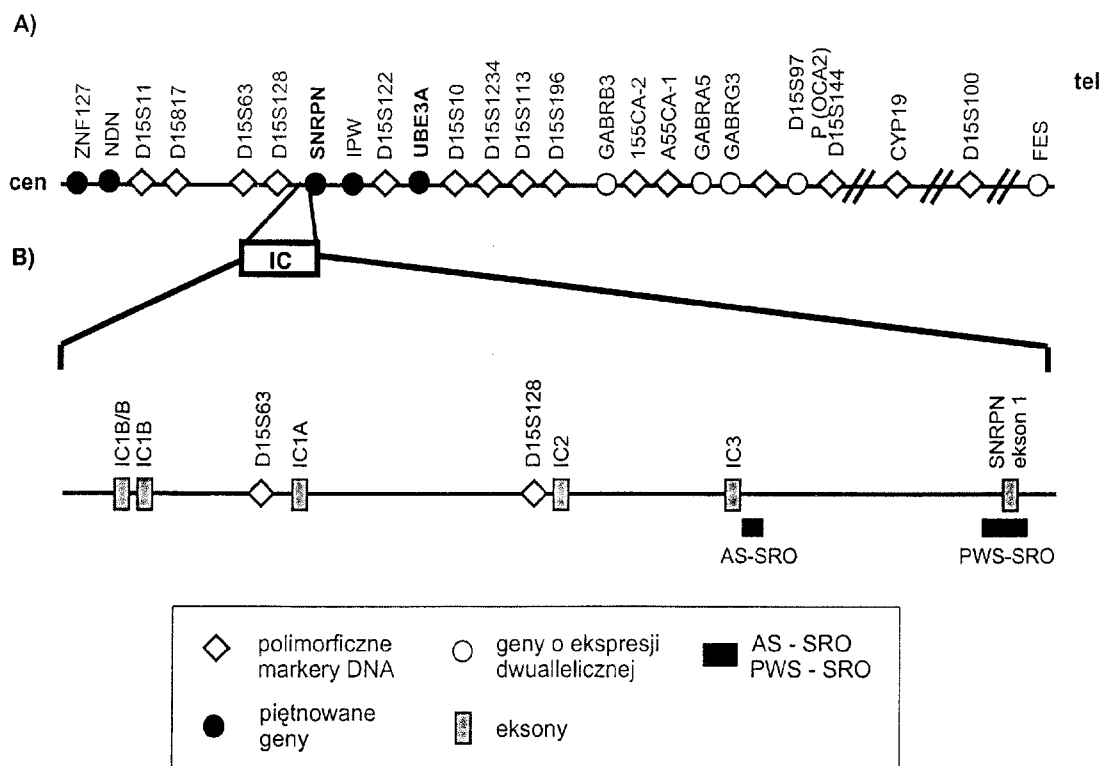


Ryc. 5. Mapa mutacji w genie *UBE3A*. Schemat zachowuje proporcje wielkości eksonów od 8-16; początkowe eksony od 1-7 zostały pominięte; introny nie zachowują proporcji.

czynny (właściwy dla płci żeńskiej) w czasie oogenezy. Haplotyp komórek linii płciowej matki obarczony jest więc błędnym wzorem piętna na chromosomie 15 na skutek mikrodelecji w IC. Dzieci bezobjawowych nosicieli dziedziczą nieaktywne allele, co ujawnia się fenotypem AS.

Nie zawsze przyczyną defektów rodzicielskiego piętna genomowego powodujących AS są mikrode-

Analiza metylacji DNA jest wstępnym badaniem molekularnym umożliwiającym weryfikację rozpoznania klinicznego AS. W badaniu tym wykorzystuje się fakt specyficznej metylacji rodzicielskich alleli genów położonych w kierunku 5' od *UBE3A* w piętnowanym regionie 15q, co umożliwia rozróżnienie metylowanego chromosomu 15 pochodzącego od matki od chromosomu niemetylowanego — pocho-



Ryc. 6. Schemat chromosomu 15q. A — Układ genów i znanych markerów DNA na chromosomie 15q. B — Mapa fizyczna centrum piętnowania. Oznaczenia: tel — telomer, cen — centromer.

lece w IC. Opisano chorych z AS, wykazujących nieprawidłowy wzór metylacji DNA, u których nie stwierdza się zmian strukturalnych w IC, i którzy dziedziczą chromosom z nieprawidłowym wzorem piętna genomowego od babci chorego dziecka ze strony matki (w przeciwieństwie do chorych z mikrodelecją w IC, dziedziczących chromosom z mutacją od dziadka ze strony matki). Znaleziono dotąd IM, nie powodujące zmian strukturalnych w IC, miały charakter sporadyczny [18, 19].

IV. Diagnostyka molekularna AS

AS jest chorobą nieuleczalną, jednak wczesna diagnoza umożliwia zapobieganie niektórym jej skutkom. Szerokie spektrum defektów molekularnych w regionie 15q11-13 prowadzących do ekspresji AS sprawia, że diagnostyka molekularna tego zespołu jest zróżnicowana i wieloetapowa.

dzenia ojcowskiego. Zmiany wzoru metylacji DNA obserwowane są u chorych z AS z dużymi delecjami w regionie 15q, z matczyną disomią chromosomu 15 i z mutacją regulatorową w regionie IC.

Wśród chorych wykazujących nieprawidłowy wzór metylacji DNA, identyfikację defektu rozpoczyna się od poszukiwania delecji, gdyż stanowią one przeważającą liczbę przypadków AS.

Brak delecji sugeruje możliwość występowania jednorodzicielskiej disomii. Identyfikacja UPD oparta jest na analizie polimorfizmu mikrosatelitów — badaniu o charakterze rodzinnym tj. u chorego i członków jego rodziny. Jako markery wykorzystuje się zmiany polimorficzne określające indywidualny charakter badanej cząsteczki DNA. Porównuje się sposób dziedziczenia markera polimorficznego w rodzinie chorego.

Nieprawidłowy wzór metylacji DNA u chorych z AS, u których nie wykryto delecji lub UPD, sugeruje

Tabela 1

Ryzyko genetyczne dla poszczególnych rodzajów defektów molekularnych w zespole Angelmana.

| Rodzaj defektu molekularnego | Ryzyko genetyczne AS |
|---|---------------------------------|
| Rozległa delecja 15q | 1% (populacyjne) |
| Disomia chromosomu 15 | ~ 2% |
| Mutacja punktowa powstała <i>de novo</i> w genie UBE3A | 1% (populacyjne) |
| IM — mikrodelecja w IC gdy nosicielem jest jedno z rodziców (forma dziedziczna) | do 50% |
| IM bez stwierdzonej mikrodelecji w IC | bliskie 1% (populacyjne) i ≤ 5% |
| Mutacje recesywne lub dominujące czynników trans-aktywnych | 25 — 50% |

występowanie IM. Wówczas poszukiwane są mikrodelecje w regionie IC lub gdy ich brak, przeprowadzana jest analiza segregacji haplotypów, umożliwiająca zidentyfikowanie chromosomu z nieprawidłowym wzorem piętna genomowego i prześledzenie sposobu dziedziczenia go w rodzinie.

Pacjenci z obrazem klinicznym odpowiadającym AS, u których wykluczono występowanie delecji, UPD i IM mogą mieć mutacje w genie *UBE3A*. Poszukiwanie nowych mutacji w tym genie wymaga zastosowania jednej z metod przesiewowych a następnie sekwencjonowania określonych fragmentów DNA.

V. Uwagi końcowe

Podłoże molekularne zespołu AS nadal nie jest do końca wyjaśnione. Zagadką pozostają mutacje regulatorowe u chorych z AS, u których nie stwierdza się delecji w IC. Nie wyjaśniona jest również rola alternatywnych transkryptów w regulacji ekspresji *UBE3A*, uwarunkowanej rodzicielskim piętnem genomowym. Mimo to, możliwa jest diagnostyka molekularna AS odgrywająca główną rolę w poradnictwie genetycznym (Tabela 1) i będąca podstawą do zastosowania leczenia objawowego skutków tej choroby.

Artykuł otrzymano 13 września 1999 r.

Zaakceptowano do druku 8 stycznia 2001 r.

