POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

postępy biochemii

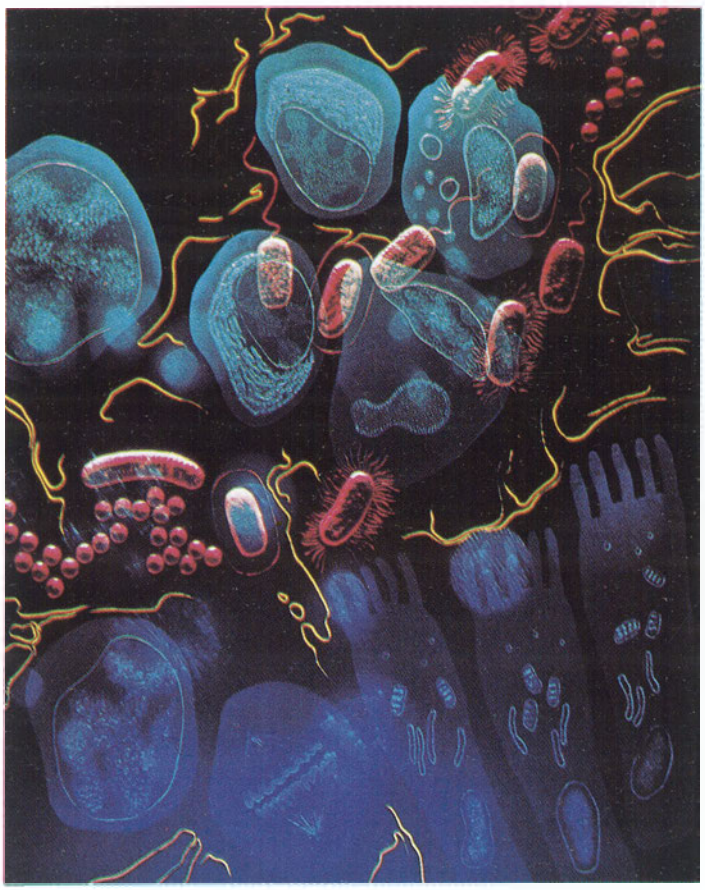
PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 41, NR 1, 1995

Irena Borkowska — Wspomnienia 2
Nobel 1994 za białka G 3
Twórcy biologii molekularnej . . 4
Nowotwory — choroba genów . 7
Powtórzenia DNA 15
Kontrola ścisła replikacji DNA . 23
Peptydowe analogi DNA 32
21-hydroksylaza sterydowa — niedobór 38
Neurosteroidy 47
Prenylacja białek 51
Cytochrom C i oksydaza cytochromowa 59
Cykl inozytolowy w jądrze 67

http://rcin.org.pl



Odczynniki biochemiczne z następujących działów:

* Przeciwciała monoklonalne
* Antybiotyki - substancje do badania *in vitro*
* Enzymy i koenzymy
* Cytokiny
* Genetyka molekularna
  - PCR
  - DNA
  - Plazmidy
  - Enzymy restrykcyjne
  - Primery i linkersy
  - Wzorce ciężaru DNA
  - Nukleotydy
* Czynniki wzrostu
* Hormony
* Lecytyny
* Mitogeny
* Fitodiagnostyka
* Proteazy

Zestawy diagnostyczne:

* PCR
* Bioluminescencja/Chemiluminescencja
* Zestawy ELISA (nieizotopowe metody badania wzrostu i śmierci komórek)
* Analizy żywności
* Fitodiagnostyka

Przedstawiciel i wyłączny dystrybutor w Polsce:

Hand-Prod Sp z o.o.
ul. Ulrychowska 26
01-113 WARSZAWA
tel/fax +48 22 374235
fax +48 26 626303

http://rcin.org.pl

postępy biochemii

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 31-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15

RECENZENCI ZESZYTU
Referees of this issue
JERZY BAL
(Warszawa)
DANEK ELBAUM
(Warszawa)
WOJCIECH JEGLIŃSKI
(Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
KATARZYNA NAŁĘCZ
(Warszawa)
GRAŻYNA PALAMARCZYK
(Warszawa)
JANUSZ SIEDLECKI
(Warszawa)
LECH WOJTCZAK
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII"
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel (2) 659-85-71 w. 332
fax: (22) 22-53-42
telex: 81-48-92

SPIS TREŚCI
CONTENTS

Profesor Irena Borkowska — Wspomnienia
Professor Irena Borkowska — Obituary
PRZYJACIELE I UCZNIOWIE 2

Nobel 1994 za białka G
Nobel prize 1994 — G proteins
ANNA KURLANDZKA, JAN FRONK 3

Twórcy podstaw biologii molekularnej: Emil Fischer, Erwin Schrödinger i Oswald T. Avery
Protagonists of molecular biology: Emil Fischer, Erwin Schrödinger and Oswald T. Avery
JAN BARCISZEWSKI 4

Nowotwory jako choroba genów
Cancer as genes' disease
ANTONINA HARŁOZIŃSKA-SZMYRKA 7

Powtórzenia DNA
Repeats of DNA
JOLANTA KWIATKOWSKA, TOMASZ TRZECIAK, RYSZARD SŁOMSKI 15

Czterofosforan guanozyny, ppGpp, jako czynnik ścisłej kontroli replikacji DNA
Guanosine tetraphosphate, ppGpp, as a factor of the stringent control of DNA replication
GRZEGORZ WĘGRZYN 23

Peptydowe kwasy nukleinowe — nowa grupa analogów DNA
Peptide nucleic acid — a new group of DNA analogues
CEZARY ŻEKANOWSKI 32

Podłoże molekularne niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej
Molecular basis of steroid 21-hydroxylase deficiency
PIOTR KUPCZYK, PIOTR SAWIŃSKI, WIESŁAW H. TRZECIAK 38

Neurosteroidy — synteza i metabolizm
Neurosteroids — synthesis and metabolism
ELŻBIETA RĘBAS, LILLA LACHOWICZ 47

Prenylacja białek
Prenylation of proteins
EWA SWIEŻEWSKA 51

Konformacje cytochromu C i jego oddziaływania z oksydazą cytochromową
Cytochrome C conformation and its interactions with cytochrome C oxidase
ARTUR OSYCZKA, BOHDAN TURYNA 59

Rola cyklu inozytolowego w przekazywaniu informacji w jądrze
The role of inositol cycle in signal transduction in cell nucleus
MAGDALENA WIKTOREK, ALEKSANDRA ROJEK, MAŁGORZATA CZARNY, JOLANTA BARAŃSKA 67

http://rcin.org.pl

Profesor Irena Borkowska — Wspomnienia

Profesor Irena Borkowska
1924—1994

Dnia 21 października 1994 roku pożegnaliśmy na zawsze Panią Profesor dr hab. Irenę Borkowską — znaną w kraju i na świecie uczoną, wychowawcę i nauczyciela licznych pokoleń młodzieży akademickiej i wielu młodych naukowców.

Profesor Irena Borkowska, z domu Madecka, urodziła się 2 stycznia 1924 roku w Cieszynie. Studia wyższe podjęła w Lublinie uzyskując w 1951 roku dyplom lekarza weterynarii. Wcześniej, bo już w 1948 roku, jako studentka III roku rozpoczęła pracę w Katedrze Chemii Fizjologicznej pod kierunkiem Profesor Janiny Opieńskiej-Blauth. Dzięki swoim uzdolnieniom i pracowitości szybko zdobywała stopnie i awanse w karierze akademickiej (doktorat — 1960, habilitacja — 1966) i stworzyła własny zespół naukowo-badawczy. Odbyła szereg krótko- i długoterminowych staży zagranicznych (Praga — 1958, Strasbourg — 1959, Cronenbourg — 1963/64, Bufflo — 1971/72). Problematyka badań naukowych prowadzonych przez panią Profesor dotyczyła metabolizmu węglowodanów u bakterii oraz kwasów nukleinowych komórek zwierzęcych.

Profesor Irena Borkowska aktywnie uczestniczyła w organizacji Studium Pielęgniarstwa, a od momentu powołania Wydziału Pielęgniarskiego przez trzy kolejne kadencje pełniła funkcję prodziekana. Poświęcała wiele uwagi pracy dydaktyczno-wychowawczej. Troszczyła się o doskonalenie programów nauczania biochemii studentów wydziałów lekarskiego i pielęgniarskiego oraz oddziału stomatologii.

Za swoją działalność naukową, dydaktyczną, wychowawczą i organizacyjną została uhonorowana Medalem Komisji Edukacji Narodowej, Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski oraz licznymi odznaczeniami resortowymi i regionalnymi.

Profesor Irena Borkowska była człowiekiem wymagającym wiele od siebie i innych, a jednocześnie bezpośrednim, przyjaznym i skromnym.

Pozostanie w naszej pamięci jako wybitny naukowiec, utalentowany nauczyciel i wychowawca oraz znakomity organizator procesu naukowo-dydaktycznego.

Grono Przyjaciół i Uczniów

W. Mejbaum-Katzenellenbogen's Seminars

2. Membrane Skeleton Structure and Function

Correspondence to:
K. Białkowska M.Sc.
Secretariat
W. Mejbaum-Katzenellenbogen's Seminars
2. Membrane Skeleton Structure and Function
Institute of Biochemistry
University of Wrocław
ul Przybyszewskiego. 63/77
51-148 Wrocław
Poland

Tel/Fax: +71-252930
EMail: AFSBC@ii.uni.wroc.pl

June 19th - 21 st 1995
Wrocław/Karpacz

http://rcin.org.pl

Nobel 1994 r. za białka G z medycyny i fizjologii

Nobel prize 1994 — G proteins

ANNA KURLANDZKA[1]
JAN FRONK[2]

Nagrodę Nobla za rok 1994 w dziedzinie fizjologii lub medycyny (ok. 930 tys. dolarów) przyznano dwum Amerykanom — Martinowi Rodbellowi i Alfredowi G. Gilmanowi za prace prowadzące do odkrycia białek G i ustalenia ich roli w przekazywaniu sygnałów między komórkami. Zagadnienie to w ciągu ostatnich kilkunastu lat stanowiło jeden z najgorętszych tematów biologii molekularnej i było niemal oczywiste, że prędzej czy później doczeka się Nobla. Dobrą miarą rozwoju wiedzy na temat udziału białek G w przekazywaniu sygnałów jest ilość miejsca poświęconego temu zagadnieniu w kolejnych wydaniach "Molecular Biology of the Cell" Albertsa i wsp.: w pierwszym wydaniu z roku 1983 jedyne hasło dotyczące białek G występuje na 4 stronach, w II wydaniu z 1989 mamy już 14 haseł na 15 stronach, a w tegorocznym III wydaniu 44 hasła pojawiają się na 28 stronach.

Historia odkrycia i stopniowego poznawania funkcji białek G jest piękną ilustracją walki „nowego" ze starymi paradygmatami przy tworzeniu postępu naukowego i złożoności procesu poznawczego, z dopełniającymi się rolami badaczy — „wizjonerów" i „wyrobników".

Na przełomie lat 60 i 70 wykrystalizował się jasny i — jak się wówczas wydawało — kompletny obraz mechanizmu przekazywania sygnałów (np. hormonalnych) do komórki. Hormon wiążąc się z błonowym receptorem powodował uaktywnienie cyklazy adenylanowej, rosło stężenie cAMP, aktywacji ulegały kinazy białek. Układ czysty i elegancki, toteż doniesienie z 1969 r. o konieczności udziału GTP w tym procesie, jako „nie pasujące", zostało powszechnie zlekceważone. Jednakże, poczynając od 1971, Rodbell (od wielu lat badający w National Institutes of Health w Bethesda mechanizmy działania hormonów na metabolizm komórki) ze współpracownikami uparcie publikował kolejne prace wskazujące, że pomiędzy receptorem a cyklazą pośredniczy jakiś czynnik, do którego aktywności niezbędny jest GTP. Rodbell wspomina, że jego wystąpienia na konferencjach naukowych przyjmowane były ze źle skrywanym zniecierpliwieniem: „No nie, znów Rodbell ze swoimi koncepcjami!" (to samo mówiono w swoim czasie o innych późniejszych Noblistach, których poglądy stały w opozycji do ówczesnych „niewzruszonych" dogmatów — dość wspomnieć McClintock, Mitchella czy Temina).

Dopiero prace z lat 1975-80, w których donoszono o wyizolowaniu hipotetycznego czynnika postulowanego przez Rodbella, dostarczyły niezbitych dowodów potwierdzających jego koncepcje. Poczynając od roku 1977 do chwili obecnej pierwszoplanową rolę w pracach nad izolowaniem, oczyszczaniem i charakterystyką białek G pośredniczących w przekazywaniu sygnału od błonowych receptorów do efektorów grał Gilman, obecnie 53-letni, pracujący początkowo w University of Virginia School of Medicine w Charlottesville, a od 1981 r. w Uniwersity of Texas Health Science Center w Dallas.

Nagromadzona w ciągu niespełna ćwierćwiecza wiedza o białkach G i związanych z nimi receptorach jest imponująca; znanych jest ponad 20 rodzajów białek G* i znacznie ponad 100 rodzajów receptorów, działających za ich pośrednictwem. Wspólną cechą tych receptorów jest siedmiokrotne przekraczanie błony komórkowej (*seven-pass transmembrane receptors*); są wśród nich receptory hormonów („normalnych" i tkankowych) i neuroprzekaźników, chemoreceptory smaku i zapachu i fotoreceptory. Repertuar aktywno-

[1] Adiunkt, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, Pawińskiego 5a, [2] adiunkt, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Żwirki i Wigury 93

* Białka G, o których tu mowa, to tzw. (hetero)trimeryczne białka G, obok nich do rodziny białek G zalicza się m.in. małe białka wiążące GTP (ras, rab i pokrewne). Do niedawna panował pogląd, że tylko związana z GTP podjednostka α stanowi aktywny element białek G. Ostatnio przapuszcza się, że także kompleks podjednostek β i γ po uwolnieniu od podjednostki α może bezpośrednio wpływać na aktywność niektórych enzymów efektorowych.

http://rcin.org.pl

ści białek G jest również szeroki: obok poznanych najwcześniej aktywujących cyklazę adenylanową są białka G hamujące aktywność cyklazy adenylanowej, stymulujące aktywność fosfodiesterazy cGMP, stymulujące aktywność fosfolipazy C, stymulujące aktywność fosfolipazy A_2, wreszcie wpływające bezpośrednio na przepuszczalność kanałów potasowych i wapniowych.

Rola białek G i sprzężonych z nimi receptorów w etiologii wielu chorób stwarza nadzieję na wykorzystanie zdobytej wiedzy w praktyce medycznej. Ofiarą tych, jak dotąd niespełnionych, oczekiwań padł w pewnym sensie sam Rodbell; kiedy zabrakło funduszy na finansowanie prowadzonych w jego zespole w National Institute of Environmental Health Services Research Tringle Park badań podstawowych (amerykańscy podatnicy, podobno, życzą sobie by ich pieniądze przynosiły szybkie i namacalne efekty) Rodbell przeszedł w wieku 68 lat, pół roku przed ogłoszeniem decyzji Komitetu Nagród Nobla, na przedwczesną emeryturę wytargowawszy u dyrekcji NIEHS to, że pieniądze przeznaczone na jego pensję zostaną przekazane osieroconemu zespołowi. „I ten szczęśliwy, kto [...] poległym ciałem dał innym szczebel do sławy grodu"!

Artykuł otrzymano 28 listopada 1994 r.
Zaakceptowano do druku 29 listopada 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Birnbauer L (1992) *Cell* **71:** 1069-1072
2. Collins S, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) *Trends Biochem Sci* **17:** 37-39
3. Helper JR, Gilman AG (1992) *Trends Biochem Sci* **17:** 383-387
4. Kwiatkowska J (1988) *Post Biochem* **34:** 123-130
5. Lefkowitz RJ (1993) *Cell* **74:** 409-412
6. Linder ME, Gilman AG (1992) *Świat Nauki* 42-50
7. Rodbell M (1992) *Curr Topics Cell Regulat* **32:** 1-47
8. Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RAF (1994) *Annu Rev Biochem* **63:** 101-132

Twórcy podstaw biologii molekularnej: Emil Fischer, Erwin Schrödinger i Oswald T. Avery

Protagonists of molecular biology: Emil Fischer, Erwin Schrödinger and Oswald T. Avery

JAN BARCISZEWSKI*

W 1994 roku minęło 100 lat od czasu kiedy Emil Fischer, jeden z najwybitniejszych uczonych niemieckich przełomu XIX i XX wieku, zaproponował „koncepcję klucza i zamka", charakteryzującą mechanizm specyficznego oddziaływania enzymu i substratu [1]. Zwróciła ona uwagę badaczy na zjawisko rozpoznawania molekularnego (ang. *molecular recognition*). Jego podstawą jest dokładna komplementarność dwu struktur molekularnych. Mówimy, że jedna cząsteczka rozpoznaje inną lub, że dwie cząsteczki rozpoznają się wzajemnie. Zjawisko to nazywane również autoasocjacją makrocząsteczek, prowadzi do powstania strukturalnych komponentów komórkowych i wymaga precyzyjnych informacji na poziomie molekularnym, które niewątpliwie zakodowane są w strukturze przestrzennej nie tylko DNA.