Piśmiennictwo

- Engel E (1980) *The Am Soc Hum Genet* 6: 137-143
- Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J (1997) *Nat Genet* 15: 70-73
- Jones P (1999) *TIG* 15:34-37
- Razin A, Cedar H (1994) *Cell* 77:473-476
- Feil R, Khosla S (1999) *TIG* 15:431-435

- Mignom C, Malzac P, Moncla A, Depertis D, Roeckel N, Croquette M, Mattei M (1996) *Eur J Hum Genet* 4: 88-100
- Nakao M, Sutcliffe J, Durtchi B, Mutirangura A, Ledbetter D, Beaudet A (1994) *Hum Mol Genet* 2: 309-315
- Vu T, Hoffman A (1997) *Nat Genet* 17:12-13
- Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J, Tsai T-F, Beaudet A L (1999) *Am J Hum Genet* 65: 1-6
- Nawaz Z (1999) *Mol Cell Biol* 19: 1182-1189
- Sutcliffe J, Jiang Y, Galjaard R, Matsuura T, Fang P, Kubota T, Christian SL, Bressler J, Cattanach B, Ledbetter D, Beaudet A (1997) *Genome Res* 7: 368-377
- Rougeulle C, Glatt H, Lalonde M (1997) *Nat Genet* 17: 14-15
- Albrecht U, Sutcliffe J, Cattanach B, Beechey C, Armstrong D, Eichelen G, Beaudet A (1997) *Nat Genet* 17: 75-78
- Rougeulle C, Cardoso C, Fontés M, Colleaux L, Lalonde M (1998) *Nat Genet* 19: 15-16
- Matsuura T, Sutcliffe J, Fang P, Galjaard R, Jang Y, Benton C, Rommens J, Beaudet A (1997) *Nat Genet* 15: 74-77
- Fang P, Lev-Lehman E, Tsai T, Matsuura T, Benton C, Sutcliffe J, Christian S, Kubota T, Halley D, Meijers-Heijboer H, Langlois S, Graham Jr J, Beuten J, Willems P, Ledbetter D, Beaudet A (1999) *Hum Mol Genet* 8: 129-135
- Färber C, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B (1999) *Hum Mol Gene* 2: 337-343
- Buiting K, Dittrich B, Groß S, Lich C, Färber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Bürger J, Nöthen M, Barth-Witte U, Janssen B, Abeliovich D, Lerer I, van den Ouweland A, Halley D, Schrander-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalonde M, Nicholls R, Friend K, Schulze A, Matthijs G, Kokkonen H, Hilbert P, van Maldergem L, Glover G, Carbonell P, Willems P, Gillessen-Kaesbah G, Horsthemke B (1998) *The Am Soc Hum Genet* 63: 170-180
- Bürger J, Buiting K, Dittrich B, Groß S, Lich C, Sperling K, Horsthemke B, Reis A (1997) *The Am Soc Hum Genet* 61: 88-93

Uzupełnienie

Po oddaniu pracy do redakcji ukazały się istotne dla omawianych zagadnień artykuły:

- Reik W, Walter J (2000) *Nat Rev* 2: 21-32
Shemer R (2000) *Nat Genet* 26: 440-443

Dinukleozydopolifosforany: występowanie, metabolizm i funkcje

Dinucleoside polyphosphates: occurrence, metabolism and function

MARLENA SZALATA

Spis treści:

- I. Struktura dinukleozydopolifosforanów
- II. Odkrycie
- III. Występowanie
- IV. Przemiany dinukleozydopolifosforanów
 - IV-1. Biosynteza
 - IV-2. Degradacja
 - IV-2.1. Enzymy typu MutT/Nudix
 - IV-2.2. Enzymy typu HIT
- V. Funkcje
 - V-1. Dinukleozydopolifosforany w neurotransmisji
 - V-2. Regulacja układu sercowo-naczyniowego przez dinukleotydy
 - V-3. Oddziaływanie z białkami
 - V-4. Dinukleozydopolifosforany w stresie
 - V-5. Stosunki ilościowe Ap3A i Ap4A a funkcje komórki
- VI. Zakończenie

Wykaz skrótów: Ap₂A — adenozyνο(5')difosfo(5')adenozy-na; Ap₃A — diadenozyνο-5',5'''-P¹,P³-trifosforan = adenozy-no(5')trifosfo(5')adenozy-na; Ap₄A — diadenozy-no-5',5'''-P¹,P⁴-tetrafosforan = adenozyνο(5')tetrafosfo(5')ade-nozy-na; Ap₅A — adenozyνο(5')pentafosfo(5')adenozy-na; Ap₆A — adenozyνο(5')seksfafosfo(5')adenozy-na; Ap₇A — adenozyνο(5')septafosfo(5')adenozy-na; Ap_nA — adenozy-no(5')oligofosfo(5')adenozy-na; Ap_nG — adenozyνο(5')oligo-fosfo(5')gwanozyna; Ap₃N — adenozyνο(5')trifosfo(5')nukle-ozyd; Ap₄N — adenozyνο(5')tetrafosfo(5')nukleozyd; cAMP — cykliczny AMP; DIPP — fosfohydrolaza polifosforanu di-fosfoinozytolu; FHIT gen kodujący białko Fhit z „łamlwym, motywem HIT (ang. *fragile histidine triad*); Gp₃G — gwanozy-no(5')trifosfo(5')gwanozyna; Gp₄G — gwanozyνο(5')tetrafosfo(5')gwanozyna; Gp₅G — gwanozyνο(5')pentafosfo(5')gwa-nozy-na; Gp_nG — gwanozyνο(5')oligofosfo(5')gwanozyna; HIT — triada histydynowa; Np_nN', dinukleozydopolifosforany = nukle-ozydo(5')oligofosfo(5')nukleozyd = P¹,Pⁿ-bis(5'-nukleozydy-

Mgr, Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań i Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Contents:

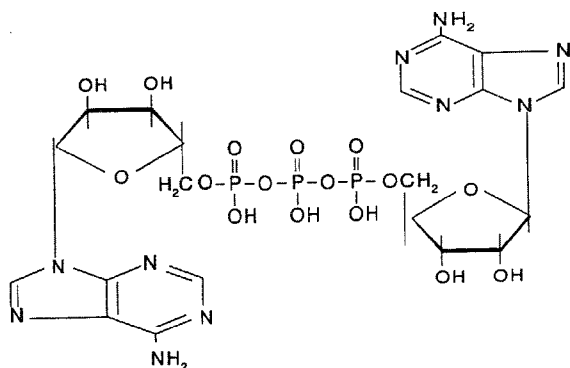
- I. Structure of dinucleoside polyphosphates
- II. Discovery
- III. Occurrence
- IV. Metabolism of dinucleoside polyphosphates
 - IV-1. Biosynthesis
 - IV-2. Degradation
 - IV-2.1. Enzymes of the MutT/Nudix type
 - IV-2.2. Enzymes of the HIT type
- V. Function
 - V-1. Dinucleoside polyphosphates as neurotransmit-
ters
 - V-2. Regulation of cardiovascular system by dinucleoti-
de
 - V-3. Interaction with proteins
 - V-4. Dinucleoside polyphosphates in stress
 - V-5. Quantitative relationship Ap3A to Ap4A and cell
function
- VI. Conclusions

lo)oligofosforan; PP-InsP₅ — pentafosforan difosfoinozytolu; (PP)₂-InsP₄ — tetrafosforan bis(difosfoinozytolu); Up₂U — ury-dylo(5')difosfo(5')urydyna.

I. Struktura dinukleozydopolifosforanów

Dinukleozydopolifosforany zbudowane są z dwóch nukleozydów purynowych lub pirymidyno-wych, identycznych lub różnych, połączonych łańcuchem polifosforanowym poprzez wiązanie fosfoestrowe w pozycjach 5' (Ryc. 1). Oficjalna che-miczna nazwa tej klasy związków określona przez komisję IUPAC-IUB w 1977 r. to: nukleozy-do(5')oligofosfo(5')nukleozyd lub P¹,Pⁿ-bis(5'-nu-kleozydylo)oligofosforan, np. Ap₄A to adenozy-no(5')tetrafosfo(5')adenozy-na. W literaturze wystę-puje także na równych prawach starsze nazewnictwo: diadenozyνο-5',5'''-P¹,P⁴-tetrafosforan [1]. Najczęściej spotykane są polifosforany diadenozy-nowe połączone resztami fosforanowymi, których liczba waha się między 2 do 7, a spośród nich najczę-ściej występują: diadenozyνο-5',5'''-P¹,P⁴-tetrafos-

foran (Ap₄A) oraz diadenozyno-5',5'''-P¹,P³-trifosforan (Ap₃A). Dla uproszczenia stosuje się skrót Np_nN', gdzie n oznacza liczbę fosforanów.



Ryc. 1. Struktura diadenozyno-5',5'''-P¹,P³-trifosforanu, Ap₃A.

II. Odkrycie

Pierwsze doniesienia dotyczące dinukleozydopolifosforanów (Np_nN') pochodzą z 1953 r. Uzyskano wówczas, jako produkty uboczne podczas syntezy ApU, Ap₂A oraz Up₂U [2, 3]. Dopiero 10 lat później wykazano występowanie dinukleozydopolifosforanów w żywych organizmach [4]. Jako pierwsze wy-

Tabela 1

Występowanie dinukleozydopolifosforanów

| Np _n N | Występowanie |
|--|---|
| Ap ₂ A | Mięsień sercowy [25] |
| Ap ₃ A | Prokariota i Eukariota [23, 25, 34], mięsień sercowy [25], płytki krwi [35, 24-29] |
| Ap ₄ A | <i>Salmonella typhimurium</i> [11], inne Prokariota [23], organ elektryczny <i>Torpedo</i> [36], płytki krwi [24, 37], mięsień sercowy [25], pęcherzyki synaptyczne [26, 31, 38], ziarnistości chromochłonne [25, 26, 39], rdzeń nadnerczy [26, 31], różne Eukariota [21, 23, 40] |
| Ap ₅ A | Organ elektryczny <i>Torpedo</i> [36], pęcherzyki synaptyczne [26, 31, 38], płytki krwi [41], ziarnistości chromochłonne [26, 30, 39] |
| Ap ₆ A | Płytki krwi [26, 41], ziarnistości chromochłonne [26, 30, 39] |
| Ap ₇ A | Płytki krwi [27] |
| Ap _n G (n=3-7), Ap _n N | Płytki krwi [42, 27], Prokariota i Eukariota [4, 6, 23, 40] |
| Gp _n G (n=3-6) | Prokariota [15], skorupiaki [4, 6, 43, 44], płytki krwi [42, 27] |
| Cp ₄ U, Up ₄ U, Cp ₄ C, Gp ₄ U, Gp ₄ C | Prokariota [15] |

kryto Gp₄G oraz Gp₃G w otorbionych, odwodnionych embrionach krewetki *Artemia salina* [6]. Powstawanie związków typu Ap₄A *in vitro* zostało zaobserwowane podczas działania syntetazy lizylo-tRNA [5]. W latach 70-tych wzrosło zaintereso-

wanie dinukleozydopolifosforanami ze względu na udział w syntezie DNA [7-10] i odpowiedzi na stres [11-15]. Intensywniejszy rozwój badań wiąże się z odkryciem genu *FHIT* (ang. *fragile histidine triad*), będącego prawdopodobnie supresorem rozwoju nowotworów, kodującego białko wykazujące aktywność hydrolazy Ap₃A [16-20].

III. Występowanie

Dinukleotydy występują powszechnie we wszystkich organizmach (Tabela 1). Dinukleozydopolifosforany są bardziej stabilne niż ATP i ADP, a ich stężenie w komórkach wyższych organizmów wynosi od 0,01 do 1 μM [21-24]. U niektórych bakterii i drożdży (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*) stężenie dinukleozydopolifosforanów w komórkach może wzrosnąć w czasie stresu termicznego nawet powyżej 100 μM [23, 24].

Pośród wielu dinukleozydopolifosforanów w płytkach krwi człowieka, jako pierwsze zostały zidentyfikowane Ap₃A i Ap₄A [24]. W organizmie człowieka wykryto ponadto obecność innych dinukleozydopolifosforanów: Ap₂A [23], Ap₅A, Ap₆A [26], Ap₇A [27], Ap_nG (n=3-6), Gp_nG (n=3-6) [27].

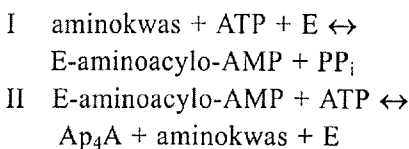
Dinukleotydy występują w gęstych ziarnistościach płytek krwi człowieka (ang. *platelet dense granules*) [24-29], jak również w ziarnistościach chromochłonnych (ang. *chromaffin granules*) [26, 30], cholinergicznych pęcherzykach synaptycznych [26,31], sy-

naptosomach śródmózgowia [31-33], mięśniu sercowym [25], rdzeniu nadnerczy [26, 31]. Taka lokalizacja może świadczyć o istotnym znaczeniu Np_nN' w przemianach.

IV. Przemiany dinukleozydopolifosforanów

IV-1. Biosynteza

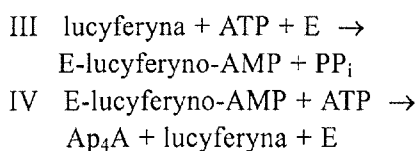
Enzymatyczna synteza Ap_4A została po raz pierwszy wykazana w 1966 roku w laboratorium Z a m e c n i k a podczas badania właściwości syntetazy lizylo-tRNA z *E. coli* [5]. Katalizuje ona dwustopniową reakcję [45]:



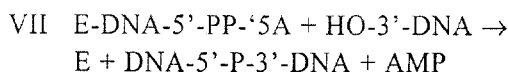
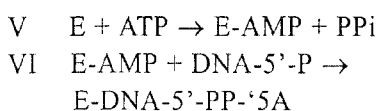
Chociaż większość przebadanych syntetaz aminoacylo-tRNA u zwierząt, drożdży i bakterii jest zdolna do tworzenia Np_nA jako produktów ubocznych, to tylko kilka z nich syntetyzuje je z większą wydajnością [45]. Są to syntetazy: lizynowa [5, 45, 46], fenyloalaninowa [45, 47] i alaninowa. Nie jest jasne, dlaczego u roślin tylko nieliczne syntetazy (serynowa i fenyloalaninowa) mogą syntezować Np_nA [47].

Adenozynotetrafosforan (p_4A) i adenozynopentaosforan (p_5A) syntetyzuje inny znany enzym, syntetaza acylo-CoA z *Pseudomonas fragi* [EC 6.2.1.8]; z mniejszą zaś wydajnością także Ap_4A , Ap_5A oraz Ap_4N [48].

Dinukleozydopolifosforany można wydajnie otrzymywać wykorzystując lucyferazę ze świetlika [EC 1.13.12.7], która przenosi reszty adenylowe na polifosforany (P_3 , P_4) lub na NTP, co prowadzi do powstania odpowiednio p_nA , ($n=3-20$) oraz Ap_nN , ($n=4-16$) [49]. Reakcja przebiega następująco:



Niektóre ligazy, jak ligaza DNA faga T4 [EC 6.5.1.1] [50] i ligaza RNA faga T4 [EC 6.5.1.3] [51] katalizują również syntezę Ap_nN (z ATP i NTP) lub p_nA (z ATP i P_3), pod nieobecność DNA lub RNA w próbie badanej. Ligaza DNA faga T4 katalizuje trój-etapową reakcję:



Do tej pory nie wykazano obecności enzymów syntetyzujących wyłącznie dinukleozydopolifosforany.

IV-2. Degradacja

Opisano wiele enzymów u ssaków, roślin, niższych eukariontów i prokariotów, zdolnych do specyficznej degradacji określonych dinukleotydów [52]. W tym procesie biorą również udział fosfodiesterazy, które niespecyficznie rozpoznają substrat. Enzymy wewnątrzkomórkowe (głównie hydrolazy i fosfatazy — Tabela 2) wykazują bardzo dużą specyficzność wobec dinukleozydopolifosforanów. Zewnątrzkomórkowe enzymy, zarówno rozpuszczalne jak i związane z powierzchnią komórki wydają się być mniej specyficzne [26, 53]. Formy rozpuszczalne są prawdopodobnie izoenzymami alkalicznej fosfodiesterazy [EC 3.1.4.1]. Wśród nich jest wydzielana na zewnątrz hydrolaza diadenozynopolifosforanów (ang. *ecto(diadenosine polyphosphate) hydrolase*), *ecto- Ap_nA ase*) związana z błoną plazmatyczną [53, 54].

Enzymy rozkładające Np_nN można klasyfikować ze względu na budowę miejsca wiązania nukleotydów na zawierające domenę HIT (od ang. *histidine triad*) lub motyw MutT/Nudix (Ryc. 2). Jedynym znanym enzymem degradującym Np_nN , podobnym z kolei do rodziny fosfataz serynowo-treoninowych, jest symetryczna hydrolaza Ap_4A z *E. coli*, kodowana przez gen *apaH*.

IV-2.1 Enzymy typu MutT/Nudix

Enzymy zawierają w miejscu katalitycznym wiązania nukleotydów, wysoce konserwatywną sekwencję $GX_5EX_7REUXEEXGU$, gdzie U oznacza I, L lub V, a arginina jest jednym z czterech wysoce konserwatywnych aminokwasów. Sekwencja ta została wcześniej wyróżniona dla prokariotycznych białek MutT. Ponieważ do tej grupy należą hydrolazy Np_nN , rozkładające z większą lub mniejszą specyficznością Ap_nA , gdzie $n=4-6$ [55-56], zaproponowano dla nich nazwę hydrolazy Nudix (ang. *nucleoside diphosphate linked to some X moiety*). Motyw MutT/Nudix tworzy unikatową strukturę pętla-helisa-pętla umożliwiającą wiązanie dinukleozydopolifosforanów [57].

Do białek zawierających motyw MutT/Nudix należą hydrolazy Ap_4A występujące w tkankach człowieka, APAH1 [55], w tkankach świni [58], w

tkankach łubinu [59], jak i jęczmienia [60]. Także hydrolazy Ap₆A reprezentowane przez białko Aps1 z *Schizosaccharomyces pombe* [61-62], jak i kodowane przez gen *yor163w* z *S. cerevisiae* [56, 62] zawierają ten motyw.