* Prof. dr hab. Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

Wydaje się, że podstawowym osiągnięciem E. Fischera było przygotowanie zestawu stereoizomerów cukrów, który dziś możemy nazwać biblioteką. Związki o różnej strukturze E. Fischer poddawał glikozie i określał konfigurację zawartych w hydrolizacie cukrów. Przy pomocy fenylohydrazyny, otrzymanej w 1875 r, która reaguje z prostymi cukrami dając pochodne krystaliczne, udało się oczyszczać i zidentyfikować różne ich formy. Przewidział wszystkie izomery. Ostatecznie, w 1894 r. zaproponował koncepcję, że ligand i dana makrocząsteczka muszą pasować do siebie jak klucz do zamka. Koncepcja klucza i zamka wpłynęła stopniowo na rozwój metod badania mechanizmu katalizy. Dziś, jak wiadomo, do tego celu stosuje się szereg podejść eksperymentalnych opartych na metodach obliczeniowych, chemicznej modyfikacji enzymów, ukierunkowanej mutagenezie i wykorzystaniu specyficznych przeciwciał.

Koncepcję Fischera wykorzystał Paul Ehr-

http://rcin.org.pl

lich [2], jeden z pionierów immunologii i chemoterapii, opisując oddziaływanie antygenu (klucz) z przeciwciałem (zamek). Jednym z ważniejszych dowodów, wspierających koncepcję rozpoznawania molekularnego przez przeciwciała, było stwierdzenie, że wiązanie różnie podstawionych anilin (orto, meta i para sulfonianów, karboksylanów i aresenianów) zależy od pozycji oraz natury podstawnika kwasowego. W związku z tym pojawiło się pytanie w jaki sposób tak liczne, bardzo podobne chemicznie przeciwciała, produkowane przez ten sam organizm, rozpoznają różne antygeny. Około 50 lat temu Linus Pauling zasugerował, że to zmiany konformacyjne niektórych regionów przeciwciał są odpowiedzialne za zwiększanie liczby dostępnych miejsc rozpoznawania [3, 10]. Wiemy dziś, że reagujące cząsteczki rzeczywiście podlegają zmianom konformacyjnym podczas wzajemnego oddziaływania. Daniel Koshland nazwał to zjawisko indukcyjnym dopasowaniem [4].

Wielkim przełomem w badaniach rozpoznawania cząsteczkowego było sformułowanie t.zw. zasady komplementarności nici kwasów nukleinowych, po za prezentowaniu przez J. Watsona i F. Cricka modelu struktury podwójnego heliksu DNA [5]. O ile idea E. Fischera stereochemicznej kontroli reakcji enzymatycznych dotyczyła pojedynczej przemiany chemicznej, to koncepcja rozpoznawania molekularnego cząsteczek kwasów nukleinowych tłumaczy dokładność przebiegu tak skomplikowanych procesów komórkowych, jak replikacja, transkrypcja i translacja informacji genetycznej.

Emil Fischer za wielkie osiągnięcia w syntezie i chemii cukrów oraz puryn otrzymał Nagrodę Nobla w 1902 r. Uważał on, że oprócz białek nie ma innej grupy związków węgla, która jest tak niezbędna dla życia jak węglowodany. W 1874 r. uzyskał doktorat na Uniwersytecie w Strasbourgu pod kierunkiem Adolfa von Bayer, również laureata Nagrody Nobla (1905) [6]. Odkrył formę aldehydową glukozy poprzez utlenienie do kwasu aldonowego oraz reakcję z fenylohydrazyną. W 1888 r. poprzez konwersję osazonów ustalił zależności między glukozą, fruktozą i mannozą. W kilka lat później poprzez epimeryzację kwasu glukonowego i mannowego wyjaśnił stereochemię i izomerów cukrów. Zsyntetyzował glukozę, fruktozę i mannozę oraz 30 innych cukrów. Wykazał także, że kwas moczowy, ksantyna, adenina i guanina, teophilina, kofeina itd, są różnymi pochodnymi hydroksylowymi i aminowymi tego samego związku, który w 1894 r. nazwał puryną. Fischer otrzymał ponad 150 nowych związków purynowych.

Pogrążony w wielkiej depresji po śmierci dwóch z trzech synów oraz przegranej Niemców w I Wojnie Światowej, zmarł tragicznie w 1919 roku popełniając samobójstwo.

Wspomniane powyżej odkrycie struktury DNA dało impuls do powstania nowej dziedziny badań nazwanej biologią molekularną. Dyskutując różne aspekty badań biologicznych używamy takich określeń i terminów, jak gen, informacja genetyczna, sekwencja kodująca, czy wreszcie DNA. Ich pojemność i jednoznaczność dla dzisiejszych badaczy są jasne i oczywiste. Można zapytać od kiedy gen oznacza DNA. Otóż stało się to 50 lat temu.

Rok 1944 zapisał się w rozwoju biologii molekularnej dwoma wielkimi wydarzeniami. Były to opublikowanie książki "What is Life" Erwina Schrödingera oraz doniesienie Oswald T. Avery wskazujące jednoznacznie, że geny zbudowane są z DNA. Prace te wzbudziły olbrzymie zainteresowanie naukami biologicznymi i zdecydowały o skierowaniu biologii na nowe tory.

Pracując w Dublinie na początku lat czterdziestych E. Schrödinger interesował się zagadnieniami istoty życia do czego zainspirowała go praca mało znanego wówczas Delbrucka [7]. W 1944 r. Schrödinger opublikował książkę pod tytułem **"What is Life? The physical aspect of the living cell"** [8]. Praca ta spotkała się z wielkim zainteresowaniem ze względu na prostotę ujęcia tematu i dużą jego atrakcyjność a także głośne nazwisko autora. Schrödinger był już znany w nauce jako twórca mechaniki falowej. Wprowadził on do biologii pewne koncepcje kodu genetycznego oraz nieokresowej struktury materiału genetycznego. Jednakże najbardziej interesujące w tamtym okresie wydawało się pytanie, w jaki sposób informacja biologiczna zawarta w pojedynczej komórce może kontrolować setki różnych reakcji, które prowadzą do powstawania dojrzałego organizmu. Pytając co to jest życie i próbując je opisać przy pomocy pojęć dotyczących struktury cząsteczkowej, wiązań międzyatomowych, stabilności termodynamicznej, przyciągał entuzjazm młodych fizyków do biologii, a w szczególności zainteresował ich istotą informacji biologicznej. Wspaniałe perspektywy nie wyzwoliły jednak nowych idei oraz nie spowodowały przełomu w biologii. Z dzisiejszej perspektywy wydaje się, że przyczyną mogły być ówczesne przyzwyczajenia badaczy do stosowania łatwych (prostych) i dostępnych wówczas doświadczalnych technik biologicznych i biochemicznych. Sytuacja ta zmieniła się radykalnie w 1953 roku po odkryciu spirali DNA przez Watsona i Cricka na co niewątpliwie książka "What is Life" miała wpływ.

Możemy zapytać o inne przyczyny tak wielkiej popularności tej książki. Schrödinger trafnie zasugerował w niej, że najważniejszą częścią komórki są tzw. „włókna chromosomowe", które określał terminem nieokresowego (nieperiodycznego) kryształu. Ponadto wskazał, że chromosom zawiera pewien rodzaj zapisu kodowego, niezbędnego do pełnego rozwoju danego indywiduum. Intuicyjnie porównał on to do kodu Morsa, jako sposobu generowania olbrzymiej ilości słów z kilku zaledwie symboli. Innymi słowy, proponował „uporządkowanie porządku" (ang. *order from order*), co dzisiaj wyraźnie kojarzy się nam

http://rcin.org.pl

z dalekowzrocznym opisem struktury DNA oraz „uporządkowanie chaosu" (ang. *order from disorder*), czyli opis w jaki sposób żywe organizmy utrzymują określone uporządkowanie mimo stanu nierównowagi spowodowanej, jak nazwał to Schrödinger, „metabolizmem żywności". Pisząc tę książkę miał on nadzieję, że znajdzie rozwiązanie kwestia, czy żywa materia podlega znanym prawom fizyki, czy też potrzebne są nowe prawa fizyki. Nie było to tak wówczas oczywiste, ponieważ do tamtego okresu fizycy nie zajmowali się żywymi organizmami. Obecnie wiadomo, że prawom fizyki podlegają również żywe organizmy.

50 lat temu E. Schrödinger postawił, jak już mówiłem kluczowe pytanie „Co to jest życie?". W pewnym sensie pytanie to pozostaje nadal aktualne. Ponadto pojawiły się dalsze problemy, jak zrozumienie mechanizmu pochodzenia życia, powstanie kodu biologicznego kierującego rozwojem danego organizmu, mechanizm działania mózgu czy leczenie chorób zakaźnych.

Rok 1944 zapamiętany został również z powodu innego wielkiego wydarzenia chyba większego niż poprzednie. Na początku lat czterdziestych, wydało się oczywiste, że jeśli komórka wytwarza np. enzymy syntezując łańcuch polipeptydowy, to „gdzieś" w komórce muszą znajdować się odpowiednie „instrukcje". Nasuwa się analogia do konstruktora, który ma zbudować dokładną kopię określonej budowli. Może to uczynić poprzez ciągłe sprawdzanie i porównywanie nowej i starej konstrukcji lub też przez wykorzystanie dokładnego projektu po raz drugi. Powracając do komórki, to „budowanie przez sprawdzanie" wymagałoby wykorzystywania różnych cząsteczek białkowych jako wzorców, a to oznaczałoby, że kolejna cząstka białka może być budowana na poprzedniej. Jest oczywiste, że nigdy nie udało się otrzymać dowolnego białka jako swej repliki. W latach 40-tych było wiadomo, że w komórce replikacji ulegają chromosomy i muszą one posiadać własny system wytwarzania białek, rozumiany błędnie, jako zawarty w strukturze białek tworzących gen. Tej „białkowej" teorii potwierdzić się nie udało, przeciwnie na początku 1944 r. ostatecznie ją pogrzebano. Stało się to z udziałem trzech biochemików Oswald T. Avery, Colin M. McLeod i Maclyn McCarty z Instytutu Rockefellera, którym udało się wyjaśnić zajawisko transformacji bakterii opisane przez F. Griffitha już w 1928 r. [9]. Wykazał on wówczas, że infekcja myszy wirulentnymi bakteriami *Diplococcus pneumoniae*, typu gładkiego S (ang. *smooth strain*), powoduje zapalenie płuc i śmierć zwierząt zakażonych. Ze szczepu S można otrzymać na drodze mutacji niewirulentny szczep szorstki R (ang. *rough strain*). Myszy, zainfekowane bakteriami szczepu szorstkiego R lub szczepu S zabitymi w wysokiej temperaturze, nie wykazywały żadnych objawów chorobowych. Natomiast, zainfekowane jednocześnie bakteriami szczepu R i zabitymi bakteriami szczepu S zapadały na zapalenie płuc i zdychały. Z doświadczenia tego wynikało, że pewien czynnik z zabitych komórek szczepu S zmienia (transformuje) żywe komórki typu R na komórki S wg schematu:

$$S(\text{zabite}) + R(\text{żywe}) \rightarrow S(\text{żywe})$$

Otóż badacze z Instytutu Rockefellera, poszukując tego czynnika w komórkach *Diplococcus pneumoniae* wykazali w 1944 r., że jedynym składnikiem, który transformuje komórki R do S jest czysty preparat DNA z komórek S. Udało się w ten sposób pokazać bezpośrednią rolę DNA w wytwarzaniu dziedzicznych komórek, a tym samym stwierdzić, że DNA jest nośnikiem kodu genetycznego. Stało się jasne, że dla zrozumienia istoty kodu genetycznego, niezbędne jest poznanie struktury kwasów nukleinowych. W wielu laboratoriach rozpoczęto intensywne prace w tym kierunku, które zostały zakończone odkryciem podwójnej helisy DNA przez J. D. Watsona i F. H. C. Cricka [5]. To wydarzenie otworzyło nowy etap w nauce, który nazwać można epoką DNA. Trwa ona do dnia dzisiejszego.

Piśmiennictwo

1. Fischer E (1894) *Chem Ber* **27:** 2985-2993
2. Suckling CJ (1991) *Experientia* **47:** 1093-1095
3. Pauling L (1940) *J Amer Chem Soc* **62:** 2643-2645
4. Koshland DE Jr (1973) *Sci Amer* **4:** 52-64
5. Watson JD, Crick FHC (1953) *Nature* **171:** 737-738
6. Kauffman GB (1990) *J Chem Educ* **67:** 451-455
7. Timofeeff-Ressovsky NW, Zimmer KG, Delbnruck M (1985) *Nachr Biol Gess Wiss Göttingen* **1:** 189-245
8. Schrödinger E (1944) What is Life? The physical aspect of the Living cell, Cambridge University Press.
9. Avery OT, McLeod CN, McCarthy M (1944) *J Exp Med* **248:** 769-771

Prenumerata „Postępów Biochemii" w 1995 r.
Prenumerata dla instytucji — 580 zł
Indywidualna — 280 zł
50% zniżki dla członków PTBioch.

http://rcin.org.pl

Nowotwory jako choroba genów

Cancer as genes' disease

ANTONINA HARŁOZIŃSKA-SZMYRKA*

Spis treści:

I. Onkogeny i geny supresorowe
II. Dziedziczna predyspozycja do rozwoju nowotworów złośliwych
III. Wieloetapowy rozwój nowotworów
IV. Molekularne podstawy rozwoju przerzutów
V. Genetyczne podłoże gruczolakoraka jelita grubego
VI. Implikacje kliniczne, perspektywy

Contents:

I. Oncogenes and suppressor genes
II. Inherited predispositions to cancer
III. Multistage carcinogenesis
IV. Molecular events in metastases development
V. Genetic background of colon cancer
VI. Clinical implications, the future

I. Onkogeny i geny supresorowe

Nowotwór złośliwy można obecnie określić jako wynik akumulacji błędów genetycznych w komórce prawidłowej, która przestaje podlegać normalnym mechanizmom kontrolującym wzost i różnicowanie komórek.

Karcinogeneza jest procesem wieloetapowym, który poprzedza inicjacja transformacji na poziomie pojedynczej komórki, zaś efektem końcowym jest pełne rozregulowanie aparatu genetycznego, mechanizmów homeostazy, a w konsekwencji zniszczenie całego organizmu.

Kontrola zdolności podziałowych i różnicowania komórki jest wypadkową oddziaływania pobudzających i hamujących sygnałów regulatorowych, a zaburzenia na poziomie genów kontrolujących te procesy stanowią najbardziej istotne czynniki odpowiedzialne za powstanie i rozwój nowotworów [1-6].

Zgodnie z osiągnięciami ostatnich lat w dziedzinie onkologii molekularnej geny uczestniczące w powstawaniu i rozwoju nowotworów człowieka można zaliczyć do dwóch podstawowych kategorii. Są to: onkogeny i geny supresorowe [7-14].

Każdy z opisanych dotychczas onkogenów ma swój odpowiednik w normalnym aparacie genetycznym komórki. Te prekursory onkogenów, zwane protoonkogenami, w warunkach prawidłowych spełniają podstawową rolę w regulacji procesów wzrostu, różnicowania i dojrzewania komórek. Produkty tych genów mogą działać jako czynniki wzrostu, receptory czynników wzrostu, uczestniczyć w przenoszeniu sygnałów transdukcyjnych, szczególnie istotnych dla procesów różnicowania i pełnić rolę czynników transkrypcyjnych na poziomie jądra [2, 4, 12, 15, 16].

Klasyfikacja protoonkogenów, w oparciu o spełnianą funkcję, pozwoliła na umieszczenie każdego z nich w regulacyjnej kaskadzie systemu przekaźnikowego pomiędzy jądrem komórkowym, cytoplazmą i powierzchnią komórki [2, 3, 12, 14, 16]. W tabeli 1 zebrano protoonkogeny aktywowane w różnych typach nowotworów ludzkich z uwzględnieniem kodowanych przez nie funkcji fizjologicznych. Komórkowe protoonkogeny mogą być aktywowane do zmiany ich funkcji na onkogenną w różny sposób. Najbardziej znane mechanizmy obejmują pośrednie zadziałanie genu wirusowego wbudowanego w procesie ewolucji do aparatu genetycznego komórki oraz zmiany strukturalne zachodzące w samym genomie komórki [4, 8, 16-18] i polegające głównie na wystąpieniu mutacji punktowej, translokacji lub amplifikacji protoonkogenów wewnątrz chromosomu [1, 8, 9].

Dotychczas zidentyfikowano około 100 onkogenów [1, 2, 15]. Najlepiej przebadane są onkogeny tworzące grupę określoną jako *ras*, w obrębie której wyróżnia się trzy podstawowe klasy i kodowane przez nie białka, znane jako H-ras, K-ras i N-ras [18-20]. Mutacje, głównie o charakterze punktowym [2, 16, 18, 21] w rodzinie genów *ras* wykryto w znacznym odsetku nowotworów płuc, trzustki, tarczycy, żołądka, jelita grubego, głowy i szyi, prostaty oraz w ostrej białaczce szpikowej [19, 20, 22]. Ostatnio coraz częściej dyskutuje się przyczynową rolę onkogenów *ras* w rozwoju stanów przednowotworowych [2, 19, 23].

Najlepiej przebadanym onkogenem, działającym na poziomie jądra komórkowego, jest przedstawiciel strukturalnie i funkcjonalnie pokrewnych genów z rodziny określonej jako *myc* [2, 22, 24]. Mutację w obrębie genu *myc* obserwowano w wielu nowotworach [16, 22, 24] (chłoniak Burkitta, nerwiak zarodkowy, rak sutka, płuc, dolnych odcinków przewodu pokarmowego,

* Prof. dr hab., Zakład Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej, ul. Mikulicza-Radeckiego 7, 50-368 Wrocław.

http://rcin.org.pl

Tabela 1

Protoonkogeny w ludzkich nowotworach złośliwych (wg. 14)

Protoonkogen	Locus w chromosomie	Funkcja
erbB-1	7p12-p13	kinaza białkowa
erbB-2/neu	17q11-q12	kinaza białkowa
fms	5q33-q34	kinaza białkowa
kit	4q11-q21	kinaza białkowa
ros-1	6q22-q23	kinaza białkowa
src	20q12-q13	kinaza białkowa
abl	9q34	kinaza białkowa
mos	8q22	kinaza seryny/treoniny
Int-1/wnt-1	12q13-15	wiązanie receptora
Int-2	11q13	wiązanie receptora
sis	22q12.3-q13.1	wiązanie receptora
bcl-2	18q21	wiązanie GTP
Ha-ras-1	11p15.1-p15	wiązanie GTP/aktywność GTPazy
Ki-ras-2	12p12-ter	wiązanie GTP/aktywność GTPazy
M-ras	1p22-p31	wiązanie GTP/aktywność GTPazy
R-ras	19	wiązanie GTP/aktywność GTPazy
erbA	17q21-q25	regulator transkrypcyjny
ets-1 i 2	11q23-q24	regulator transkrypcyjny
fos	14q21-q31	regulator transkrypcyjny
jun	1p31-p32	regulator transkrypcyjny
myb	6q22-q24	wiązanie DNA
myc	8q24	wiązanie DNA
ski	1q12-ter	nie ustalona
mas	6q22	receptor angiotenzyny

GTP — trójfosforan guanozyny

nowotwory głowy i szyi) [2]. Definiując stan progresji nowotworów jako proces, w którym następuje ekspansja klonu komórkowego obdarzonego selektywną przewagą wzrostową, rozważa się uznanie genu *myc* za gen progresji nowotworów wielu narządów, a tym samym za niekorzystny czynnik rokowniczy [16, 24]. Amplifikację tego genu, związaną ze wzrostem mRNA i ekspresją produktu białkowego *myc*, wykryto w zaawansowanych klinicznie nowotworach głowy i szyi, rakach sutka, jajnika i płuc [16, 24].

Na podstawie dotychczas zgromadzonych informacji, przyjmując wieloetapowy charakter procesu karcinogenezy, można uznać, że pojedyncze onkogeny nie wystarczają do wywołania pełnej transformacji nowotworowej [1, 25]. Jak wykazano, w warunkach doświadczalnych do ujawnienia złośliwego fenotypu komórek konieczne jest współdziałanie co najmniej dwóch onkogenów. Onkogen typu *ras* transfekowany do hodowli mysich fibroblastów nie powodował transformacji nowotworowej, ale wprowadzony do komórek ustalonej linii, posiadającej już cechy nieśmiertelności (NIH 3T3), ujawniał typowe działanie onkogenne. Jak się okazało do wywołania transformacji fibroblastów mysich oprócz onkogenu *ras* konieczne było współdziałanie onkogenu jądrowego *myc*. Wówczas onkogen *myc* nadaje komórce cechy nieśmiertelności, a onkogen *ras* powoduje utratę hamowania kontaktowego i odpowiada za zmiany morfologiczne związane ze stanem transformacji nowotworowej [1, 17].

Konieczność zatem aktywacji przynajmniej kilku niezależnych, ale współdziałających genów może wyjaśnić wieloetapowość rozłożonego w czasie procesu rozwoju nowotworu. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że każdy z etapów od stanu prawidłowego do pełnego przekształcenia nowotworowego, przez który przechodzi „napiętnowany" klon komórkowy może być uwarunkowany nabyciem określonej dewiacji genetycznej [1, 12].

Działanie drugiej klasy genów, określanych jako geny supresorowe lub antyonkogeny, w warunkach prawidłowych polega, jak sama nazwa wskazuje, na przeciwdziałaniu lub nawet przerywaniu procesu karcinogenezy, spełniając tym samym istotną rolę w negatywnej regulacji procesów proliferacji. Zawsze bardziej skomplikowana jest ocena aktywności negatywnej, dlatego geny supresorowe są dużo trudniejsze do badania od protoonkogenów. Wydaje się zatem zrozumiałe, że opisano dotychczas znacznie mniej genów supresorowych niż onkogenów. Najlepiej poznany jest gen supresorowy, znany jako *p53*, którego mutację lub delecję stwierdzono w wielu różnych typach nowotworów ludzkich jak np: rak sutka, jelita grubego, płuc, jajnika itp. [26-28], gen warunkujący podatność na występowanie siatkówczaka zarodkowego (*rb*), nerwiakowłókniaka (*NF1*), guzów nerki typu Wilmsa u dzieci (*WT1*) oraz gen związany z rozwojem tzw. polipowatości rodzinnej (*APC-adenomatous polyposis coli*) [5, 7, 29]. Przykłady zidentyfikowanych genów supresorowych zostały zebrane w tabeli 2.

Najciekawszym i najlepiej poznanym reprezentantem genów supresorowych jest gen *p53*, którego struktura oraz właściwości i rola biologiczna kodowanego przez ten gen białka p53 została już omówiona w piśmiennictwie polskim [30].

W warunkach fizjologicznych gen *p53* jest niezbędny w procesach kontroli i regulacji cyklu podziału komórkowego, replikacji DNA i różnicowania komórek [7, 27, 29, 31, 32] oraz w determinowaniu zaprogramowanego obumierania komórek (apoptozy) [7, 31-33]. Gen *p53*, jako negatywny regulator wzrostu, zyskał sobie

http://rcin.org.pl

Tabela 2

Przykłady nowotworowych genów supresorowych (wg. 14, zmodyfikowane)

Supresorowy gen nowotworowy	Locus w chromosomie	Przykłady nowotworów
p53	17p12-13.3	wszystkie przebadane typy ludzkich raków
APC	5q21-22	rak okrężnicy
DCC	18q21	rak okrężnicy
MCC	5q21-22	rak okrężnicy
NF1	17q11.2	włókniakonerwiaki
NF2	22q12	osłoniaki i oponiaki
Rb1	13q14	siatkówczak, mięsak kostny, rak piersi
WT1	11q13	nerczak płodowy (guz Wilmsa)
MEN-1	11q13	guzy przytarczyc, trzustki, kory nadnerczy

ostanio miano „żandarma molekularnego" stojącego na straży integralności genomu komórkowego [7, 32], zdolnego do zablokowania rozrostu komórek z uszkodzonym DNA, pozwalając tym samym na zadziałanie mechanizmów naprawczych przed uruchomieniem nowego cyklu podziałowego. Gdy mechanizmy naprawcze zawodzą, gen *p53* aktywuje proces apoptozy nie dopuszczając do rozwoju nieprawidłowych komórek [7, 32]. Gen *p53* jest ulokowany na krótkim ramieniu chromosomu 17 w pozycji 17p13.1 i strukturalnie obejmuje 11 eksonów [7, 27, 30, 31, 34]. Utrata prawidłowej funkcji genu *p53* może następować w różny sposób obejmując zaburzenia w obrębie samego genu (mutacje dziedziczone, mutacje somatyczne, delecje) oraz tworzenie kompleksów z białkami wirusowymi lub produktami genu komórkowego *MDM-2* [7, 31]. Okres połowicznego rozpadu prawidłowego białka p53 wynosi około 6-20 minut. Białko to nie akumuluje się w ilościach wykrywalnych stosowanymi metodami immunohistochemicznymi [7, 35]. Zmutowana forma białka p53 o wydłużonym okresie półtrwania 6-12 godzin, jest wykrywalna, co pozwala na uznanie białka p53 za bezpośredni wskaźnik mutacji na poziomie tego genu [7, 35]. Jak się ostatnio okazało istotną rolę w inaktywacji genu *p53* mogą odgrywać interakcje z białkami transformującymi niektórych wirusów typu DNA [7, 27, 31, 35], które tworzą z białkiem p53 stabilne kompleksy, doprowadzając w ten sposób do zniesienia normalnej funkcji genu. Okazało się również, że białka tych samych wirusów mają zdolność tworzenia podobnych kompleksów z innym dobrze poznanym białkiem kodowanym przez gen supresorowy *rb* odpowiedzialny za rozwój siatkówczaka zarodkowego gałki ocznej [27, 29, 31].

W przeciwieństwie do onkogenów utratę właściwości supresyjnych warunkuje inaktywacja genu *p53* w jednym allelu i delecja drugiego allelu, co tłumaczy, że geny supresorowe działają w sposób recesywny [5, 7, 16, 27, 30-32].

Zablokowanie prawidłowej funkcji genu *p53*, oprócz zaburzeń w mechanizmach regulacyjnych transkrypcji, może hamować zaprogramowaną apoptozę i tym samym odgrywać istotną rolę w unieśmiertelnianiu komórek [17, 31] chociaż nie wiadomo jeszcze w jakim stopniu w tym procesie uczestniczą inne zmiany na poziomie molekularnym [17]. Bardzo wiele informacji na temat genu *p53* i jego białkowego produktu publikowanych w ostatnich trzech latach potwierdza, że defekt w obrębie tego genu może mieć kluczowe znaczenie w procesie rozwoju różnych nowotworów ludzkich [6, 7, 16, 27, 29-32, 36, 37].

II. Dziedziczna predyspozycja do rozwoju nowotworów złośliwych

Coraz liczniej pojawiają się dane wskazujące, że wrodzony defekt pojedynczej kopii genu *p53* może mieć fundamentalne znaczenie w warunkowaniu i zrozumieniu dziedziczonej predyspozycji do występowania nowotworów [5, 7, 27, 32, 38, 39]. Typowym przykładem takiej dziedziczonej mutacji genu *p53* jest stosunkowo rzadko występujący zespół Li-Fraumeni, który charakteryzuje się wzrostem częstości pojawiania się różnych nowotworów [5, 7, 19, 27, 32, 39], przy czym rozwijają się one zwykle w młodym wieku i niekiedy obserwuje się współistnienie mnogich nowotworów pierwotnych [27, 29, 31, 40, 41]. Podobnie jak w przypadku siatkówczaka zarodkowego [5, 13, 29, 40], którego rozwój warunkuje gen supresorowy *rb*, w zespole Li-Fraumeni następuje dziedziczenie zmutowanego pojedynczego alletu genu *p53* a błąd ten jest powielany w komórkach potomnych [7, 31]. W tym przypadku prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej wzrasta niewspółmiernie, bowiem do całkowitej utraty funkcji supresorowej konieczne jest już tylko wystąpienie dodatkowej pojedynczej mutacji w pozostałym allelu [5, 7]. Wrodzoną mutację w genie *p53* wykryto jak dotąd w około 50% analizowanych rodzin z zespołem Li-Fraumeni [32], a ponadto także u osób z udokumentowaną rodzinnie historią częstszego występowania nowotworów pierwotnych, dwustronnych a nawet mnogich [7, 9, 32, 38, 40-42].

Jednym z najbardziej doniosłych odkryć ostatnich lat, pozwalających zrozumieć mechanizmy uwarunkowanego genetycznie rozwoju nowotworów była identyfikacja genu supresorowego *APC* usytuowanego na długim ramieniu chromosomu 5, [43-45]. Jak się okazało wykrycie zmutowanej formy tego genu sugeruje możliwość transformacji złośliwej mnogich zmian polipowatych w jelicie grubym [43, 45-48].

Zgodnie z przytaczanymi danymi, co najmniej 10% powszechnie występujących nowotworów, takich jak rak sutka, jajnika czy jelita grubego, może powstawać

http://rcin.org.pl

w wyniku dziedziczenia defektu genetycznego, przy czym u spokrewnionych członków tych rodzin ryzyko wystąpienia raka szacuje się w granicach 30-40% [9, 41, 42, 46, 47]. Już od dawna wiadomo, że rodziny w których występują znamiona barwnikowe z tendencją do dysplazji, mają większą szansę rozwoju czerniaka złośliwego. Podobnie wykrycie raka sutka u dwóch sióstr w wieku 40-45 lat, czy raka jelita grubego około 40 roku życia uważa się raczej za wynik predyspozycji genetycznej niż zwykłego przypadku [9, 42, 46, 47, 49].

Analiza materiału genetycznego członków rodzin o wyższej zapadalności na nowotwory, oprócz niekwestionowanego znaczenia dziedziczenia zdefektowanych genów supresorowych, ujawniła związek pomiędzy zapadalnością na nowotwory a dziedziczeniem polimorficznych markerowych sekwencji DNA, czyli krótkich powtarzających się ciągów nukleotydów (mikrosatelitarna niestabilność DNA) [6, 50-52]. Tego typu polimorfizm w obrębie krótkiego ramienia chromosomu 2 zwiększa ryzyko zachorowania na raka jelita grubego w przypadku, w którym nie stwierdzono wcześniejszego występowania polipowatości jelit [53-55], a polimorfizm w ramieniu długim chromosomu 17 powoduje wzrost skłonności do wystąpienia raka sutka, któremu może towarzyszyć ryzyko rozwoju raka jajnika [56]. Wykazanie znaczenia dziedziczonego polimorfizmu sekwencji DNA w warunkowaniu wrażliwości na choroby nowotworowe ma niepodważalne implikacje praktyczne. Wykorzystanie bowiem markerów mikrosatelitarnych otwiera drogę do rozpoznawania molekularnej predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych i sugeruje wzmożenie czujności onkologicznej przynajmniej w grupie tzw. „wysokiego ryzyka" [6, 50]. Należy jednak pamiętać, że wykrycie polimorfizmu sekwencji DNA nie przesądza w sposób jednoznaczny o rozwoju nowotworu złośliwego, a jedynie wskazuje na wrodzoną predyspozycję do zachorowania.

Rozważając mechanizm dziedzicznej podatności do rozwoju raka należy również uwzględnić możliwość zwiększonej wrażliwości na działanie genotoksycznych, a nawet niegenotoksycznych czynników egzogennych, które mogą indukować przypadkowe mutacje ułatwiające następową transformację nowotworową [51, 57, 58].

Nie ulega już wątpliwości, że nowotwory powstające poprzez dziedziczenie różnego rodzaju defektów genetycznych, jak i pośrednio uwarunkowane środowiskowo, rozwijają się torem podobnych mutacji, prowadzących w efekcie do destabilizacji genomu i zakłóceń w delikatnej równowadze pomiędzy procesami proliferacji i różnicowania [6].

Szybki postęp onkologii molekularnej i opracowywanie całych map genetycznych ludzkich nowotworów pozwala na wyróżnienie nieznanych dotąd markerów, umożliwiających identyfikację osób o zwiększonym ryzyku zachorowania a tym samym stwarza realne szanse profilaktyki przeciwnowotworowej.

Problem dziedzicznych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych z uwzględnieniem implikacji poznawczych i praktycznych został wyczerpująco omówiony w piśmiennictwie polskim w artykule prof. Steffena [50].