Bardzo ciekawym przykładem jest białko infekcyjne Ia1A z *Bartonella bacilliformis* [56, 63], które podobnie jak eukariotyczne hydrolazy Ap₄A, hydrolizuje substrat asymetrycznie.

Fosfohydrolaza polifosforanu difosfoinozytolu DIPP (ang. *diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase*) katalizuje tak różne substraty jak Ap₆A oraz pentafosforan difosfoinozytolu PP-InsP₅, (ang. *diphosphoinositol pentakisphosphate*) i tetrafosforan bis(difosfoinozytolu) (PP)₂-InsP₄ (ang. *bis-diphosphoinositol tetrasphosphate*) [64]. Porównując strukturę tego enzymu z innymi białkami hydrolizującymi diadenozynopolifosforany i difosfoinozytolopolifosforany (Aps1 z *S. pombe* i *yor163w* z *S. cerevisiae*) wysunięto hipotezę, że to samo centrum aktywne fosfohydrolazy polifosforanu difosfoinozytolu DIPP czynne jest w procesie hydrolizy zarówno Ap_nA jak i difosfoinozytolopirofosforanów [56, 62, 64]. Motyw Nudt (ang. *Nudix-type*), zawierający wysoce konserwatywne reszty glutaminowe, otoczony jest sekwencjami flankującymi bogatymi

w reszty glicynowe (motywy GR1 i GR2). Wydaje się, że aktywność enzymu wobec tak różnych substratów wynika z obecności sekwencji bogatej w glicynę w pobliżu końca C białka (motyw GR2, GX₂GX₆G). Białka nie hydrolizujące polifosforanów difosfoinozytolu, takie jak: APAH1 u człowieka czy Ia1A z *B. bacilliformis*, nie posiadają motywu GR2 [64].

IV-2.2 Enzymy typu HIT

Białka HIT zawierają w pobliżu końca C trzy reszty histydynowe (ang. *histidine triad*) HXHXHXX, gdzie X stanowią aminokwasy hydrofobowe. Początkowo przypuszczano, że motyw HIT tworzy miejsce wiązania jonów cynku [65]. Wydaje się, że motyw ten uczestniczy w wiązaniu nukleotydów [18]. Wśród rodziny białek HIT wyróżnia się białka Hint (ang. *histidine triad nucleotide-binding protein*), występujące u wszystkich organizmów. Przykładem takich enzymów są nukleotydylotransferazy (ang. *nucleotidyl transferases*) oraz hydrolazy o bliżej nie sprecyzowanych substratach.

Pozostałe białka HIT są charakterystyczne tylko dla organizmów eukariotycznych [17, 18, 66]. Przykładem jest hydrolaza Ap₃A w tkankach

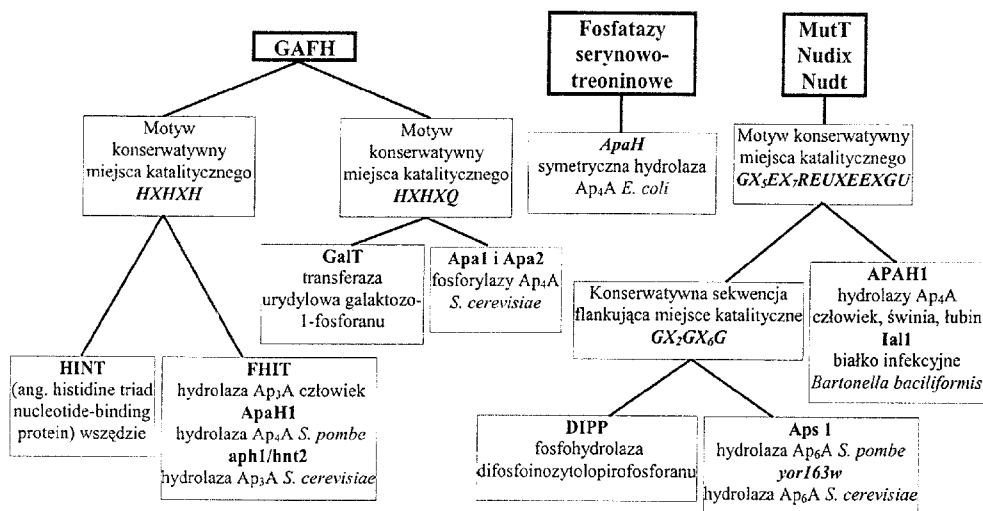
Tabela 2

Enzymy biorące udział w katabolizmie dinukleozydopolifosforanów.

| Enzym | Substrat | Katalizowana reakcja | Piśmiennictwo |
|--|--|--|--|
| Fosforylaza Ap ₄ A I [EC 2.7.7.53] Fosforylaza Ap ₄ A II Fosforylaza Ap ₃ A/Ap ₄ A | Ap ₄ A, Ap ₃ A | Ap ₄ A + P _i ↔ ATP + ADP | [73, 74] [69, 71, 75, 76, 77] [75, 78] |
| Symetryczna pirofosfohydrolaza Ap ₄ A [EC 3.6.1.41] | Ap ₄ A | Ap ₄ A → 2 ADP | [78-82] |
| Asymetryczna pirofosfohydrolaza Ap ₄ A [EC 3.6.1.17] | Ap ₄ A | Ap ₄ A → ATP + AMP | [4, 19, 55, 59, 60, 74, 81, 83-90] |
| Hydrolaza dinukleozydopolifosforanów Ia1A | Ap ₄ A, Ap ₅ A, Ap ₆ A, Gp ₄ G, Gp ₅ G, p ₄ A, p ₅ A | Ap ₆ A → 2 ATP Ap ₄ A → ATP + AMP | [63, 91] |
| Hydrolaza Ap ₃ A [EC 3.6.1.29] | Ap ₃ A | Ap ₃ A → ADP + AMP | [16, 17, 20, 72, 48, 78, 81, 85, 92-98] |
| Hydrolaza Ap ₆ A Fosfohydrolaza polifosforanu difosfoinozytolu DIPP | Ap ₆ A, Ap ₅ A, p ₄ A, p ₅ A, PP-InsP ₅ , (PP) ₂ InsP ₄ PP-InsP ₅ , (PP) ₂ InsP ₄ , Ap ₆ A | Ap ₆ A → p ₄ A + ADP Ap ₆ A → 2 ATP Ap ₆ A → AMP + ADP | [56, 61, 62] [62, 64] |
| Fosfodiesteraza I [EC 3.1.4.1] Oligonukleotyda [EC 3.1.13.3] Nukleotydropirofosfataza [EC 3.6.1.9] 5' nukleotyda [EC 3.1.3.5] | cAMP, ATP, ADP, Ap ₃ A, Ap ₄ A | Ap ₃ A → AMP + ADP | [24, 52, 54, 85, 99, 100] [100] [99] [92] |
| Zewnętrzne nukleotydyazy, Ap _n A-azy | Ap _n A, ATP, ADP, ADP | Ap _n A → AMP + Ap _(n-1) | [30, 53, 54] |

człowieka, kodowana przez gen *FHIT*, hydrolaza Ap_4A kodowana przez gen *apaH1* z *S. pombe* [19, 67], jak również analog hydrolazy Ap_3A występujący w komórkach *S. cerevisiae*, a kodowany przez gen *aph1/hnt2* [68].

rek i tkanek zwięzają i rozszerzają naczynia krwionośne, regulują agregację i rozpad płytek krwi [24, 29, 26, 31, 54]. Wpływają również na podziały komórek [97, 105], ich różnicowanie i apoptozę komórek [98, 101]. Prowadzone są bardzo intensywne ba-



Ryc. 2. Klasyfikacja enzymów degradujących Ap_nA w zależności od budowy miejsca katalitycznego.

Białka zawierające glutaminę w miejsce ostatniej histydyny (HXHXQ) charakteryzują się strukturą i mechanizmem reakcji podobną do białek typu HIT [16, 17, 43, 53]. Do tej grupy należy białko GalT, będące transferazą urydyliłową galaktozo-1-fosforanu [EC 2.7.7.12] (ang. *galactose-1-phosphate uridylyltransferase*) czy fosforylaza Ap_4A . U niższych eukariontów nie zawierających hydrolazy Ap_4A może występować jedna lub więcej fosforylaz Ap_4A [69-71]. U *S. cerevisiae* występują dwie fosforylazy: Apa1 i Apa2 kodowane odpowiednio przez geny *apa1* i *apa2*. Na podstawie struktury trójwymiarowej powyższych enzymów wyróżniono białka typu GAFH, których nazwę utworzono z pierwszych liter nazw enzymów (z ang. *GalT*, *Ap4A phosphorylase*, *FHIT*, *Hint*) [66, 72].