III. Wieloetapowy rozwój nowotworów

Z obserwacji patologów jasno wynika, że rozwój nowotworów złośliwych poprzedza na ogół wystąpienie zmian, określanych jako przednowotworowe typu hyperplazji, metaplazji i dysplazji, a w świetle obecnych danych wydaje się bardzo prawdopodobne, że każdemu z etapów przekształcenia nowotworowego mogą odpowiadać niewielkie, ale określone zmiany w genomie komórki ulegającej procesowi transformacji. Takie ujęcie tłumaczy również wieloetapowy, powolny proces rozwoju nowotworu złośliwego. Przyjmując dominujący ciągle pogląd o monoklonalnym pochodzeniu nowotworów należy uznać, że aby pojedyncza komórka mogła ulec pełnej transformacji musi mieć utrwalone mutacje w co najmniej kilku, a może i kilkunastu genach. Na przestrzeni całego życia aparat genetyczny naszych komórek i tkanek jest ustawicznie narażony na występowanie zmian o charakterze mutacji. W miarę dorastania, a następnie starzenia się ustroju, u każdego z nas wzrasta liczba i różnorodność zmutowanych komórek. W tej sytuacji wystąpienie lub brak rozwoju nowotworu może być kwestią długości życia, sprawności układu immunologicznego, skomasowanego działania niekorzystnych czynników środowiskowych czy obciążeń dziedzicznych [4, 6, 13, 57, 59]. Uwzględniając złożony mechanizm procesu nowotworzenia i udowodnioną rolę onkogenów i genów supresorowych wydaje się zrozumiałe, że pojedynczy onkogen, nawet przy współdziałaniu z pojedynczym genem supresorowym trudno byłoby uznać za wystarczający czynnik transformujący. O wiele bardziej prawdopodobna jest konieczność kaskadowego współdziałania onkogenów i genów supresorowych [6, 35, 59, 60].

Nowotwór rozwija się w trzech zasadniczych etapach znanych jako inicjacja-promocja-progresja. Termin inicjacja określa pierwsze trwałe i nieodwracalne zmiany w genomie komórki [58, 61-63]. Zgodnie z ostatnimi poglądami [62] zmiany te dotyczą głównie genów sterujących prawidłowym przebiegiem cyklu podziałowego komórki, a ich konsekwencją jest powstanie nowego klonu komórek, obdarzonego selektywną przewagą wzrostową w stosunku do otaczającego środowiska. Mianem promocji określany jest proces, w którym następuje klonalny wzrost komórek do stanu widocznej klinicznej zmiany, zwykle o charakterze łagodnym [58, 63]. Ten etap rozwoju nowotworu jest odwracalny uwarunkowany działaniem czynników epigenetycznych i w dużej mierze zależy od zdolności tzw. czynników promujących do interakcji

http://rcin.org.pl

ze swoistymi receptorami komórkowymi [62, 63]. Mechanizm promocji nie jest ostatecznie poznany, ale szereg danych wskazuje, że czynniki takie jak np. alkohol, nikotyna, promieniowanie ultrafioletowe, nieodpowiednia dieta, hormony itp. selektywnie stymulują podziały komórkowe zwłaszcza w populacji „zainicjowanych" wcześniej komórek, tzn. takich w których zostały już utrwalone pierwsze zmiany genetyczne [58, 59, 61, 63, 64]. W konsekwencji powstają dalsze błędy genetyczne, a zwłaszcza nadmierna ekspresja genów sterujących syntezą czynników wzrostu i ich receptorów [43, 46-48]. Stan progresji nowotworu charakteryzuje nasilająca się destabilizacja genetyczna i ewolucja w kierunku wzrostu stopnia proliferacji komórek oraz miejscowe naciekanie tkanek i narządów [58, 61, 63, 65]. Definicję procesu progresji można obecnie sformułować jako wynik nakładających się błędów genetycznych spowodowanych utratą, inaktywacją, mutacją lub nadekspresją licznych genów [66].

IV. Molekularne podstawy rozwoju przerzutów

Końcowym etapem progresji nowotworów jest zdolność do przerzutowania. Rozwój przerzutów stanowi przyczynę śmierci z powodu choroby nowotworowej. Wiadomo obecnie, że jest to proces wysoce selektywny, bowiem wśród heterogennej populacji rosnącego guza tylko niewielki odsetek komórek jest obdarzony zdolnością do tworzenia przerzutów [67, 68]. Aby komórki nowotworowe mogły zasiedlić narząd często odległy od ogniska pierwotnego, muszą pokonać szereg etapów pośrednich wynikających ze złożonych interakcji pomiędzy rosnącym guzem i organizmem gospodarza [67-70]. Proces ten określany jest nawet w onkologii jako „kaskada przerzutowa" [71, 72]. Chociaż mechanizmy odpowiedzialne za przerzutowe zachowanie komórek nie są jeszcze w pełni poznane, wiadomo że do rozwoju przerzutów dochodzi wówczas, gdy pewne subpopulacje komórek tworzących nowotwór nabędą zdolności do oderwania się od podstawowej masy nowotworu pierwotnego, potrafią pokonać barierę naczyniową i przeżyć w krążeniu gospodarza pomimo możliwości mechanicznego uszkodzenia i działania mechanizmów obronnych. W dalszym etapie muszą ulec wynaczynieniu i zakotwiczyć się w tkankach często oddalonych od macierzystego nowotworu [67-69, 71, 72]. Pomimo ogromnego znaczenia klinicznego, badania mechanizmów rozwoju przerzutów na poziomie molekularnym nie są zbyt zaawansowane, zwłaszcza w porównaniu z licznymi danymi na temat zaburzeń genetycznych związanych z procesem transformacji nowotworowej. Obecnie przeważają jednak poglądy, że geny kontrolujące i określające zdolności przerzutowe są odmienne i niezależne od genów odpowiedzialnych za powstanie i rozwój nowotworu pierwotnego [67, 68, 71]. Złożony charakter procesu przerzutowania wskazuje ną możliwość uczynniania kolejnych zmian na poziomie molekularnym, obejmujących aktywację i inaktywację dodatkowych genów, co w konsekwencji może prowadzić do stanu całkowitego rozchwiania aparatu genetycznego komórek.

W ostatnich latach udało się zidentyfikować pierwszy gen spełniający funkcję supresora przerzutów, który określono symbolem *nm23* (*non-metastatic, clone* 23) [70]. Jak się okazało wysoki poziom białka kodowanego przez ten gen występował w komórkach mysiego czerniaka o niskiej potencji przerzutowej i odwrotnie, niski poziom nm23 towarzyszył wysokim zdolnościom przerzutowym [70, 73]. Stopień ekspresji genu był niezależny od funkcji układu immunologicznego i wrażliwości komórek nowotworowych na reakcje obronne ustroju [68, 70]. Dalsze badania wykazały, że niski stopień ekspresji produktu genu *nm23* koreluje z wysoką aktywnością przerzutową raka sutka u ludzi [74, 75], a w roku ubiegłym przedstawiono dowody, że mutacja w obrębie genu *nm23* warunkuje rozwój odległych przerzutów u chorych z gruczolakorakiem jelita grubego [76, 77]. Jak się okazało w badaniach immunohistochemicznych klony komórek występujące w obrębie heterogennej populacji nowotworu i charakteryzujące się niską aktywnością białka kodowanego przez gen *nm23* są zdolne do zapoczątkowania procesu przerzutowania. Ogniska przerzutowe w wątrobie, płucach czy trzustce wykazywały znacznie niższą immunoreaktywność produktu *nm23* aniżeli ognisko pierwotne [76]. Obecnie wiadomo, że rodzina genu nm23 obejmuje co najmniej dwa geny określane jako *nm23H1* i *nm23H2* o dużym stopniu wzajemnej homologii [77], przy czym w nowotworach ludzkich czynne jest głównie białko kodowane przez gen *nm23H1* [77, 78]. Dokładne zależności pomiędzy funkcjonalnymi właściwościami białka nm23 i jego biologiczna rola w procesie przerzutowania nie zostały jeszcze bliżej poznane [76, 77], ale na podstawie badań ogniska pierwotnego i przerzutów gruczolakoraka jelita grubego wiadomo, że zmniejszona aktywność genu *nm23* jest związana ze wzrostem zdolności do tworzenia przerzutów [76, 78].

Ostatnio pewne znaczenie w tworzeniu przerzutów przypisuje się działaniu genu określanego jako *CD44* [79-83]. Produkt białkowy genu *CD44* wykrywany na powierzchni komórek prawidłowych uczestniczy w adhezji komórkowej i kontroli recyrkulacji limfocytów [80, 82, 83]. W 1991 r. Gunthart i wsp. [84] zidentyfikowali formę glikoproteiny CD44, której ekspresja okazała się niezbędna dla ujawnienia przerzutowych właściwości komórek gruczolakoraka trzustki u szczurów. Następnie okazało się, że tego typu „metawarianty" CD44 można wykryć w różnych nowotworach ludzkich, takich jak czerniak złośliwy, rak sutka, jelita grubego i przełyku [82, 83]. Wysoka ekspresja tego białka charakteryzowała również komórki inwazyjnego raka pęcherza moczowego i agresywny przebieg ziarnicy złośliwej [81, 83]. Z uwagi na częste występowanie nietypowych form CD44 w no-

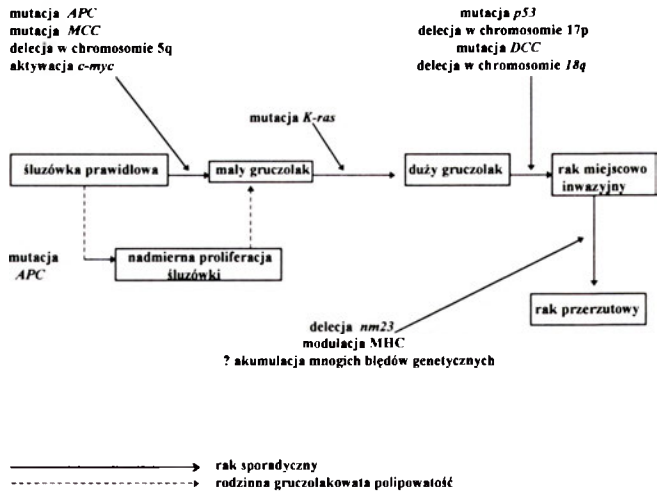
http://rcin.org.pl

wotworach pierwotnych uważa się, że białko CD44 może odgrywać istotną rolę zarówno we wzroście nowotworu pierwotnego, jak i w tworzeniu przerzutów [81-83]. Niektórzy autorzy [82] uważają, że wykrywanie określonych form CD44 może mieć duże znaczenie diagnostyczne i umożliwiać identyfikację nawet nielicznych komórek nowotworowych obecnych w łatwo dostępnych wydzielinach i płynach ustrojowych takich jak krew, ślina, mocz czy kał chorego. Ostateczne rozstrzygnięcie znaczenia produkcji nietypowych form białka CD44 dla procesu transformacji nowotworowej i ujawnienia aktywności przerzutowej wymaga dalszych badań [82, 83]. Na początku 1994 roku przedstawiono dowody, że poziom krążącego produktu genu *CD44* oznaczany w surowicy chorych z rakiem żołądka i jelita grubego koreluje z masą guza i zdolnością do tworzenia przerzutów. Po doszczętnej resekcji nowotworu obserwowano spadek stężenia CD44 [81]. Na tej podstawie autorzy [81] wnioskują, że krążąca forma białka CD44 może spełniać rolę wartościowego markera progresji i efektów terapeutycznych wielu chorób nowotworowych.

W obecnej chwili rola i mechanizm działania genów kontrolujących wzrost zdolności do tworzenia przerzutów pozostaje niewyjaśniony, a złożony charakter progresji choroby nowotworowej dodatkowo komplikuje poznanie fenotypu przerzutowego. Nie ulega jednak wątpliwości, że identyfikację genów przerzutowych i wykrywanie ich produktów można zaliczyć do jednego z ważniejszych problemów współczesnej onkologii molekularnej.

V. Genetyczne podłoże gruczolakoraka jelita grubego

Rak jelita grubego stanowi typowy przykład nowotworu człowieka, w którego patogenezie i progresji wykazano zmiany genetyczne, warunkujące poszczególne etapy procesu transformacji. Pojawienie się zmian gruczolakowatych na podłożu normalnej śluzówki jelita z następową konwersją w kierunku gruczolakoraka, wreszcie rozwój nowotworu inwazyjnego i zdolności do przerzutowania są związane z nabyciem określonych błędów genetycznych obejmujących inaktywację kilku genów supresorowych i aktywację niektórych onkogenów [4, 10, 42, 43, 45, 47, 48, 85, 86] (Ryc. 1). Jak się okazało, już w niewielkich zmianach polipowatych (5 mm) można wykazać obecność zmutowanej formy genu supresorowego *APC* [10, 44]. Możliwość wykrycia wczesnych zmian na poziomie molekularnym dostarcza nieinwazyjnej metody, pomocnej w okresowych kontrolach przynajmniej w grupie osób o podwyższonym ryzyku rozwoju nowotworu [10, 43]. Mutacje w genie *APC* są również wykrywane w przypadkach gdy wystąpienie raka jelita grubego nie można powiązać z rodzinną historią chorób nowotworowych. Ich stwierdzenie jest uważane za najwcześniejszą, dotychczas poznaną zmianę genetyczną spotykaną w rozwoju gruczolakoraków dolnego odcinka przewodu pokarmowego [10, 43, 48].



Ryc. 1. Sekwencja zmian genetycznych w rozwoju gruczolakoraka jelita grubego (wg. 43)

Przy okazji badań genu *APC* stwierdzono występowanie dodatkowej delecji w dużym genie ulokowanym na tym samym chromosomie 5, którą określono jako *MCC* (*mutated in colorectal cancer*) [4, 43]. Są to wyniki badań ostatnich 2-3 lat i dotychczas oprócz uznania genu *MCC* za dodatkowy gen supresorowy unieczynniany w patogenezie raka jelita grubego, brak jest bardziej szczegółowych informacji na temat biologicznej roli tego genu.

Spośród onkogenów za najbardziej istotny w rozwoju raka jelita grubego uznano onkogen określany, jako *K-ras*, kodujący białka cytoplazmatyczne odgrywające kluczową rolę w procesach wzrostu i różnicowania [10, 20, 21, 85, 87-89]. Obecność produktu zmutowanego genu *K-ras* rzadko udaje się wykazać w małych zmianach gruczolakowatych, natomiast stopień jego ekspresji wyraźnie wzrasta w dużych, przekraczających 1 cm średnicy gruczolakach [10, 43, 45, 86, 87]. Obecność zmutowanego genu *K-ras* można wykryć w około 40-50% wszystkich gruczolakoraków dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Zgodnie z poglądami wielu autorów jego ekspresja w zmianach przednowotworowych może stanowić wskaźnik ryzyka następowego rozwoju nowotworu złośliwego [45, 85, 87, 90, 91]. Wykrycie produktu genu *ras* w śluzówce otaczającej usuniętą zmianę nowotworową przemawia, z dużym prawdopodobieństwem, za możliwością nawrotu gruczolakoraka w stosunkowo krótkim czasie [90].

W ubiegłym roku zaczęły pojawiać się pojedyncze doniesienia wskazujące, że mutacja genu *K-ras* może następować nawet na bardzo wczesnym etapie transformacji nowotworowej [23, 92] i jest stwierdzana głównie w gruczolakach, których rozwój nie jest uwarunkowany występowaniem zmian polipowatych [23]. Na tej podstawie autorzy wnioskują o różnym molekularnym podłożu gruczolaków i rozwijających się następowo gruczolakoraków jelita grubego [23].

http://rcin.org.pl

W powstawaniu raka jelita grubego opisano również udział onkogenów kodujących białka jądrowe i określanych symbolami *myc* i *fos* [43, 47, 86, 93-95]. Zgodnie z poglądami niektórych autorów [93, 95] ujawnienie produktu genu *myc* w gruczolakach i wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego może świadczyć o nasileniu zmian dysplastycznych i możliwości konwersji w kierunku gruczolakoraka [93, 95].

Zgodnie z doniesieniami obecnego dziesięciolecia, określanego nawet w onkologii jako „dekada genów supresorowych", w rozwoju gruczolakoraka jelita grubego przeważają zmiany o charakterze delecji lub mutacji inaktywujących geny supresorowe [10, 43, 45, 48]. Oprócz genów *APC* i *MCC*, dotyczą one genów ulokowanych na chromosomie 17 i 18 i stanowią istotny warunek transformacji gruczolaka do gruczolakoraka [10, 45]. Zmiany obejmujące gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 18, zostały określone jako *DCC* (*deleted in colorectal carcinoma*). Jak dotychczas były one wykryte głównie w zmianach złośliwych u ponad 70% chorych z gruczolakorakami. Mutacje tego typu wydają się zatem związane ze stosunkowo późnym etapem procesu karcinogenezy [10, 43, 45]. Dotychczasowe dane wskazują, że gen *DCC* koduje białka odpowiedzialne za adhezję komórkową i reguluje interakcje komórki z otaczającym ją środowiskiem [43, 45]. Najlepiej poznana i najczęściej opisywana mutacja w gruczolakorakach jelita grubego dotyczy genu supresorowego *p53* [7, 35, 43, 96]. Wystąpienie mutacji w obrębie tego genu powoduje utratę kontroli nad zdolnością proliferacyjną oraz może zapobiegać zaprogramowanej śmierci komórek [7, 35, 97, 98]. Wielu autorów uważa obecnie, że uwolnienie się od mechanizmów negatywnej kontroli procesów wzrostowych stanowi najważniejszy etap w rozwoju nowotworów złośliwych [7, 99]. Pojawienie się nawet kilku komórek z wykrywalnym produktem zmutowanego genu *p53* w stanach przednowotworowych (gruczolaki, wrzodziejące zapalenie jelita grubego) może predysponować tę subpopulację do selektywnej przewagi wzrostowej, odpowiedzialnej w dalszym etapie za rozwój gruczolakoraka [100, 101]. Jak dotąd mutacji w genie *p53* nie udało się wykazać we wszystkich przypadkach gruczolakoraka jelita grubego i na tej podstawie dyskutuje się możliwość działania w tej podgrupie raków odmiennych mechanizmów genetycznych, w których inaktywacja genu *p53* nie stanowi niezbędnego warunku procesu karcinogenezy [35]. Niemniej na podstawie dotychczasowych osiągnięć onkologii molekularnej można uznać jako pewnik, że w procesie transformacji nowotworowej następuje uszkodzenie i strukturalna zmiana w obrębie onkogenów i genów supresorowych, w wyniku czego dochodzi również do zmiany struktury i funkcji białek kodowanych przez te geny.

W takim ujęciu wydaje się zrozumiałe, że akumulacja błędów genetycznych w wielu genach, niezależnie czy są one wynikiem procesu dziedziczenia, samoistnej mutacji, czy też konsekwencją działania czynników środowiskowych, stanowi podstawowy warunek determinujący rozwój fenotypu złośliwego w pierwotnie prawidłowej komórce [4, 5, 7, 9, 10, 48]. Możliwość wykrywania kolejnych zmian genetycznych pozwala na określenie sekwencji polip-rak (Ryc. 1) w procesie rozwoju i progresji gruczolakoraka jelita grubego. Identyfikacja tych zmian może również pomóc w wytypowaniu wartościowych markerów o wystarczającej czułości i swoistości dla wykrywania stanów przednowotworowych, wczesnych etapów rozwoju nowotworu i prognozowania klinicznego przebiegu choroby nowotworowej [96, 98, 102].

VI. Implikacje kliniczne, perspektywy

Nie ulega już wątpliwości, że postępy w onkologii molekularnej zrewolucjonizowały nie tylko poglądy na patogenezę nowotworów, ale stworzyły i tworzą nowe podstawy współczesnej diagnostyki, prognozowania, a nawet terapii genowej. Stosowane techniki biologii molekularnej, zwłaszcza ocena sekwencji DNA oraz wykrywanie produktów onkogenów i genów supresorowych na poziomie komórek czy tkanek, w wielu przypadkach pozwalają na wyłonienie osób z wrodzoną predyspozycją do rozwoju nowotworu, identyfikację wczesnych stanów nowotworowych oraz przewidywanie biologicznego zachowania guza umożliwiając następową odpowiednią interwencję kliniczną [4, 5, 43, 103]. Ostatnio wykazano np. że wykrycie zmutowanej formy genu *ras* w komórkach obecnych w stolcu chorych z gruczolakami wskazuje możliwość szybkiej transformacji w kierunku gruczolakoraka [43]. Wiele doniesień wskazuje, że ekspresja białka p53 w tkance gruczolakoraka jelita grubego stanowi zły wskaźnik rokowniczy świadczący o wysokiej aktywności proliferacyjnej komórek nowotworowych, wyższej zdolności przerzutowej i sugerujący krótszy czas przeżycia chorych [5, 10, 35, 98].

Poznanie zmian zachodzących w onkogenach i genach supresorowych w przebiegu wieloetapowej karcinogenezy oraz określenie wpływu tych zmian na proces przekształcania nowotworowego stwarza realne nadzieje wypracowania nowych możliwości terapeutycznych, co jest tym bardziej istotne, że w tej dziedzinie nie notowano zdecydowanego postępu od ponad 40 lat. Wydaje się prawdopodobne, że uzupełnienie genów supresorowych przez wprowadzenie do komórek docelowych genu z utrzymaną funkcją supresorową lub osłabienie działania onkogenów może powodować zahamowanie rozrostu komórek nowotworowych [4, 5, 43, 89, 103]. Co więcej, niektórzy autorzy uważają, że nawet korekcja jednego z defektywnych genów supresorowych może niekiedy wystarczać do zablokowania rozwoju procesu karcinogenezy [43]. Potwierdzenie tych obserwacji mogłoby znacznie uprościć terapię genową wielu typów nowotworów, w których przebiegu udowodniono istnienie komplek-

http://rcin.org.pl

sowych błędów genetycznych.

Przed onkologią molekularną stoi zatem ogromne wyzwanie — wskazanie nowych technik i wytypowanie markerów genetycznych dla wczesnego wykrywania i prognozowania przebiegu chorób nowotworowych a w dalszym etapie opracowanie strategii terapeutycznych zmierzających do supresji onkogenów i korekty aktywności genów supresorowych.

Artykuł otrzymano 5 października 1994 r.
Zaakceptowano do druku 15 grudnia 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Hall EJ (1993) *Br J Radiol* **66**: 1-11
2. Smith MR, Matthews NT, Jones KA, Kung HF (1993) *Pharmac Ther* **58**: 211-236
3. Harłozińska-Szmyrka A, Ślesak B (1992) *Post Med Klin Dośw* **1**: 281-287
4. Smith PJ (1993) *Med J Australia* **158**: 851-853
5. Carbone DP, Minna JD (1993) *Annu Rev Med* **44**: 451-464
6. Karp JE, Broder S (1994) *Cancer Res* **54**: 653-665
7. Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K (1993) *Br J Cancer* **68**: 653-661
8. Spandidos DA, Liloglou T, Field JK (1993) *Stem Cells* **11**: 194-198
9. Ponder BAJ (1992) *Br Med J* **304**: 1234-1236
10. Hurwitz M, Sawicki M, Samara G, Passaro E Jr (1992) *Am J Surg* **164**: 299-306
11. Hollingsworth RE, Lee WH (1991) *J Natl Cancer Inst* **83**: 91-96
12. Miller DM, Blume S, Borst M, Gee J, Polansky D, Ray R, Rodu B, Shrestha K, Snyder R, Thomas S, Tran-Paterson R (1990) *Am J Med Sci* **300**: 59-69
13. Friend SH, Dryja TP, Weinberg RA (1988) *N Engl J Med* **318**: 618-622
14. Karlan BY, Krakow D (1994) *Curr Opin Obstetr Gynecol* **6**: 105-110
15. Samara G, Hurwitz M, Sawicki M, Passaro E Jr (1992) *Am J Surg* **164**: 389-396
16. Diamandis EP (1992) *Crit Rev Clin Lab Sci* **29(3.4)**: 269-305
17. Khoobyarian N, Marczynska B (1993) *Virus Res* **30**: 113-128
18. Barbacid M (1990) *Eur J Clin Invest* **20**: 225-235
19. Ronai Z (1992) *Oncol Res* **4**: 45-48
20. Fearon ER (1993) *J Natl Cancer Inst* **85**: 1978-1980
21. Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T (1993) *Science* **260**: 85-88
22. McKenzie SJ (1991) *Biochim Biophys Acta* **1072**: 193-214
23. McLellan EA, Owen RA, Stepniewska KA, Sheffield JP, Lemoine NR (1993) *Gut* **34**: 392-396
24. Garte SJ (1993) *Crit Rev Oncogen* **4**: 435-449
25. Weiner T, Cance WG (1994) *Am J Surg* **167**: 428-434
26. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD (1992) *Am J Pathol* **140**: 145-153
27. Tominaga O, Hamelin R, Remvikos Y, Salmon RJ, Thomas G (1992) *Crit Rev Oncogen* **3**: 257-282
28. Bartek J, Bartkova J, Wojtesek B, Staskova Z, Lukas J, Rejthar A, Kovarik J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP (1991) *Oncogene* **6**: 1699-1703
29. Cowell JK (1992) *Ann Oncol* **3**: 693-698
30. Berbeć H (1994) *Post Biochem* **40**: 6-11
31. Donehower LA, Bradley A (1993) *Biochim Biophys Acta* **1155**: 181-205
32. Frebourg T, Friend SH (1993) *J Natl Cancer Inst* **85**: 1554-1557
33. Berns A (1994) *Curr Biol* **4**: 137-139
34. Siedlecki J (1992) *Nowotwory* **42**: 196-197
35. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K (1993) *Am J Gastroenterol* **88**: 174-186
36. Brown R (1993) *Ann Oncol* **4**: 623-629
37. Koshland D Jr (1993) *Science* **262**: 1953
38. Frebourg T, Friend SH (1992) *J Clin Invest* **90**: 1637-1641
39. Li FP, Garber JE, Friend SH, Strong LC, Patenaude AF, Juengst ET, Reilly PR, Correa P, Fraumeni JF Jr (1992) *J Natl Cancer Inst* **84**: 1156-1160
40. Pierotti MA, Dragani TA (1992) *Curr Opin Oncol* **4**: 127-133
41. Grover S, Quinn MA, Weideman P (1993) *Cancer* **72**: 526-530
42. Bhagirath T, Condie A, Dunlop MG, Wyllie AH, Prosser J (1993) *Br J Cancer* **68**: 712-714
43. Scott N, Quirke P (1993) *Gut* **34**: 289-292
44. Nagase H, Nakamura Y (1993) *Hum Mutat* **2**: 425-434
45. Williams AC, Browne SJ, Manning AM, Hague A, van der Stappen JWJ, Paraskeva C (1993) *Cancer Biol* **4**: 153-159
46. Young GP, Demediuk BH (1992) *Curr Opin Oncol* **4**: 728-735
47. Waliszewski P (1992) *Pat Pol* **43**: 73-78
48. Iino H, Fukayama M, Maeda Y, Koike M, Mori T, Takahashi T, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M, Mizuno S, Watanabe S (1994) *Cancer* **73**: 1324-1331
49. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR (1993) *Gastroenterology* **104**: 1535-1549
50. Steffen J (1993) *Nowotwory* **43**: 279-297
51. Siedlecki JA (1993) *Nowotwory* **43**: 362-364
52. Weber JL, May PE (1989) *Am J Human Genet* **44**: 388-396
53. Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanenm L, Mecklin JP, Jarvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, Petersen GM, Hamilton SR, Chapelle ADL, Vogelstein B (1993) *Science* **260**: 810-812
54. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) *Science* **260**: 816-819
55. Young J, Leggett B, Gustafson C, Ward M, Searle J, Thomas L, Buttenshaw R, Chenevix-Trench G (1993) *Hum Mutat* **2**: 351-354
56. Roberts L (1993) *Science* **259**: 622-625
57. Purchase IFH (1994) *Hum Exp Toxicol* **13**: 17-28
58. Pitot HC, Dragan YP (1991) *FASEB J* **5**: 2280-2286
59. Sugimura T (1992) *Science* **258**: 603-607
60. Wick MR (1992) *Am J Clin Pathol* **97** (Suppl 1): S1-S3
61. Pitot HC (1993) *Cancer Detect Prevent* **17**: 567-573
62. Kaufmann WK, Kaufman DG (1993) *FASEB J* **7**: 1188-1191
63. Barrett JC, Wiseman RW (1987) *Environ Health Perspect* **76**: 65-70
64. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE (1990) *Cancer Res* **50**: 7415-7421
65. Mareel MM, Van Roy FM, Bracke ME (1993) *Crit Rev Oncogen* **4**: 559-594
66. Hart IR, Saini A (1992) *Lancet* **339**: 1453-1457
67. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA (1993) *Annu Rev Cell Biol* **9**: 541-573
68. Sobel ME (1990) *J Natl Cancer Inst* **82**: 267-276
69. Siedlecki JA (1993) *Nowotwory* **43**: 367-369
70. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME (1988) *J Natl Cancer Inst* **80**: 200-204
71. Shekhar PVM, Aslakson CJ, Miller FR (1993) *Cancer Biol* **4**: 193-204
72. Wright JA, Egan SE, Greenberg AH (1990) *Anticancer Res* **10**: 1247-1256
73. Cheng KC, Diaz MO (1991) *Cancer Cells* **3**: 188-192
74. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS (1989) *Cancer Res* **49**: 5185-5190
75. Hennesy C, Henry JA, May FEB, Westley BR, Angus B, Lennard TWJ (1991) *J Natl Cancer Inst* **83**: 281-285
76. Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E (1993) *Virchows Arch B Cell Pathol* **63**: 213-218
77. Wang L, Patel U, Ghosh L, Chen H-C, Banerjee S (1993) *Cancer Res* **53**: 717-720
78. Yamaguchi A, Urano T, Fushida S, Furuka-

http://rcin.org.pl

wa K, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I, Nakagawara G, Shiku H (1993) *Br J Cancer* **68**: 1020-1024
79. Dorudi S, Hart IR (1993) *Curr Opin Oncol* **5**: 130-135
80. Wirth K, Arch R, Somasundaram C, Hofmann M, Weber B, Herrlich P, Matzku S, Zoller M (1993) *Eur J Cancer* **29A**: 1172-1177
81. Guo Y-J, Liu G, Wang X, Jin D, Wu M, Ma J, Sy MS (1994) *Cancer Res* **54**: 422-426
82. Matsumura Y, Tarin D (1992) *Lancet* **340**: 1053-1058
83. Tanabe KK, Ellis LM, Saya H (1993) *Lancet* **341**: 725-726
84. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann S, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P (1991) *Cell* **65**: 13-24
85. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA (1993) *Cancer* **71**: 3827-3838
86. Magrisso IJ, Richmond RE, Carter JH, Pross CB, Gilfillen RA, Carter HW (1993) *Lab Invest* **69**: 674-681
87. Boughdady IS, Kinsella AR, Haboubi NY, Schofield PF (1992) *Surg Oncol* **1**: 275-282
88. Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO, Gaudernack G (1994) *Br J Cancer* **69**: 367-371
89. Feig LA (1993) *J Natl Cancer Inst* **85**: 1266-1268
90. Minamoto T, Ronai Z, Yamashita N, Ochiai A, Sugimura T, Mai M, Esumi H (1994) *Int J Oncol* **4**: 397-401
91. Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Validire P, Melot T, Mosseri V, Salmon RJ, Thomas G (1991) *Int J Cancer* **49**: 220-223
92. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL (1993) *J Nal Cancer Inst* **85**: 2004-2007
93. Pavelic ZP, Pavelic L, Kuvelkar R, Gapany SR (1992) *Anticancer Res* **12**: 171-176
94. Smith DR, Myint T, Goh H-S (1993) *Br J Cancer* **68**: 407-413
95. Melhem MF, Meisler AI, Finley GG, Bryce WH, Jones MO, Tribby II, Pipas JM, Koski RA (1992) *Cancer Res* **52**: 5853-5864
96. Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE, Taylor GR, Dixon MF, Quirke P (1993) *Gastroenterology* **104**: 57-64
97. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993) *Cell* **74**: 957-967
98. Yamaguchi A, Nakagawara G, Kurosaka Y, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I (1993) *Br J Cancer* **68**: 399-402
99. Chigira M, Arita S, Watanabe H (1993) *Int J Oncol* **2**: 931-935
100. Taylor HW, Boyle M, Smith SC, Bustin S, Williams NS (1993) *Br J Surg* **80**: 442-444
101. Ślesak B, Harłozińska A, Łapińska J (1994) *Cancer Molec Biol* **1**: 199-205
102. Gulbis B, Galand P (1993) *Hum Pathol* **24**: 1271-1285
103. Shaw GL, Strivastava S (1993) *J Natl Cancer Inst* **85**: 1377-1381

Powtórzenia DNA

Repeats of DNA

JOLANTA KWIATKOWSKA[1],
TOMASZ TRZECIAK[2],
RYSZARD SŁOMSKI[1,3,4]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Satelitarny DNA
III. Sekwencje minisatelitarne
IV. Sekwencje mikrosatelitarne
V. Geny tandemowe
VI. Zastosowanie analizy sekwencji powtórzonych
VII. Perspektywa dalszych badań sekwencji powtórzonych

Contents:

I. Introduction
II. Satellite DNA
III. Minisatellite sequences
IV. Microsatellite sequences
V. Tandem genes
VI. Application of analysis of repeated sequences
VII. Prospective of further research of repeated sequences

I. Wstęp

Charakterystyczną cechą genomu *Eukaryota* jest występowanie powtórzeń nukleotydów w DNA. Biologia i ewolucja sekwencji powtórzonych stała się bardziej zrozumiała dopiero w ostatnich latach. Badania tych sekwencji prowadzone są od prawie 30 lat, lecz do dnia dzisiejszego ośrodki naukowe zajmujące się strukturami sekwencji powtórzonych w genomach różnych organizmów dostarczają nowych koncepcji i teorii dotyczących natury, nazewnictwa i klasyfikacji sekwencji powtórzonych. Sekwencje powtórzone występują w blokach (tandemach) lub są rozproszone

[1] Dr, Zakład Genetyki Człowieka PAN ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, [2] student V roku Akademii Medycznej w Poznaniu, [1,3,4] prof. dr hab., Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań, [4] Laboratorium Genetyki Molekularnej ul. Szecherezady 100, 60-195 Poznań

http://rcin.org.pl

w genomie. Sekwencje powtórzone występujące w genomie człowieka sklasyfikowanego w dwóch grupach: grupa I obejmuje sekwencje tworzące duże tandemowe bloki, w których jednostki powtarzające się występują kolejno po sobie, natomiast grupa II obejmuje sekwencje tworzące małe tandemowe bloki zgrupowane lub rozproszone w genomie [1].