V. Funkcje dinukleozydopolifosforanów

Dinukleozydopolifosforany są przypuszczalnie ważnymi sygnałami zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi, ale równie dobrze mogą być uważane za zbędne, toksyczne metabolity, powstające w warunkach stresowych. Dinukleozydopolifosforany mogą zaburzać procesy zależne od ATP. Uczestniczą w wielu procesach zachodzących na poziomie komórek i organizmu, np. stymulują syntezę DNA, regulują mitozę, aktywują transkrypcję genów [98, 101]. W błonach regulują poziom wapnia, hamują działanie kanału potasowego [102-104]. Na poziomie komór-

dania nad udziałem dinukleozydopolifosforanów w neurotransmisji [105, 106].

V-1. Dinukleozydopolifosforany jako neurotransmitery

Dinukleozydopolifosforany spełniają wszystkie kryteria chemicznych transmiterów. 1) Przechowywane są razem z acetylocholiną i katecholaminami. 2) Uwalniane są w wyniku stymulacji zakończeń synaptycznych. 3) Posiadają specyficzne receptory. 4) Inaktywowane są przez zewnętrzne nukleazy [53]. Ap_nA działają jako zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe poprzez interakcje z receptorami adenyzy typu A1 [107, 108], podtypem P2 receptorów purynowych [26, 32, 33, 109] i/lub przez specyficzne receptory dinukleozydopolifosforanów, niewrażliwych na antagonistów ATP [32, 33, 109], inicjując lub zmieniając wiele procesów biologicznych. Uwolnione dinukleozydopolifosforany (są bardziej stabilne od ATP i ADP), mogą działać bezpośrednio jako długodystansowe cząsteczki sygnałowe, dyfundując daleko od miejsca uwalniania. Nie wnikają do komórek przez nie naruszone błony komórkowe [31]. Działanie na cały organizm N_pN' może występować już przy stężeniach od 0,1 nM do 1 μM , a lokalnie w miejscu uwalniania stężenie może dochodzić nawet do 100 μM [24]. Dinukleozydopolifosforany mogą również działać pośrednio przez produkty swojej degradacji [24, 26]. Enzymy rozkładające

dinukleozydopolifosforany pełnią więc podwójną funkcję: w terminacji sygnału oraz w tworzeniu pu-rynergicznie aktywnych produktów, takich jak: ATP, ADP czy AMP [26, 53]. Ap_nA ($n=4-6$) inhibują agregację płytek krwi indukowaną przez ADP. Ap_3A w niskich stężeniach działa jako proagonista aktywacji płytek krwi [26]. Z kolei ATP i ADP mogą wpływać na tempo hydrolizy Ap_nA we krwi poprzez inhibicję odpowiednich hydrolaz [53].

V-2. Regulacja układu sercowo-naczyniowego przez dinukleotydy

Dinukleozydopolifosforany są uwalniane z płytek krwi podczas ich aktywacji. Lokalnie efekty zachodzą mogą przy bardzo dużych stężeniach, nawet do 100 μM , podczas gdy systemowe efekty zachodzą już przy stężeniach od 0,1 nM do 1 μM .

Dinukleozydopolifosforany, w zależności od miejsca działania i receptora, z którym się wiążą, działają jako czynniki rozszerzające lub zwężające naczynia w wątrobie, nerkach czy mięśniach gładkich [26, 27, 31]. Ap_3A pobudza agregację płytek krwi, podczas gdy Ap_nA , gdzie $n=4-6$, hamują ten proces [31]. Wskazuje to na możliwość wykorzystania analogów i antagonistów dinukleozydopolifosforanów w celach terapeutycznych. Prowadzone są badania nad otrzymaniem stabilnych analogów Ap_4A , które dzięki właściwościom antyagregacyjnym mogłyby być bezpiecznym czynnikiem obniżającym ciśnienie [29], jednak ze względu na wielofunkcyjność dinukleozydopolifosforanów, specyficzność tkankową i gatunkową ekspresji ich receptorów, nie jest to prostym zadaniem.

V-3. Oddziaływanie z białkami

Dinukleozydopolifosforany hamują lub aktywują wiele enzymów [110]. Są inhibitorami kinazy adenyzykowej [111], kinazy adenylanowej [112], cyklazy adenylanowej [113], końcowej transferazy dezoksynukleotydylowej [114], a także polimerazy poli(ADP-rybozy) [115]. Ap_3A , Ap_4A aktywują fosforylaze glikogenu [116], deaminaze AMP [117] oraz 5'-nukleotydaze cytozolową [118]. Ap_4A oraz Gp_4G wpływają na metabolizm puryn [117], a ponadto, u *Artemia* Gp_4G i Gp_3G stanowią źródło puryn do syntezy RNA i DNA. Dinukleozydopolifosforany (Ap_nA ($n = 3-6$)) biorą udział w regulacji wzrostu komórki poprzez: aktywację genu *Egr-1*, regulację replikacji DNA: interakcje z polimerazą DNA [7, 8, 21, 26, 103, 119, 120].

U wyższych eukariontów dinukleozydopolifosforany wydają się być wewnątrzkomórkowymi przekaźnikami zewnątrzkomórkowych sygnałów. Biorą udział w odpowiedzi na glukozę w komórkach β trzustki [121]. Również stymulują glukoneogenezę w tkankach szczura [122].

Nietypowe nukleotydy wpływają na regulację kanałów potasowych wrażliwych na ATP w komórkach β i mięśniu sercowym [123, 124]. Ponadto, dinukleozydopolifosforany indukują oscylacje jonów Ca^{2+} [102] oraz regulują uwalnianie Ca^{2+} przez receptory ryanodynowe w mięśniach szkieletowych i w mózgu [103, 104]. Wszystkie Ap_nA stymulują wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia [125].

V-4. Dinukleozydopolifosforany a stres

Poziom dinukleozydopolifosforanów w cytoplazmie wzrasta w czasie stresu, stąd sugeruje się ich funkcję w regulacji cyklu komórkowego [11, 14, 126]. U organizmów prokariotycznych stwierdzono akumulację Ap_nA w warunkach stresu cieplnego [11], tlenowego oraz głodu [11, 14, 15]. W organizmach eukariotycznych związek poziomu dinukleotydy ze stanem komórki wymaga jeszcze wielu badań, nie uzyskano do tej pory jednoznacznej odpowiedzi [14, 62, 127, 128].

Ciekawym przykładem jest białko IalA u *B. bacilliformis* rozkładające między innymi Ap_4A . Dyskutowuje się możliwość ułatwiania przez to białko infekcji bakteryjnej [91]. Ap_4N wiąże się z kilkoma białkami stresowymi (DnaK, GroEL, ClpB) [120]. Wzrost poziomu Ap_4A , będącego prawdopodobnym sygnałem łączącym replikację DNA z podziałami komórki w *E. coli* [120], wywołuje przedwczesne podziały komórki, co może hamować proces infekcji. Ponadto Ap_4N może hamować lub aktywować wiele różnych enzymów. Stąd obecność dodatkowego enzymu rozkładającego Ap_4N obok konstytutywnej hydrolazy Ap_4N wydaje się być konieczna dla przeżycia bakterii [91]. Sugeruje się również, że enzym ten rozkładając Ap_4A do ATP i AMP, stwarza dodatkowe źródło zaopatrzenia w energię [91].

V-5. Stosunki ilościowe Ap_3A i Ap_4A a funkcje komórki

Niektórzy badacze sugerują, że bardzo istotny dla komórek jest stosunek Ap_3A do Ap_4A [105]. Wiadomo, że poziom Ap_4A zwiększa się w warunkach stresowych. Przypuszcza się, że Ap_3A jest składnikiem

odpowiedzi antyproliferacyjnej u ssaków, indukowanej przez interferon (Ap_3A jest koinduktorem różnicowania), podczas gdy Ap_4A , będący czynnikiem związanym z podziałami, może być antagonistą tej drogi [17]. Różne czynniki indukujące apoptozę (promieniowanie γ , bleomycyna, szok cieplny, kadm, etanol, arsenian, stres środowiskowy) powodują jednocześnie wzrost stężenia Ap_4A [13, 101, 129], podczas gdy stężenie Ap_3A zmniejsza się. Dodanie do kultury tkankowej Ap_4A wywołuje apoptozę, podczas gdy samo Ap_3A nie indukuje bezpośrednio ani apoptozy, ani różnicowania komórek. Stosunek Ap_3A/Ap_4A prawdopodobnie decyduje o podziałach, różnicowaniu i apoptozie komórek [98, 101, 105]. Elementem kluczowym może być tu białko FHIT [62, 101], będące prawdopodobnym supresorem nowotworów człowieka [16, 17, 20, 66, 97]. Gen kodujący białko FHIT (147 AA białko) znajduje się na 3 chromosomie w locus p14.2, obejmującym łamliwe miejsce *FRA3B*, w którym zaobserwowano częste delecje [67, 72, 98]. Prawdopodobnie do działania przeciwnowotworowego białka FHIT (wykazującego aktywność hydrolazy Ap_3A), wystarcza samo związanie się z substratem [17, 72, 97]. Mutacja w genie *FHIT* powodująca zamianę H \rightarrow N w kodonie 96, usuwająca aktywność hydrolazową, nie obniża jednak aktywności supresorowej [130]. Kompleks enzym-substrat bierze udział w kontroli podziałów komórki [98, 105]. Ap_3A po połączeniu z białkiem FHIT, działa antyproliferacyjnie [72, 97, 98]. Zmienia się cykl komórkowy i dochodzi do apoptozy komórek [98]. W procesie tym prawdopodobnie odgrywają rolę oddziaływania białka FHIT z mikrotubulami [20, 56].