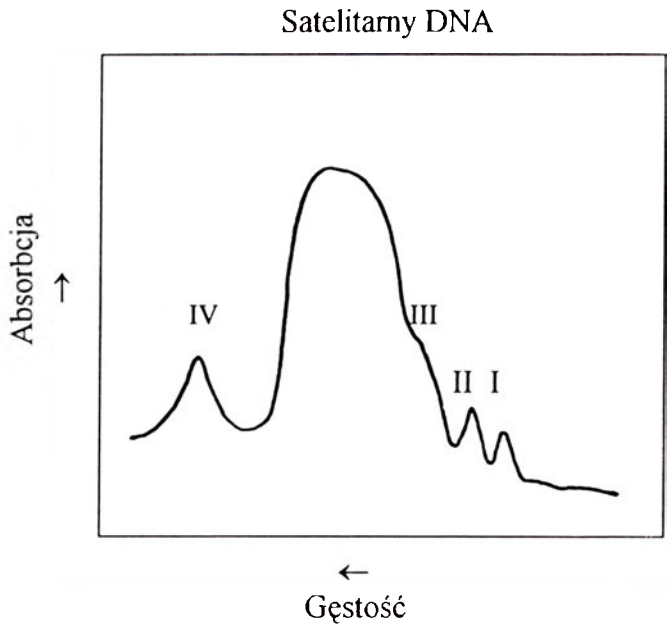
Pod względem częstości występowania do grupy I zalicza się trzy klasy sekwencji [1-3]: a) sekwencje bardzo często powtarzające się, występujące z częstością powyżej 10^5 kopii w genomie; b) sekwencje występujące ze średnią częstością 10^2-10^5 kopii; c) sekwencje występujące z częstością 2-100 kopii. Długość jednostki powtórzonej wynosi od pojedynczych nukleotydów do kilku tysięcy nukleotydów. Grupa I sekwencji powtórzonych reprezentowana jest przez sekwencje satelitarnego DNA oraz rodziny sekwencji powtórzonych, natomiast do grupy II należą sekwencje minisatelitarne i mikrosatelitarne.

W nieco inny sposób sklasyfikował sekwencje powtórzone Singer [4]. Wyróżnił on krótkie i długie rozrzucone segmenty sekwencji powtórzonych (SINE ang: *short interspersed repeated segments* i LINE ang: *long interspersed repeated segments*). Sekwencje typu SINE charakteryzują się długością do 500 pz i występowaniem z częstością 10^5 w genomach pomiędzy genami, wewnątrz intronów i w sekwencjach satelitarnych. Sekwencje SINE utożsamiane są z rodziną sekwencji Alu. Sekwencje zaliczane do grupy LINE opisano u ssaków. Występują one z częstością 10^4 i ich długość może przekraczać 5 tys. pz. U człowieka sekwencje LINE stanowią 2-3% całkowitego DNA komórki przy czym wielkość motywu waha się od 60 pz do 6 tys.-7 tys. pz. Przykładem sekwencji LINE jest rodzina sekwencji Kpn.

II. Satelitarny DNA

Sekwencje satelitarne są sekwencjami ułożonymi tandemowo, w bloki złożone z kilku milionów krótkich motywów [5]. Sekwencje te różnią się od całkowitego DNA podwyższoną zawartością par GC. Nazwa sekwencje satelitarne pojawiła się zanim wykazano, że składają się one z tandemowych powtórzeń i wynikała z obserwacji preparatów DNA po wirowaniu w gradiencie gęstości CsCl, ponieważ sekwencje te tworzyły dodatkowe frakcje. W odróżnieniu od DNA *Prokaryota*, który nie ulega rozdziałowi podczas wirowania w gradiencie gęstości, DNA *Eukaryota* w czasie wirowania rozdziela się na kilka frakcji. Liczba powtórzeń sekwencji i częstość ich występowania stanowią charakterystyczną cechę danego gatunku. Niektóre powtórzenia charakteryzują się taką samą zawartością nukleotydów GC jak pozostały genomowy DNA. Ten typ sekwencji to tzw. satelity kryptyczne, ponieważ nie oddzielają się od głównej frakcji genomowego DNA. Termin satelitarny DNA stosowany jest obecnie do określenia sekwencji tandemowych występujących z częstością 10^3-10^7. Zwykle długość motywu dochodzi do 300 pz, jednak zdarzają się dłuższe powtórzenia. Tautz [6] uzupełniając określenie sekwencji satelitarnych zakłada, że oznacza ono sekwencje powtórzone 10^3-10^7 w każdym *locus*, z jednym lub dwoma *loci* na chromosomie dla danego typu jednostki powtórzonej, przy czym długość sekwencji powtórzonej wynosi od 2 do kilku tysięcy pz i że są to sekwencje charakterystyczne dla heterochromatyny, a w szczególności dla regionów centromerowych.

DNA człowieka podczas wirowania w gradiencie siarczanu cezowego w obecności srebra (Ag-Cs_2SO_4) ulega rozdziałowi na 4 frakcje satelitarnego DNA, przy czym każda z nich posiada charakterystyczną gęstość: I klasa — 1.687 g/cm^3, II klasa — 1.693 g/cm^3, III klasa — 1,696 g/cm^3, IV klasa — 1.700 g/cm^3 (Ryc. 1). Te frakcje stanowią blisko 6% całkowitego DNA [7]. Badania z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* wykazały, że sekwencje satelitarnego DNA człowieka są zlokalizowane głównie w heterochromatynie regionów centromerowych [8]. Stosując krzyżową hybrydyzację z oczyszczonymi frakcjami satelitarnego DNA zaobserwowano, że w poszczególnych frakcjach występują homologiczne sekwencje tzw. rodziny wspólnych sekwencji [9]. Analiza sekwencji nukleotydów sklonowanych regionów frakcji III i IV satelitarnego DNA potwierdziła homologię tych frakcji. Celem dalszej molekularnej charakterystyki sekwencji satelitarnego DNA zastosowano analizę restrykcyjną z enzymami EcoRI i HaeIII. Te enzymy nie hydrolizują sekwencji satelitarnych klasy I, w klasie II po działaniu enzymu EcoRI uzyskuje się główny produkt o wielkości 1.77 tys. pz, oraz kilka mniejszych o wielkości 0.34 i 0.68 tys.

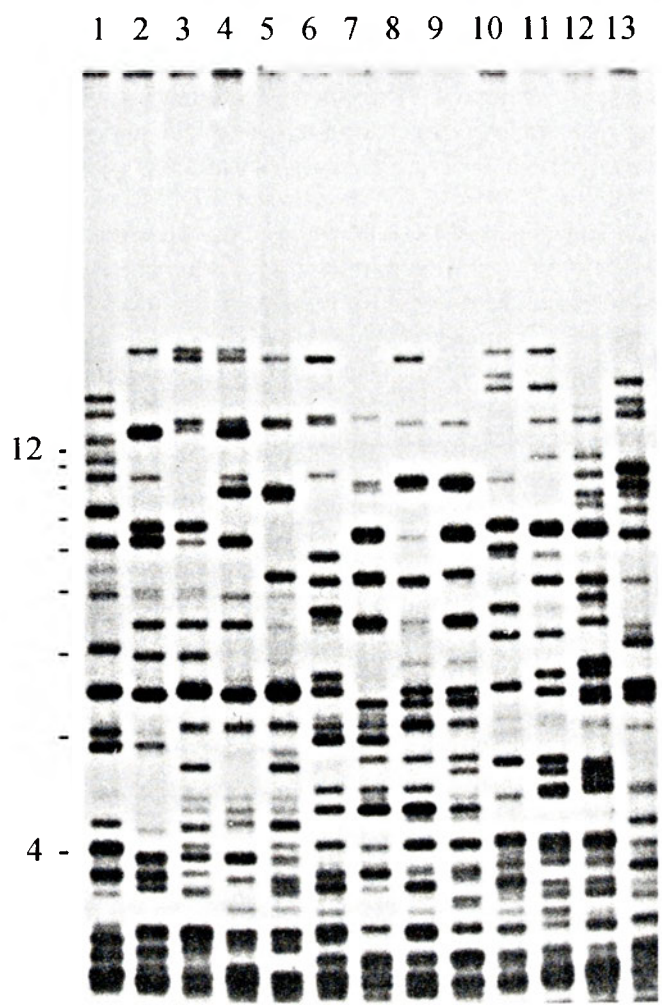


Ryc. 1. Satelitarny DNA człowieka
Genomowy DNA człowieka podczas wirowania w gradiencie siarczanu cezowego w obecności srebra (Ag-Cs_2SO_4) rozdziela się na 4 frakcje satelitarnego DNA. Każda frakcja (klasa satelitarna DNA) posiada charakterystyczną gęstość: klasa I, 1.687 g/cm^3; klasa II, 1.693 g/cm^3; klasa III, 1.696 g/cm^3; klasa IV, 1.700 g/cm^3.

http://rcin.org.pl

pz i dwa większe: 2.2 i 3.4 tys. pz. Ta klasa satelitarnego DNA nie ulega trawieniu enzymem HaeIII w odróżnieniu od satelitarnego DNA klasy III, który może być trawiony przez obydwa enzymy. Wykazano ponadto, że sekwencje klasy I i III są specyficzne dla długiego ramienia chromosomu Y i tworzą podrodziny złożone głównie z fragmentów o wielkości 3.4 tys. pz, powstające po trawieniu enzymem HaeIII sekwencji klasy III (*locus* DYZ1) oraz fragmentów 2.47 tys. pz uzyskane po trawieniu enzymem MspI sekwencji klasy I (12)-*locus* DYZ2 [10,11]. Obydwie klasy sekwencji stanowią prawie 60% chromosomu Y. Jedną z charakterystycznych cech sekwencji sateliternych jest występowanie konserwatywnych motywów. Stosując sekwencje powtórzone gryzoni jako sondy molekularne w hybrydyzacji z sekwencjami biblioteki powtórzonych sekwencji człowieka wykazano, że sekwencja (GGAAT)n jest wysoce konserwatywna, występuje u wszystkich *Eukaryota* i jest podstawowym rdzeniem sekwencji powtórzonych klasy I i II.

Do I grupy sekwencji powtórzonych należy poza satelitarnym DNA kilka rodzin sekwencji, przy czym jedna z nich — rodzina α satelitarnego DNA — dominuje w genomie człowieka i sekwencje tej rodziny występują w centromerach wszystkich chromosomów. Podstawowy motyw złożony jest z 171 pz i ułożony jest tandemowo w bloki o wielkości od 250 tys. do 4 mln pz. Sekwencje typu α człowieka są w 80% homologiczne z rodziną sekwencji α satelitarnych występujących u koczkodanów [12]. Innym przykładem rodziny sekwencji satelitarnego DNA są sekwencje β satelitarne, zwane również rodziną Sau3A, które występują z częstością 4×10^4 w genomie człowieka [13]. Podstawową jednostką β satelitarnego DNA jest motyw złożony z 68 nukleotydów, tworzący jednostki wyższego rzędu. W zależności od składu nukleotydów w motywie i od miejsca występowania wyróżnia się dwie klasy: pβ3 występującą w heterochromatynie chromosomu 9 i pβ4 występującą w chromosomach akrocentrycznych: 13,14,15,21,22. Rodzina β satelitarnego DNA nie wykazuje homologii z rodziną sekwencji α i innymi sekwencjami satelitarnymi Sekwencje β mogą prawdopodobnie tworzyć koliste struktury DNA długości 5 i 5.2 tys. pz, występujące poza chromosomami [14].



Ryc. 2. Analiza wielopunktowa (*multilocus*) minisatelitarnego DNA
Genomowy DNA 4 rodzin (matka, dziecko, ojciec) i kontrolny DNA poddano trawieniu enzymem HinfI, rozdzielano elektroforetycznie w 0.9% żelu agarozowym, przenoszono na filtr nitrocelulozowy wg S o u t h e r n a, a następnie hybrydyzowano z sondą molekularną (CAC)5 znakowaną ^{32}P na końcu 5'. Sonda (CAC)5 hybrydyzuje z ponad 70 *loci* w genomowym DNA, ale wartość diagnostyczną mają fragmenty powyżej 3.5 tys. pz. Ze względu na olbrzymi polimorfizm DNA analizę *multilocus* minisatelitarnego DNA nazwano techniką DNA fingerprinting (z analiz wykonywanych przez Laboratorium Genetyki Molekularnej). Tor 1, kontrolny DNA; tor 2-4, rodzina I; tor 5-7, rodzina II; 8-10, rodzina III; tor 11-13, rodzina IV. Analiza potwierdza pokrewieństwo dla rodziny I oraz wyklucza ojcostwo w rodzinie II, III i IV. Z lewej strony ryciny zaznaczono pozycje markera, wielkości w tys. pz (z analiz wykonywanych przez Zakład Genetyki Człowieka PAN).

III. Sekwencje minisatelitarne

Najbardziej polimorficzne sekwencje w genomie człowieka składają się z tandemowo powtarzających się sekwencji minisatelitarnych [15] i obecnie są szeroko stosowane w diagnostyce molekularnej. Termin sekwencje minisatelitarne został wprowadzony przez J e f f r e y s ' a [16] do oznaczania konserwatywnych sekwencji rdzeniowych, w wyizolowanym, polimorficznym fragmencie sekwencji powtórzonych. Jak się potem okazało wyizolowana przez J e f f r e y s ' a sekwencja GGGNNGTGGGG występuje w wielu opisanych dotychczas sekwencjach charakteryzujących się zmienną liczbą tandemowych powtórzeń i jest komplementarna do sekwencji „chi" u *E.coli*, pełniącej funkcję sygnalną w rekombinacji DNA. Sekwencje rdzeniowe odpowiedzialne są prawdopodobnie za tworzenie minisatelitów i utrzymanie różnorodności ilości powtarzanych jednostek w danym *locus* dzięki nierównemu *crossing-over* pomiędzy tandemowymi powtórzeniami. Polimorfizm sekwencji minisatelitarnych został wykryty równocześnie w wielu placówkach [17], jednak J e f f r e y s jako pierwszy wykazał, że sekwencje minisatelitarne należą do sekwencji wy-

http://rcin.org.pl

stępujących powszechnie w genomach, że są uorganizowane w powtarzające się jednostki [16] i jako pierwszy zastosował w praktyce badawczej minisatelity, wprowadzając do badań technikę DNA *fingerprinting* [18,19]. Jeffreys zastosował motywy opisanych minisatelitów w hybrydyzacji z DNA człowieka spodziewając się, że te sekwencje będą hydrydyzować z wieloma *loci* w genomie. Użyte sondy oznaczone numerami: 33.6 i 33.15 różniące się między sobą długością i niektórymi nukleotydami w sekwencji motywu hybrydyzują z 17 *loci* genomowego DNA. W przypadku sond Jeffreysa oraz wielu innych sond molekularnych wartość diagnostyczną mają fragmenty wielkości od 3.5-20 tys. pz, pozostałe znacznie mniejsze nie dają czytelnego wyniku (Ryc. 2).

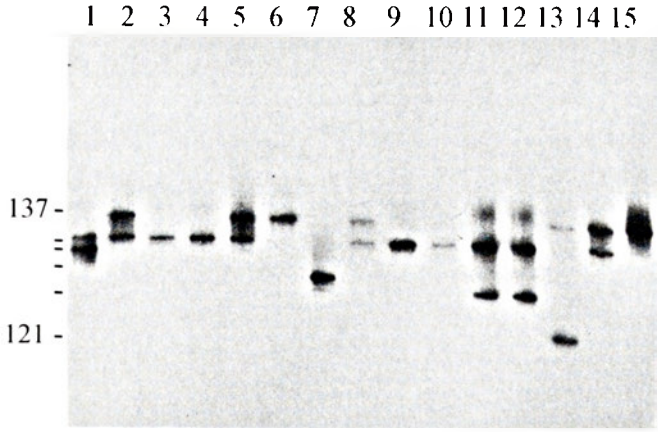
Nakamura i wsp. [15] opisali dalsze *loci* sekwencji minisatelitarnych, wykazali polimorfizm powtarzających się jednostek, jak również zaproponowali dla nich nazwę VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*) — zmienna liczba tandemowych powtórzeń. Sekwencje minisatelitarne różnią się od sekwencji satelitarnych częstością występowania, długością powtórzonego motywu, są bardziej rozproszone w genomie chociaż wykazują tendencje do grupowania się w regionach telomerowych, szczególnie w chromosomach człowieka [20]. Charakterystyczną cechą sekwencji minisatelitarnych wg Tautza [5] jest powtarzanie się określonych motywów od 2 do kilkuset razy w danym *locus*. Prawdopodobnie w genomie człowieka występuje kilka tysięcy takich *loci*, przy czym różnią się one motywami. Każdy element powtarzający się złożony jest z 9 do 100 pz. Sklonowano już wiele sekwencji minisatelitarnych specyficznych dla danego *locus* lecz nadal trwają poszukiwania nowych. Stosuje się w tym celu sondy molekularne, wykrywające zmienne powtórzenia i przeszukuje nimi biblioteki genowego DNA [21], hybrydyzuje się genomowy DNA z sondami oligonukleotydowymi o sekwencji ustalonej dla wcześniej opisanych sekwencji VNTR [15,22] lub wklonowuje w bakteriofaga lambda fragmenty wyizolowane z mieszaniny fragmentów powtórzonych, powstającej po trawieniu genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi z grupy często tnących i hybrydyzuje z rdzeniami sekwencji powtórzonych. Jako pierwsze opisane tego typu sekwencje minisatelitarne należy wymienić koniec 5′ genu insuliny [23], genu białka mielinowego [24], region JH ciężkiego łańcucha immunoglobuliny [25], koniec 3′ genu CH ras [26], genu α-globiny [27], gen kolagenu typu II [28] i gen apolipoproteiny B [29]. W najbardziej polimorficznym *locus* u człowieka, którego allele wykrywane są sondą MS1, występują allele o wielkości rzędu 1-23 tys. pz i prawie 99% osobników w populacji to heterozygoty. Jednostka powtarzająca złożona jest z 9 pz i dotychczas opisano 2400 alleli dla tej sondy [30-32]. Jeżeli jako sondy molekularne stosuje się tandemowe powtórzenia konserwatywnego motywu sekwencji minisatelitarnych, wówczas w analizie Southerna otrzymuje się dla każdego osobnika jednocześnie wiele różnych fragmentów DNA; powstaje specyficzny dla osobnika *fingerprint*. Do takich sond należą m.in. wspomniane wcześniej sondy 33.6 i 33.15.

IV. Sekwencje mikrosatelitarne

W genomie *Eukaryota* występują powtórzenia jedno-, dwu-, trzy- i czteronukleotydowe. Litt i Luty [33] zaproponowali aby te sekwencje, w odróżnieniu od minisatelitów nazwać mikrosatelitami. W 1991 r. Edwards i wsp. [34] wprowadzili dodatkowo określenie STR (ang. *short tandem repeat*) — krótkie powtórzenia tandemowe. Skrót STR jest również często stosowany do określenia syntetycznych powtórzeń tandemowych wykorzystywanych w technice DNA *fingerprinting* [35], dlatego w ostatnim okresie zalecanym terminem są sekwencje mikrosatelitarne. Ponad 90% przebadanych dotychczas sekwencji mikrosatelitarnych od mononukleotydów do tetranukleotydów wykazywało polimorfizm. W genomie człowieka najczęściej występuje 5 grup powtórzeń przy czym A > AC > AAAB > AAB > AG (B oznacza cytozynę, guaninę lub tymidynę). Te 5 grup stanowi 76% wszystkich sekwencji mikrosatelitarnych. Około 12% tych sekwencji stanowią tandemy długości równej lub większej niż 40 nukleotydów. Prawie 80% sekwencji z grupy A, AAB, AAAB, 50% sekwencji typu AT oraz inne sekwencje mikrosatelitarne, charakteryzujące się niską częstością występowania w genomie człowieka, znajduje się w sąsiedztwie rozproszonych powtórzeń rodziny Alu. Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych znalazł zastosowanie w diagnostyce molekularnej chorób człowieka, głównie w tzw. diagnostyce pośredniej, w której nie identyfikuje się molekularnego podłoża choroby. Do prześledzenia dziedziczenia zmutowanego genu wykorzystać można polimorfizm markera genetycznego, który wykazuje sekwencja mikrosatelitarna. Dotychczas w diagnostyce pośredniej najbardziej użytecznymi były sekwencje (CA)n/(GT)n. Inne mikrosatelity, jak (A)n/(T)n i (AAAT)n/(TTTA)n, wykazują również polimorfizm i coraz częściej stosowane są w badaniach [36-38]. Obecnie w diagnostyce molekularnej najbardziej przydatne są sekwencje (NNN)n i (NNNN)n, które w porównaniu z sekwencjami (CA)n/(GT)n wykazują dwie istotne zalety — łatwiejszy rozdział elektroforetyczny i identyfikację poszczególnych alleli oraz mniejsze prawdopodobieństwo powstania artefaktów wywołanych błędami polimerazy. Przydatność tych sekwencji ograniczona jest jednak ich mniejszą częstością występowania w genomie.

Większość sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych w sekwencjach Alu występuje w regionie 3′ tych sekwencji w pozycji, w której zazwyczaj występują sekwencje poli(A). Trzy grupy sekwencji mikrosatelitarnych (dwie: (A)n/(T)n i jedna [(AC)n/(TG)n, (AG)n/(TC)n]) znaleziono wewnątrz sekwencji rodziny

http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Analiza mikropowtórzeń (CA)n/(GT)n
DNA 14 chorych na dystrofię mięśniową Duchenne'a (tory 1-14) i kontrolny DNA (tor 15) poddano amplifikacji stosując startery flankujące region genu DMD bogaty w mikropowtórzenia. Jeden ze starterów był znakowany fosforem ^{32}P. Produkty reakcji frakcjonowano w poliakryloamidowych (8%) żelach sekwencyjnych, w warunkach denaturujących. Z lewej strony ryciny zaznaczono wielkość poszczególnych alleli zawierających mikropowtórzenia: 137, 133, 132, 131, 129, 121 pz. (z analiz wykonywanych przez Zakład Genetyki Człowieka PAN).

Alu w miejscu przeznaczonym dla krótkich sekwencji typu (A)n/(T)n. Dotychczas nie stwierdzono sekwencji mikrosatelitarnych w regionie 5' elementów Alu [39].

Najczęściej w genomie człowieka występuje powtórzenie dwunukleotydu (CA)n/(GT)n potocznie określane powtórzeniem CA (Ryc. 3). W genomie człowieka występuje około 50-100 tys. sekwencji powtórzonych CA i pojawiają się one średnio co 30 kpz w euchromatynie [40]. W 1989 r. trzy grupy badawcze doniosły równocześnie o różnorodności sekwencji mikrosatelitarnych wykrytej w reakcji PCR [33,36,41]. Powtórzenia CA mogą być wyszukane w znanych sekwencjach genomu dzięki zastosowaniu programów komputerowych lub dzięki przeszukaniu bibliotek krótkich sekwencji sondami poli(dC:dA)/poli(dG:dT). Weissenbach i wsp. [42] obierając drugą strategię zidentyfikowali 2995 mikrosatelitów w genomie człowieka z czego 84% (2506) analizować można było poprzez PCR. Jak się później okazało 93% zamplifikowanych markerów wykazywało polimorfizm.

Druga grupa sekwencji mikrosatelitarnych obejmuje powtórzenia trzy- lub cztero nukleotydowe. Rodziny powtarzających się tetranukleotydów GATA i GACA zostały zidentyfikowane i wyizolowane z satelitarnego DNA węża [43]. Okazało się, że tego typu powtórzenia występują u wszystkich *Eukaryota* i że są wysoce polimorficzne. Zaletą analizy powtórzeń tetranukleotydów jest to, że nie muszą być rozdzielane na dużych żelach sekwencyjnych, co ma miejsce w przypadku powtórzeń CA. Trzy- i czteronukleotydowe powtórzenia występują co 300-500 tys. pz w chromosomie człowieka i są rozmieszczone równomiernie w całym genomie (około 10 000 *loci*) [34]. W diagnostyce molekularnej, a szczególnie w medycynie sądowej, te sekwencje bardzo często poddaje się analizie, ponieważ charakteryzują się krótkimi i polimorficznymi allelami, co jest szczególnie ważne przy pracy z częściowo zdegradowanym DNA.

V. Geny tandemowe

Dotychczas opisane klasy sekwencji powtórzonych są prawdopodobnie sekwencjami DNA nie pełniącymi żadnych funkcji, tzn. nie ulegającymi ekspresji. Pewnym odstępstwem są sekwencje tandemowe zwane również genami tandemowymi, które kodują określone transkrypty. Do tych sekwencji należą geny kodujące rybosomalne RNA i białka histonowe. Prawdopodobnie charakteryzują się one również polimorfizmem alleli, tak charakterystycznym dla sekwencji powtórzonych [44]. Najlepiej poznanymi genami tandemowymi są geny 18S, 5.8S i 28S rRNA. DNA tych genów (rDNA) uorganizowany jest w sposób *multi*cistronowy i u człowieka występuje zbliżona liczba genów (ok. 160) dla poszczególnych rRNA. Geny rozmieszczone są w tandemach w kilku miejscach genomu i wykazują pełną homologię.

Tabela 1
Charakterystyka powtórzeń DNA

Charakterystyka	Satelity	Minisatelity	Mikrosatelity
Częstość powtórzeń	10^3-10^7	2-400	5-100
Liczba *loci*	1-2/chromosom	4000	10^4-10^5
Jednostka powtórzenia	200-5000 pz	7-100 pz	1-6 pz
Lokalizacja	Heterochromatyna Centromery	Rozproszone Często telomery	Równomierne Często transkrybowane
Wykrywanie	Ultrawirowanie w gradiencie gęstości CsCl lub Ag-Cs_2SO_4	Hybrydyzacja (1-20 tys. pz) PCR (100-1000 pz)	PCR (100-500 pz)
Zastosowanie	Identyfikacja chromosomów	Diagnostyka molekularna	Mapowanie genów Diagnostyka molekularna
Charakterystyczne motywy powtórzeń	Duża różnorodność	Duża różnorodność	A, AC, AAAT, AG, AT, AAAG
Występowanie	Człowiek, zwierzęta, rośliny, grzyby, bakterie	Człowiek, zwierzęta, rośliny, bakterie	Człowiek, zwierzęta

http://rcin.org.pl

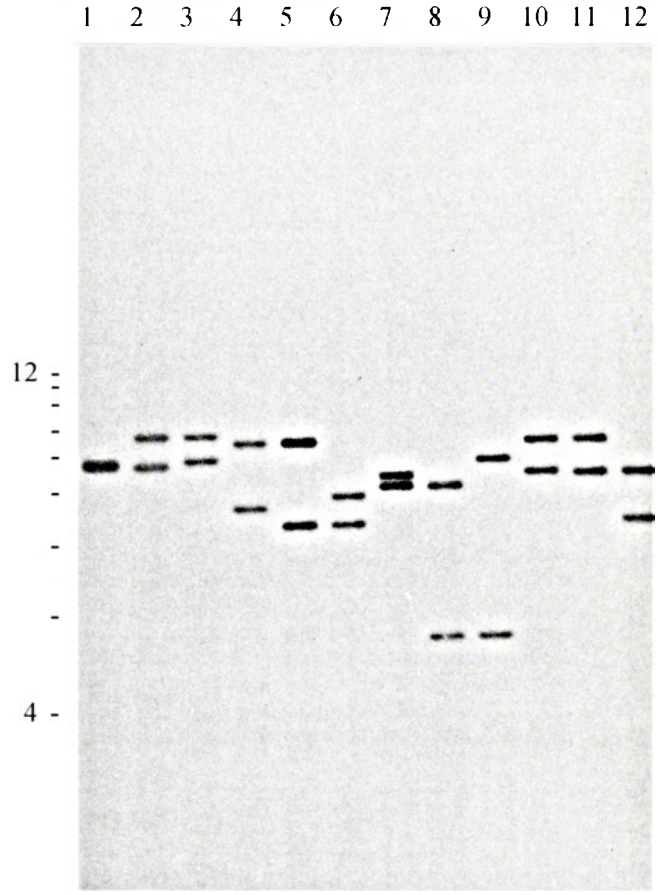
VI. Zastosowanie analizy sekwencji powtórzonych

Pośrednia analiza genetyczna, która oparta jest o badanie naturalnego polimorfizmu genomowego DNA oraz badanie markerów genetycznych stanowi podstawową technikę w mapowaniu genomu. Do mapowania genów niezbędna jest jednak duża kolekcja markerów genetyczynch. Pomimo opisania wielu markerów, jedynie nieliczne znajdują zastosowanie w mapowaniu genów, ponieważ najczęściej charakteryzują się one występowaniem tylko dwóch alleli i dlatego są nieinformatywne w analizie sprzężeń. Dzięki analizie sprzężeń zlokalizowano ostatnio geny odpowiedzialne za ciężkie w przebiegu choroby genetyczne, takie jak pląsawica Huntingtona [45], dystrofia mięśniowa Duchenne'a [46], kłębkowe zapalenie nerek [47] czy mukowiscydoza [48-50]. W rodzinie, w której występuje choroba dziedziczna obserwuje się sprzężenie dziedziczenia choroby z określonym regionem chromosomowym — markerem genetycznym. Tak więc geny warunkujące chorobę mogą być zlokalizowane poprzez markery genetyczne, jednak dokładna lokalizacja genu jest możliwa dopiero po zanalizowaniu wielu rodzin z ryzykiem wystąpienia choroby genetycznej.

Sekwencje powtórzone, a szczególnie sekwencje minisatelitarne i mikrosatelitarne wykorzystuje się w analizie nosicielstwa zmutowanego allelu w rodzinach z ryzykiem wystąpienia choroby. Najczęściej wykonuje się reakcję PCR, a następnie produkty reakcji frakcjonuje w żelach agarozowych. W przypadku wykorzystania sekwencji mikrosatelitarnych jako markerów genetycznych, różniących się wielkością między dwoma allelami tylko o 2-4 nukleotydy bardzo często wykonuje się amplifikację techniką PCR ze starterami znakowanymi radioaktywnie, a następnie frakcjonuje produkty w dużych żelach sekwencyjnych i poddaje autoradiografii.

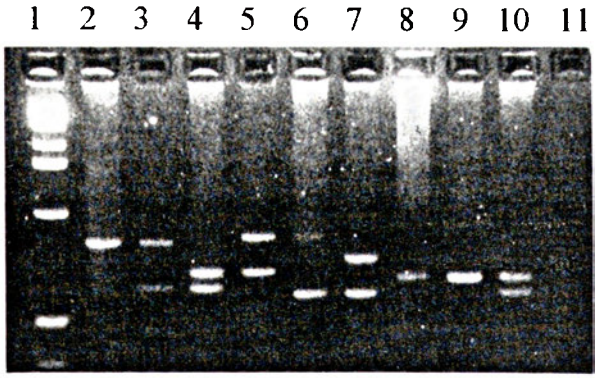
Przykładem zastosowania sekwencji powtórzonych, poza genetyką medyczną człowieka, jest kryminalistyka i medycyna sądowa. Te dziedziny już w połowie lat 80-tych skorzystały z osiągnięć genetyki molekularnej i stosują je w badaniach rutynowych. Wykorzystanie w praktyce sekwencji powtórzonych w kryminalistyce i medycynie sądowej, określono terminem *fingerprinting*. Badania DNA *fingerprinting* można zasadniczo podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowi analiza pojedynczego *locus* (ang. *single locus system*, SLS), natomiast druga grupa obejmuje jednoczesną analizę wielu *loci* (ang. *multilocus system*, MLS). Wymienione grupy badań można określić jako analizę wielopunktową lub jednopunktową (Ryc. 2 i Ryc. 4). Wnioski co do identyfikacji lub pokrewieństwa badanych osób w sprawach o ustalenie ojcostwa formułowane są na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u tych osób. Wartość analizy jednopunktowej zależy więc od homogenności populacji. W przypadku więc izolowanych grup etnicznych może być inna niż w przypadku większej populacji. Analizę pojedynczego *locus* można wykonywać stosując transfer i hybrydyzację według S o u t h e r n a lub reakcję PCR. W reakcji PCR wykorzystuje się sekwencje minisatelitarne, w których jednostka powtarzająca złożona jest z 15-20 nukleotydów, a wielkość amplifikowanego produktu nie przekracza 2 tys. pz. Fragmenty sekwencji powtórzonych od 2-20 kpz można analizować wyłącznie stosując transfer i hybrydyzację. Najczęściej stosowanymi markerami w reakcji PCR na cele sądownictwa są D1S80, D17S30, DXS52, ApoB (Ryc.5).