VI. Zakończenie

Pomimo, że dinukleozydopolifosforany znane są już od ponad trzydziestu lat, wciąż niewiele wiadomo o ich funkcji. Wzrasta zainteresowanie ich udziałem w regulacji metabolizmu i przekazywaniu sygnałów w komórce.

Dinukleozydopolifosforany podlegają jednocześnie ścisłej kontroli enzymatycznej. Różnorodność efektów biologicznych wywieranych przez dinukleozydopolifosforany otwiera duże możliwości zastosowań farmakologicznych i terapeutycznych, co jednak wymaga wielu badań. Bardzo duże zainteresowanie dinukleozydopolifosforanami obserwuje się w badaniach nad nowotworami, ze względu na odkrycie powiązania mutacji genu *FHIT* z występowaniem wielu typów nowotworów, jak również znaczeniem stosunków ilościowych poszczególnych Ap_nA w

tych procesach. Inną dziedziną intensywnie rozwijającą się jest udział Np_nN w przekazywaniu sygnałów drugorzędowych w układzie krwionośnym i nerwowym. W Polsce prowadzi się badania nad enzymologią dinukleotydów. Niniejszy artykuł jest pierwszą próbą przybliżenia znaczenia dinukleozydopolifosforanów w języku polskim.

Artykuł otrzymano 28 września 2000 r.
Zaakceptowano do druku 11 stycznia 2001 r.

Piśmiennictwo

- Holler (1992) W: McLennan AG (red): Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 9-28
- Christie SMH, Elmore DT, Kenner GW, Todd AR, Weymouth FJ (1953) *J Chem Soc* **4**: 2947-2953
- McLennan AG, Zamecnik PC (1992) W: McLennan AG (red): Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 1-7
- Finamore FJ, Warner AH (1963) *J Biol Chem* **238**: 344-348
- Zamecnik PC, Stephenson ML, Janeway CM, Randerath K (1966) *Biochem Biophys Res Commun* **24**: 91-97
- Gilmour SJ, Warner AH (1978) *J Biol Chem* **253**: 4960-4965
- Grummt F (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 371-375
- Grummt F, Waltl G, Jantzen H-M, Hamprecht K, Huebscher U, Kuenzle CC (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 6081-6085
- Rapaport E, Zamecnik PC, Baril EF (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 838-842
- Zamecnik PC, Rapaport E, Baril EF (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 1791-1794
- Lee PC, Bochner BR, Ames BN (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 7496-7500
- Brevet A, Plateau P, Best-Belpomme M, Blanquet S (1985) *J Biol Chem* **260**: 15566-15570
- Baker JC, Jacobson MK (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2350-2352
- Kitzler JW, Farr SB, Ames BN (1992) W: McLennan AG (red): Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 135-150
- Coste H, Brevet A, Plateau P, Blanquet S (1987) *J Biol Chem* **262**: 12096-12103
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Sipsashvili Z, Moir M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K (1996) *Cell* **84**: 587-597
- Barnes LD, Garrison PN, Sipsashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM Ohta M, Heubner K (1996) *Biochemistry* **35**: 11529-11535
- Brenner C, Garrison P, Gilmour J, Peisach D, Ringe D, Petsko GA, Lowenstein JM (1997) *Nature Struct Biol* **4**: 231-237
- Huang Y, Garrison PN, Barnes LD (1995) *Biochem J* **312**: 925-932
- Chaudhuri AR, Khan IA, Prasad V, Robinson AK, Ludueña RF, Barnes LD (1999) *J Biol Chem* **274**: 24378-24382
- Rapaport E, Zamecnik PC (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 3984-3988

22. Brevet A, Chen J, Leveque F, Plateau P, Blanquet S (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8275-8279
23. Garrison PN, Barnes LD (1992) W: McLennan AG (red): Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 81-133
24. Ogilvie A (1992) W: McLennan AG (red): Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 229-274
25. Luo J, Jankowski J, Knobloch M, van der Giet M, Gardanis K, Russ T, Vahlensieck U, Neumann J, Schmitz W, Tepel M, Deng MC, Zidek W, Schlüter H (1999) *FASEB J* **13**: 695-705
26. Ogilvie A, Bläsius R, Schulze-Lohoff E, Sterzel RB (1996) *J Auton Pharmacol* **16**: 325-328
27. Jankowski J, Tepel M, van der Giet M, Tentel IM, Hennig L, Junker R, Zidek W, Schlüter H (1999) *J Biol Chem* **274**: 23926-23931
28. Iwata K, Haruki S, Kimura T (1995) *J Chromatogr B* **667**: 339-343
29. Kimura T, Hatano N, Wada M, Iwata K, Kurosaki Y, Nakayama T, Yamura T, Nakajima H (1995) *Biol Pharm Bull* **18**: 1556-1559
30. Ramos A, Pintor J, Miras-Portugal MT, Rottlan P (1995) *Anal Biochem* **228**: 74-82
31. Flores NA, Stavrou BM, Sheridan DJ (1999) *Cardiovasc Res* **42**: 15-26
32. Pintor J, Hoyle CHV, Gualix J, Miras-Portugal MT (1997) *Neurosci Res Comm* **20**: 69-78
33. Pintor J, Diaz-Hernández M, Bustamante C, Gualix J, de Terreros FJG, Miras-Portugal MT (1999) *Eur J Pharmacol* **366**: 159-165
34. Ogilvie A, Jakob P (1983) *Anal Biochem* **134**: 382-392
35. Lütthje J, Ogilvie A (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **115**: 253-260
36. Pintor J, Kowalewski HJ, Torres M, Miras-Portugal MT, Zimmerman H (1992) *Neurosci Res Commun* **10**: 9-14
37. Flodgaard H, Klenow H (1982) *Biochem J* **208**: 737-742
38. Pintor J, Diaz-Rey MA, Torres M, Miras-Portugal MT (1992) *Neurosci Lett* **136**: 141-144
39. Rodriguez A, Torres M, Delicado EG, Miras-Portugal MT (1988) *J Neurochem* **41**: 1696-1703
40. Garrison PN, Barnes LD (1984) *Biochem J* **217**: 805-811
41. Schlüter H, Offers E, Brüggemann G, van der Giet M, Tepel M, Nordhoff E, Karas M, Spieker C, Witzel H, Zidek W (1994) *Nature* **367**: 186-188
42. Schlüter H, Gross I, Bachmann J, Kaufmann R, van der Giet M, Tepel M, Nofer JR, Assmann G, Karas M, Jankowski J, Zidek W (1998) *J Clin Invest* **101**: 682-688
43. Warner AH, Finamore FJ (1965) *Biochim Biophys Acta* **108**: 525-530
44. Oikawa TG, Smith M (1966) *Biochemistry* **5**: 1517-1521
45. Goerlich O, Foeckler R, Holler E (1982) *Eur J Biochem* **126**: 135-142
46. Plateau P, Blanquet S (1982) *Biochemistry* **21**: 5273-5279
47. Jakubowski H (1983) *Acta Biochim Polon* **30**: 51-69
48. Fontes R, Günter Sillero MA, Sillero A (1998) *J Bacteriol* **180**: 3152-3158
49. Guranowski A, Günter Sillero MA, Sillero A (1990) *FEBS Lett* **271**: 215-218
50. Madrid O, Martin D, Atencia EA, Sillero A, Günter Sillero MA (1998) *FEBS Lett* **433**: 283-286
51. Atencia EA, Madrid O, Günter Sillero MA, Sillero A (1999) *Eur J Biochem* **261**: 1-11
52. Guranowski A, Sillero A (1992) W: McLennan AG (red): Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 81-133
53. Zimmermann H (1996) *Prog Neurobiol* **49**: 589-618
54. Gasmi L, Cartwright JL, McLennan AG (1998) *Biochim Biophys Acta* **1405**: 121-127
55. Thorne NMH, Hankin S, Wilkinson MC, Nuñez C, Barraclough R, McLennan AG (1995) *Biochem J* **311**: 717-721
56. Cartwright JL, McLennan AG (1999) *J Biol Chem* **274**: 8604-8610
57. Abeygunawardana C, Weber DJ, Gittis AG, Frick DN, Lin J, Miller AF, Bessman MJ, Mildvan AS (1995) *Biochemistry* **34**: 14997-15005
58. Hankin S, Wintero AK, McLennan AG (1996) *Biochem J* **312**: 925-932
59. Maksel D, Guranowski A, Ilgoutz SC, Moir A, Blackburn MG, Gayler KR (1998) *Biochem J* **329**: 313-319
60. Churin J, Hause B, Feussner I, Maucher HP, Feussner K, Börner T, Wasternack C (1998) *FEBS Lett* **431**: 481-485
61. Ingram SW, Stratemann SA, Barnes LD (1999) *Biochemistry* **38**: 3649-3655
62. Safrany ST, Ingram SW, Cartwright JL, Falck JR, McLennan AG, Barnes LD, Shears SB (1999) *J Biol Chem* **274**: 21735-21740
63. Conyers GB, Bessman MJ (1999) *J Biol Chem* **274**: 1203-1206
64. Yang X, Safrany ST, Shears SB (1999) *J Biol Chem* **274**: 35434-35440
65. Mozier NM, Walsh MP, Pearson JD (1991) *FEBS Lett* **279**: 14-18
66. Abend A, Garrison PN, Barnes LD, Frey PA (1999) *Biochemistry* **38**: 3668-3676
67. Pekarsky Y, Campiglio M, Siplashvili Z, Druck T, Sedkov Y, Tillib S, Draganescu A, Wermuth P, Rothman JH, Heubner K, Buchberg AM, Mazo A, Brenner C, Croce CM (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8744-8749
68. Chen J, Brevet A, Blanquet S, Plateau P (1998) *J Bacteriol* **180**: 2345-2349
69. Plateau P, Fromant M, Schmitter JM, Buchler JM, Blanquet S (1989) *J Bacteriol* **171**: 6437-6445
70. Plateau P, Fromant M, Schmitter JM, Blanquet S (1990) *J Bacteriol* **172**: 6892-6899
71. Mulder W, Scholten IHJM, van Roon H, Grivell LA (1994) *Biochim Biophys Acta* **1219**: 719-723
72. Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM (1998) *Annu Rev Genet* **32**: 7-31
73. McLennan AG, Mayers E, Adams DG (1996) *Biochem J* **320**: 795-800
74. McLennan AG, Mayers E, Hankin S, Thorne NMH, Prescott M, Powls R (1994) *Biochem J* **300**: 183-189
75. Guranowski A, Starzyńska E, Wasternack C (1988) *Int J Biochem* **20**: 449-455
76. Guranowski A, Blanquet S (1985) *J Biol Chem* **260**: 3542-3547
77. Guranowski A, Just G, Holler E, Jakubowski H (1988) *Biochemistry* **27**: 2959-2964
78. Guranowski A, Starzyńska E, Gzik L, Langston SP, Brown B, Blackburn GM (1995) *Nucleosides Nucleotides* **14**: 731-734
79. Mechulam Y, Fromant M, Mellot P (1985) *J Bacteriol* **164**: 63-69
80. Guranowski A, Jakubowski H, Holler E (1983) *J Biol Chem* **258**: 14784-14789

81. Guranowski A, Brown P, Ashton PA, Blackburn GM (1994) *Biochemistry* **33**: 235-240
82. Barnes LD, Culver CA (1982) *Biochemistry* **24**: 6123-6128
83. Robinson AK, de la Peña CE, Barnes LD (1993) *Biochim Biophys Acta* **1161**: 139-148
84. Guranowski A (1990) *FEBS Lett* **262**: 205-208
85. Jakubowski H, Guranowski A (1983) *J Biol Chem* **258**: 9982-9989
86. Feussner K, Guranowski A, Kostka S, Wasternack C (1996) *Z Naturforsch* **51**: 477-486
87. Hause B, Feussner K, Wasternack C (1997) *Botanica Acta* **110**: 1-6
88. Vallejo CG, Infante JM, Renart J, Sillero A (1973) *Biochem Biophys Res Commun* **51**: 113
89. Ogilvie A (1981) *Anal Biochem* **115**: 302-307
90. Łażewska D, Starzyńska E, Guranowski A (1993) *Protein Expression Purif* **4**: 45-51
91. Cartwright JL, Britton P, Minnick MF, McLennan AG (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **256**: 474-479
92. Hurtado C, Ruiz A, Sillero A, Günther Sillero MA (1987) *J Bacteriol* **169**: 1718-1723
93. Brevet A, Chen J, Fromant M, Blanquet S, Plateau P (1991) *J Bacteriol* **173**: 5275-5279
94. Guranowski A, Starzyńska E, Bojarska E, Stepiński J, Darzynkiewicz E (1996) *Protein Expression Purif* **8**: 416-422
95. Prescott M, Thorne NMH, Milne AD, McLennan AG (1992) *Int J Biochem* **24**: 565-571
96. Sillero MAG, Villalba R, Moreno A, Quintanilla M, Lobatón CD, Sillero A (1977) *Eur J Biochem* **76**: 331-337
97. Pace HC, Garrison PN, Robinson AK, Barnes LD, Draganescu A, Rösler A, Blackburn GM, Sipsrashvili Z, Croce CM, Heubner K (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5484-5489
98. Sard L, Accornero P, Torielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8489-8492
99. Cameselle JC, Costas MJ, Günther Sillero MA (1984) *J Biol Chem* **259**: 2879-2885
100. Robinson AK, Barnes LD (1986) *Arch Biochem Biophys* **248**: 502-515
101. Vartanian A, Alexandrov I, Prudowski I, McLennan A, Kisselev L (1999) *FEBS Lett* **456**: 175-180
102. Green AK, Cobbold PH, Dixon CJ (1995) *Biochem J* **310**: 629-635
103. Holden CP, Padua RA, Geiger JD (1996) *J Neurochem* **67**: 574-580
104. Gasmi L, McLennan AG, Edwards SW (1996) *Immunology* **90**: 154-159
105. Kisselev LL, Justesen J, Wolfson AD, Frolova LY (1998) *FEBS Lett* **427**: 157-163
106. Miras-Portugal MT, Gualix J, Pintor J (1998) *FEBS Lett* **415**: 78-82
107. Casado V, Lluís C, Canela E, Franco R, Mallol J (1992) *Neurochem Res* **17**: 129-139
108. van der Giet M, Khattab M, Börgel J, Schlüter H, Zidek W (1997) *Br J Pharmacol* **120**: 1453-1460
109. Hilderman RH, Martin M, Zimmerman JK, Pivorun EB (1991) *J Biol Chem* **266**: 6915-6918
110. Günther Sillero MA, Cameselle JC (1992) W: McLennan AG (red): *Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 205-228
111. Rotllán P, Miras-Portugal MT (1985) *Eur J Biochem* **151**: 365-371
112. Lienhard GE, Secemski II (1973) *J Biol Chem* **248**: 1121-1123
113. Colvin RA, Oibo JA, Allen RA (1991) *Cell Calcium* **12**: 19-27
114. Ono K, Iwata Y, Nakamura H, Matsukage A (1980) *Biochem Biophys Res Commun* **95**: 34-40
115. Tanaka Y, Matsunami N, Yoshihara K (1981) *Biochem Biophys Res Commun* **99**: 837-843
116. Keppens S (1996) *Biochem Pharmacol* **52**: 441-445
117. Fernández A, Costas MJ, Günther Sillero MA, Sillero A (1984) *Biochem Biophys Res Commun* **121**: 155-161
118. Pinto RM, Canales J, Günther Sillero MA, Sillero A (1986) *Biochem Biophys Res Commun* **138**: 261-267
119. Schulze-Lohoff E, Zanner S, Ogilvie A, Sterzel RB (1995) *Hypertension* **26**: 899-904
120. Nishimura A (1998) *Trends Biochem Sci* **23**: 157-159
121. Martin F, Pintor J, Rovira JM, Ripoll C, Miras-Portugal MT (1998) *FASEB J* **12**: 1499-1506
122. Edgecombe MHS, Craddock DC, Smith AG, McLennan AG, Fisher MJ (1997) *Biochem J* **323**: 451-456
123. Ripoll C, Martin F, Rovira JM, Pintor J, Miras-Portugal MT, Soria B (1996) *Diabetes* **45**: 1431-1434
124. Jovanovic A, Jovanovic S, Mays DC, Lipsky JJ, Terzic A (1998) *FEBS Lett* **423**: 314-318
125. Tepel M, Bachmann J, Schlüter H, Zidek W (1995) *J Hypertens* **13**: 1686-1688
126. Remy P (1992) W: McLennan AG (red): *Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 151-204
127. Plateau P, Blanquet S (1992) W: McLennan AG (red): *Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, str. 63-79
128. Liu G, Bryant RT, Hilderman RH (1996) *Biochemistry* **35**: 197-201
129. Perret J, Hepburn A, Cochaux P, Van Sande J, Dumont JE (1990) *Cell Signal* **2**: 57-65
130. Sipsrashvili Z, Sozzi G, Barnes LD, McCue P, Robinson AK, Eryomin V, Sard L, Tagliabue E, Greco E, Fusetti L, Schwartz G, Pierotti MA, Croce CM, Heubner K (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13771-13776

Genom ludzki 2001*

Human genome

EWA BARTNIK

15 lutego br. w czasopiśmie *Science* i 16 lutego w *Nature* opublikowano szereg artykułów o sekwencji genomu ludzkiego. Autorami są (oddzielnie) naukowcy z prywatnej firmy Celera kierowanej przez Craiga Ventera oraz badacze związani z **Programem Poznania Genomu Ludzkiego (Human Genome Project –HGP)**.