Alternatywnym podejściem badawczym jest analiza *multilocus* — analiza wielopunktowa. Jednym z najlepiej udokumentowanych badań z tego rodzaju jest



Ryc. 4. Analiza jednomiejscowa (single *locus*) minisatelitarnego DNA
Genomowy DNA 4 rodzin (matka, dziecko, ojciec) poddano trawieniu enzymem Hinf I, rozdzielono w 0.9% żelu agarozowym, wykonano transfer Southerna, a następnie hybrydyzowano z sondą molekularną MS31 znakowaną radioaktywnym fosforem ^{32}P. Wielkość jednostki powtórzonej (motywu) wynosi 20 pz a wielkość fragmentów restrykcyjnych waha się od 3 do 14 kpz. Tor 1-3, rodzina I; tor 4-6, rodzina II; 7-9, rodzina III; tor 10-12, rodzina IV. Tak jak w przypadku analizy *multilocus*, fragmenty restrykcyjne dziedziczone są zgodnie z prawami Mendla. Zaobserwować można duży polimorfizm poszczególnych alleli (w populacji występuje ponad 100 alleli) i heterozygotyczność (powyżej 99%) (z analiz wykonywanych przez Laboratorium Genetyki Molekularnej). Z lewej strony ryciny zaznaczono pozycje markera wielkości w tys. pz. (z analiz wykonywanych przez Zakład Genetyki Człowieka PAN).

http://rcin.org.pl



Ryc. 5. Minisatelitarny DNA *locus* ApoB wykrywany techniką PCR.
Minisatelitarny DNA można analizować stosując reakcję PCR ze starterami flankującymi region polimorficzny, jeśli wielkość produktów PCR mieści się w granicach 200-1000 pz i nie występują zbyt duże różnice wielkości alleli. Na rycinie przedstawiono rozdział elektroforetyczny produktów PCR *locus* ApoB. Wielkość jednostki powtarzającej w tym *locus* wynosi 32 pz i u człowieka występuje 13 alleli (z analiz wykonywanych przez Laboratorium Genetyki Molekularnej). Tor 1, marker wielkości (KBL), tor 2-4, rodzina I; tor 5-7, rodzina II; tor 8-10, rodzina III; tor 11, kontrola negatywna (z analiz wykonanych przez Zakład Genetyki Człowieka PAN).

jednoczesne wykrywanie wielu fragmentów DNA przy użyciu sondy molekularnej MZ 1.3 lub (CAC)5 [51]. Wysokiej informatywności sondy towarzyszy skomplikowana analiza wyniku, czyli ustalenie dziedziczenia dużej liczby rozdzielonych elektroforetycznie fragmentów DNA, przy czym wynik jest swoisty dla badanej osoby (z wyjątkiem bliźniąt monozygotycznych, dla których układ prążków jest jednakowy).

Jednoczesna analiza DNA człowieka w około 70 regionach zawiera tyle informacji, że jej ocena klasycznym modelem nie jest obecnie możliwa. Rozwinięto jednak nowe metody analizy statystycznej, pozwalające sprowadzić wynik do wartości liczbowej. Założenia obliczeń statystycznych są nadal dyskutowane i krytyka dotyczy przede wszystkim teoretycznych podstaw obliczeń. Na uwagę zasługują wyniki analizy *multilocus* 7 laboratoriów, z których wynika, że w badaniach nad dochodzeniem spornego ojcostwa występują dwie nie nakładające się grupy obejmujące potwierdzenia i wykluczenia ojcostwa [52, 53].

W badaniach medycyny sądowej analiza *multilocus* ogranicza się wyłącznie do badania materiału, z którego wyizolowano wysokocząsteczkowy DNA. Tylko wtedy możliwe jest przeprowadzenie badań techniką transferu wg Southerna. Najczęściej materiał do badań jest zdegradowany, stąd analizowane są stosunkowo krótkie (kilkaset nukleotydów) odcinki DNA, a techniką z wyboru jest PCR.

VII. Perspektywy dalszych badań sekwencji powtórzonych

Analiza powtórzeń DNA znalazła już praktyczne zastosowanie w genetyce ogólnej, medycynie i kryminalistyce. Nadal obserwuje się olbrzymie zainteresowanie powtórzeniami DNA, dlatego badania dalej się rozwijają, a zainteresowanie nimi wzrasta. Tradycyjny materiał do badań stanowią krew obwodowa, nasienie, wymazy cytologiczne lub fragmenty tkanki pobranej metodą biopsji cienkoigłowej. Obecnie może być również badany DNA śliny pozostawionej np. na kopercie podczas zaklejania lub na ustniku papierosa. Badania DNA mogą więc być wykorzystane w badaniach śladów biologicznych w kryminalistyce. Bardzo podobne, aczkolwiek dające zupełnie inne informacje, są badania śladów archeologicznych np. pozostałości szkieletu. Na przeprowadzenie jednej analizy genetycznej DNA metodą Southerna potrzeba około 5 μg DNA. Obecnie w wielu przypadkach analiza ogranicza się do reakcji PCR, w której stosuje się tylko 10 ng DNA, co odpowiada 1700 diploidalnym komórkom, a możliwa jest również analiza pojedynczych komórek.

Bardzo ważnym problemem w genetyce jest poszukiwanie nowych markerów genetycznych. W niniejszej pracy przedstawiono klasy sekwencji powtórzonych, z których część znalazła zastosowanie jako markery genetyczne. Nadal przeszukuje się biblioteki DNA w celu utworzenia biblioteki markerów idealnych, które charakteryzowałyby się następującymi cechami: a) wielkość alleli od 100-500 pz, takie allele mogą być amplifikowane w reakcji PCR; b) allele powinny różnić się między sobą o minimum dwa nukleotydy — większa różnica długości między allelami umożliwia lepsze frakcjonowanie otrzymanych w reakcji fragmentów; c) w populacji powinna występować duża liczba alleli co warunkuje możliwości zróżnicowania osobników; d) w obrębie *locus* danego markera częstość mutacji powinna być mniejsza niż 10^{-2}-10^{-3}. Dotychczas nie znaleziono jednak takiego markera i być może takie markery w genomie człowieka nie występują. Należy oczekiwać, że w przyszłości powstanie biblioteka markerów genetycznych, dostępna dla wszystkich, zajmujących się diagnostyką molekularną na cele medyczne i dla sądownictwa. Posługując się takimi markerami można będzie ocenić np. podatność na choroby genetyczne i uzyskać na podstawie znalezionych śladów informacje o fenotypie osobnika np. ustalić takie cechy jak płeć (badania już są wykonywane), pochodzenie etniczne i cechy takie jak kolor oczu i włosów.

W ostatnim czasie istotnym zmianom uległ również system detekcji sekwencji powtórzonych. Detekcja z użyciem radioizotopów ze względu na bezpieczeństwo pracy zastępowana jest detekcją sondami nieradioaktywnymi (fluorescencja, chemiluminescencja, immunodetekcja). Automatyzacji ulegają metody frakcjonowania fragmentów DNA, przy czym największe nadzieje pokłada się w automatycznej elektroforezie w żelach poliakryloamidowych z laserowymi czujnikami fluorescencji i mikrokapilarnej analizie elektroforetycznej.

Artykuł otrzymano 2 listopada 1994 r.
Zaakceptowano do druku 12 listopada 1994 r.

http://rcin.org.pl

Piśmiennictwo

1. Vogt P (1990) *Hum Genet* **83:** 301-336
2. Jelinek WR, Schmid CW (1982) *Ann Rev Biochem* **51:** 813-844
3. Hardman N (1986) *Biochem J* **234:** 1-11
4. Singer MF (1982) *Cell* **28:** 433-434
5. Britten RJ, Kohne DE (1968) *Repeated sequences in DNA. Science* **161:** 529-540
6. Tautz D (1993) W: DNA Fingerprinting: State of Science, Birhauser Verlag Basel/Switzerland
7. Corneo G, Ginelli E, Zardi L (1973) W: Pfeiffer RA (ed) Modern aspects of cytogenetics: constitutive heterochromatin in man. Schattauer, Stuttgart, pp 29-37
8. Gosden JR, Mitchell AR, Buckland RA, Clayton RP, Evans HJ (1975) *Exp Cell Res* **92:** 32-39
9. Mitchel AR, Beauchamp RS, Bostock CJ (1979) *J Mol Biol* **135:** 127-149
10. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, (1979) *Biochemistry* **18:** 3343-3353
11. Miller OJ, Drayna D, Goodfellow P (1984) *Cytogenet Cell Genet* **37:** 176-205
12. Cooke HJ, Schmidtke J, Gosden JR (1982) *Chromosoma* **87:** 491-502
13. Meneveri R, Agresti A, Della Valle G, Talarico D, Siccardi AG, Ginelli E (1985) *J Mol Biol* **186:** 483-489
14. Hollis M, Hindley J (1986) *Gene* **46:** 153-160
15. Nakamura Y, Julier C, Wolff R, Holm R, O'Connell P, Leppert M, White R (1987) *Nucleic Acids Res* **15:** 2537-2547
16. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SW (1985a) *Nature* (Lond) **314:** 67-73
17. Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ (1982) *Nature* (Lond) **295:** 31-35
18. Jeffreys AJ, Wilson V, Thien SW (1985b) *Nature* (Lond) **316:** 76-79
19. Jeffreys AJ, Neumann R, Wilson V (1990) *Cell* **60:** 473-485
20. Royle NJ, Clarkson RE, Wong Z, Jeffreys AJ (1988) *Genomics:* **3:** 352-360
21. Knowlton RG, Brown, Braman JC, Barker D, Schumm JW, Murray C, Takvorian T, Ritz J Donnis-Keller H (1986) *Blood* **68:** 378-385
22. Nakamura Y, Carlson M, Krapcho K, Kanamori M, White R (1988) *Am J Hum Genet* **43:** 854-859
23. Bell GI, Karan JH, Rutter WJ (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78:** 5799-5763
24. Boylan KBM, Takahashi N, Diamond M, Hood E, Prusiner SB (1987) *Am J Hum Genet* **40:** 387-400
25. Silca AJ, Johnson JP, White R (1987) *Nucl Acid Res* **15:** 3845-3857
26. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV (1983) *Nature* (Lond) **302:** 33-37
27. Higgs DR, Wainscoat JS, Flint J, Hill AVS, Thein SL, Nichols RD, Teal H, Ayyub H, Peto TEA, Falusi AG, Jarman AP, Clegg JB, Weatherall D (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83:** 5165-5169
28. Stoker NG, Cheah KSE, Griffin JR, Pope FM, Solomon E (1985) *Nucleic Acid Res* **13:** 4613-4622
29. Knott TJ, Wallis SC, Pease J, Powell LM, Scott J (1986) *Nucl Acid Res* **14:** 9215-9216
30. Wong Z, Wilson V, Patel I, Jeffreys AJ (1987) *Annals of Human Genetics* **51:** 269-288
31. Smith JC, Newton CR, Alves A, Anwar R, Jenner D, Markham AF, (1990) *J For Sci Soc* **30:** 19-32
32. Jeffreys AJ, MacLeod A, Tamaki K, Neil DL, Monckton DG (1991). *Nature* (Lond) **354:** 204-209
33. Litt M, Luty JA (1989) *AM J Hum Genet* **44:** 397-401
34. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991) *Am J Hum Genet* **49:** 746-756
35. Vergnaud G, Mariat D, Zoroastro M, Lauthier V (1991) *Electrophoresis* **12;** 134-140
36. Tautz D (1989) *Nucl Acid Res* **17:** 6463-6471
37. Economou EP, Bergen AW, Warren AL, Antonarakis SE (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87:** 2951-2954
38. Zuliani G, Hobbs HH (1990) *Am J Hum Genet* **46:** 963-969
39. Beckman JS, Weber JL (1992) *Genomics* **12:** 627-631
40. Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moysis RK (1991) *Genomics* **10:** 807-815
41. Weber JL, May PE (1989) *Am J Hum Genet* **44:** 388-396
42. Weissenbach J, Gyaypay G, Dib C, Vignal A, Morisette J, Milasseau P, Vaysseiz G, Lathrop M (1992) *Nature* (Lond) **359:** 794-801
43. Epplen JT, McCarrey JR, Sutou S, Ohno S (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79:** 3798-3802
44. Schlotterer C, Tautz D (1992) *Nucleic Acids Res* **20:** 211-215
45. Gusell JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE (1983) *Nature* (Lond) **306:** 234-238
46. Murray JM, Davies KE, Harper PS, Meredith L, Mueller CR, Williamson R (1982) *Nature* (Lond) **300:** 69
47. Reeders ST, Breuning MH, Davies KE, Nicholls RD, Jarmann AP, Higgs DR, Pearson PL, Weatherall DJ (1985) *Nature* (Lond) **317:** 542
48. Tsui LC, Buchwald M, Backer D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plarsic N, et al (1985) *Science* **230:** 1054
49. White R, Woodward S, Leppert M, O'Connel P, Hoff M, Herbst J, Lalouel JM, Dean M, Vande-Woude G (1985) *Nature* (Lond) **318:** 382
50. Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H, Lliamson R (1985) *Nature* (Lond) **318:** 384
51. Pena SDJ, Chakraborty R (1994) *Science* **19:** 204-209
52. Krawczak M, Bohm I, Nurnberg P, Hampe J, Hundrieser J, Poche H, Peters Ch, Słomski R, Kwiatkowska J, Nagy M, Popper A, Epplen JT, Schmidtke J (1993) *Forenic Science International* **59:** 101-117
53. Bohm I, Krawczak M, Nurnberg P, Hampe J, Hundrieser J, Poche H, Peters C, Słomski R, Kwiatkowska J, Nagy M, Popperl A, Epplen JT, Schmidtke J (1993) W: DNA Fingerprinting: State of the Science Birkhauser Verlag Basel/Switzerland: 256-260

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

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

http://rcin.org.pl

Czterofosforan guanozyny, ppGpp, jako czynnik ścisłej kontroli replikacji DNA

Guanosine tetraphosphate, ppGpp, as a factor of the stringent control of DNA replication

GRZEGORZ WĘGRZYN*

Spis reści:

I. Wstęp
II. Odpowiedź ścisła i rozluźniona
III. Replikacja DNA w warunkach kontroli ścisłej i rozluźnionej
III-1. Kontrola ścisła replikacji DNA w komórkach *Bacillus subtilis*
III-2. Kontrola ścisła replikacji DNA w komórkach *Escherichia coli*
III-2.1. *oriC*
III-2.2. Plazmidy ColE1
III-2.3. Plazmidy λ
III-2.4. Plazmid pSC101
III-2.5. Plazmid RK2
IV. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. Stringent and relaxed response
III. DNA replication in stringent and relaxed conditions
III-1. Stringen control of DNA replication in *Bacillus subtilis*
III-2. Stringent control of DNA replication in *Escherichia coli*
III-2.1. *oriC*
III-2.2. ColE1 plasmids
III-2.3. λ plasmids
III-2.4. Plasmid pSC101
III-2.5. Plasmid RK2
IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: pppGpp — guanozyno 5′-trójfosforan-3′-dwufosforan; ppGpp — guanozyno 5′-dwufosforan-3′-dwufosforan

I. Wstęp

Kontrola ścisła metabolizmu jest odpowiedzią bakterii na warunki głodu aminokwasowego. Efektorem tej odpowiedzi jest specyficzny nukleotyd, guanozyno-5′-dwufosforan-3′-dwufosforan (zwany też czterofosforanem guanozyny lub w skrócie ppGpp). Oddziaływuje on bezpośrednio z polimerazą RNA, a zmiany transkrypcji są pierwotnymi efektami odpowiedzi ścisłej. Głodzenie aminokwasowe zmienia globalnie metabolizm komórki. Mimo tego badania nad kontrolą ścisłą replikacji DNA, jednego z najważniejszych procesów zachodzących w żywych komórkach, były do niedawna bardzo nieliczne, a ich wyniki niejednoznaczne. Dopiero ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w zrozumieniu mechanizmów kontrolujących replikację DNA w głodzonych komórkach bakteryjnych. Najliczniejsze badania były przeprowadzone na szczepach najlepiej obecnie poznanego organizmu komórkowego — pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*). Poznanie mechanizmów kontroli ścisłej replikacji przykładowych replikonów pozwoliło wyciągnąć także ogólne wnioski, ważne dla rozumienia kontroli inicjacji replikacji DNA nie tylko w głodzonych komórkach, lecz także w komórkach hodowanych w normalnych warunkach.

II. Odpowiedź ścisła i rozluźniona