HGP powstał ponad 10 lat temu po to by zbadać genom ludzki. Plany zakładały najpierw sporządzenie różnego rodzaju map, a następnie systematyczne sekwencjonowanie — genom miał być podzielony na duże kawałki, które po sklonowaniu i uporządkowaniu miano dzielić na mniejsze fragmenty i te poddać dalszemu sekwencjonowaniu. Spodziewano się, że badania prowadzone przez grupy naukowców w USA, Anglii, Japonii, kilku krajach Europy Zachodniej i Chin zostaną zakończone około 2005 roku.

Prace HGP uległy znacznemu przyspieszeniu w wyniku coraz większej automatyzacji procesu sekwencjonowania oraz dlatego, że powstał konkurencyjny, finansowany przez prywatne firmy projekt **szybkiego sekwencjonowania** genomu ludzkiego — stąd nazwa instytucji — **Celera**.

Projekt badawczy Celera istnieje zaledwie od kilku lat, a jego plany badawcze były od początku inne niż plany HGP. Nie porządkowano klonów ludzkiego DNA, tylko je sekwencjonowano i następnie układano w odpowiedniej kolejności uzyskane sekwencje. Metoda ta (*shotgun sequencing* — co można przetłumaczyć jako podejście losowe) była traktowana podejrzliwie przez część naukowców, jako że uprzednio sprawdzono ją tylko na obiektach typu plazmidy i fagi, o małych w porównaniu z człowiekiem genomach. Jednak Venter z powodzeniem zastosował to podejście do ustalenia sekwencji DNA kilku bakterii a następnie także *Drosophila melanogaster*.

Otrzymane wyniki — Celera i HGP — są mocno niedoskonałe — stanowią jakby pierwsze przybliżenie do poznania genomu ludzkiego, nie jego rzeczywistą sekwencję. To, co jest rozszyfrowane, ma jeszcze mnóstwo luk oraz prawdopodobnie błędów — i w sekwencjach, i w ich uporządkowaniu. Zdaniem Celera, ich wyniki są lepsze i dokładniejsze, ale nie musi to być w pełni prawdziwe. Jedna z prac, które ukazały się we wspomnianym numerze *Science*, oparta o niezależny sposób mapowania i porządkowania fragmentów DNA ludzkiego pokazuje braki zbieżności własnych wyników mapowania fragmentów ludzkiego DNA i pozostałych obu zestawów danych o genomie ludzkim. Sekwencje Celera w tym podejściu nie wypadły lepiej od sekwencji HGP.

Publikacje w *Science* i *Nature* są efektem pracy tysięcy osób — biologów, informatyków, różnego rodzaju menedżerów. Same główne prace mają po kilkuset autorów. Wnioski, które wynikają z tych prac nie są ostateczne, i na pewno nie poznaliśmy jeszcze wszystkich ludzkich genów — dopóki w proponowanej sekwencji są błędy porządkowania i nierozpoznane fragmenty struktury, tzw. luki — nawet najlepiej zaprogramowane komputery nie są w stanie wyciągnąć z sekwencji danych, które są w niej nieobecne. Zresztą rolę komputerów i informatyków przy analizie uzyskanych danych trudno jest przecenić.

Niewątpliwie mamy mniej genów niż przypuszczano, choć to, że jest ich około 35000 postulowano już od pewnego czasu — a dokładnie od opublikowania przez HGP sekwencji najmniejszych ludzkich chromosomów — 21. i 22. Ekstrapolacja zawartych w nich około 700 genów na wielkość całego genomu dała dość dobre przybliżenie uzyskanych przez HGP i Celera wyników.

Nie wiemy, ile białek jest zakodowanych w ludzkim genomie. Nie ma żadnych podstaw dla pojawiającej się w mediach liczby typu 250000 — ponieważ znaczyłoby to, że każdy gen steruje syntezą około 10 białek. Tak na pewno nie jest, a dane o różnorodności opierają się raczej na ilościach tzw. EST

Prof. dr hab., Zakład Genetyki, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego i Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawiańskiego 5a, 02-106 Warszawa

(ang. *expressed sequence tags* — etykiety ekspresyjne), które są sekwencjonowanymi fragmentami klonowanych jako cDNA transkryptów. Na pewno szacunki oparte na EST są zawyżone. Dopiero jednak bezpośrednia analiza białek — dziedzina nauki zwana proteomiką — pokaże w przyszłości ile nasz genom koduje białek. Analiza występujących w białkach motywów może trochę uzasadnić nasze poczucie wyższości w stosunku do muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (13000 genów), czy nicienia *Caenorhabditis elegans* (19000 genów). Nasze białka są bardziej skomplikowane i jest w nich więcej różnych domen funkcjonalnych. Samych genów nie jest jednak wiele więcej. To, co nas zresztą różni od innych ssaków, to na pewno nie liczba naszych genów. Można też bez obawy powiedzieć, że nie znajdziemy genu na wynalezienie pisma czy na budowanie piramid. Choć w przyszłości porównanie naszych genów z genami myszy i małp człekokształtnych może pokazać np. różnice w liczbie genów związanych z rozwojem czy funkcjonowaniem układu nerwowego.

Wiemy, że geny nie są równomiernie rozmieszczone w naszym genomie i że olbrzymią część nasze-

go DNA stanowią różne rodzaje sekwencji powtórzonych. Nie są to dane nieoczekiwane. Ale też są bardziej precyzyjne niż dotychczasowe wynikające np. z badania reasocjacji DNA, czy oglądania prążków na barwionych chromosomach (od dawna wiadomo, że w ciemnych prążkach jest mało genów, w jasnych dużo).

Wiadomo też, że sekwencje DNA osób różnych ras różnią się nieznacznie — mniej więcej 1 nukleotyd na 2000. Jednak w sumie tych różnic może być sporo. Może w odległej przyszłości będzie możliwe opracowanie odpowiedniej terapii oraz być może profilaktyki dla danej konkretnej osoby.

W laboratoriach i Celera, i HGP dalej prowadzone są próby sekwencjonowania i mapowania nierozpoznanych dotąd fragmentów genomu, przewiduje się możliwość rozpoznania kolejnych genów. Z tego wynikną w przyszłości olbrzymie korzyści dla nas wszystkich — wczesne wykrywanie predyspozycji do uwarunkowanych genetycznie chorób czy też indywidualne przypadki podatności lub oporności na pewne leki, patogeny, itd., itp. Należy zatem pamiętać, że opublikowane w lutym wyniki to dopiero zakończenie pewnego etapu — a nie koniec prac nad poznaniem naszego genomu.

*W „Postęпах Biochemii” (Tom 46, str. II okładki oraz str. 187-195) Czytelnik znajdzie notę o odczytaniu przez firmę Celera sekwencji genomu ludzkiego oraz artykuł p.t. „Sekwencjonowanie genomu człowieka — dwa projekty badawcze, dwie strategie”.

Wskazówki dla Autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako *.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny z lewym marginesem około 4 cm, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Arial CE 11 lub 12. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ółwkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail

zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska Autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

PIŚMIENNICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9-26]. Odnosiłki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez 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, Stoltz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 1-7

5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight C G (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 ołwkiem 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” (ołwkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

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

KOMUNIKAT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

W związku z reorganizacją banku, obsługującego rachunek Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prosimy o wnoszenie opłat za składki członkowskie na nasze nowe konto w PBK XIII Oddz. Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jednocześnie uprzejmie informujemy, że decyzją Zarządu Głównego PTBioch. 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 rok 2001, otrzymają bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”.

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

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

Instytucje płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2001 80.- zł.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

ZAPROSZENIE

Jeżeli chciałabyś/chciałbyś zapisać się na listę e-mailową Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyślij e-mail na adres: infoptbioch@nencki.gov.pl. W polu „subject „, umieść swoje nazwisko i imię (w takiej kolejności i bez polskich znaków diakrytycznych) oraz adres e-mailu. Wysyłając taki mail zgadzasz się na to, aby na Twój adres e-mailowy przychodziły informacje ZG, listy pojedynczych lub grup członków do ogółu członków, informacje z FEBS o zjazdach i kursach oraz materiały reklamowe. Lista będzie rozsyłać materiały kontrolowane przez moderatora, którym będzie 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 naszego Towarzystwa](http://www.rcin.org.pl)

Dariusz Stępkowski

Sekretarz Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego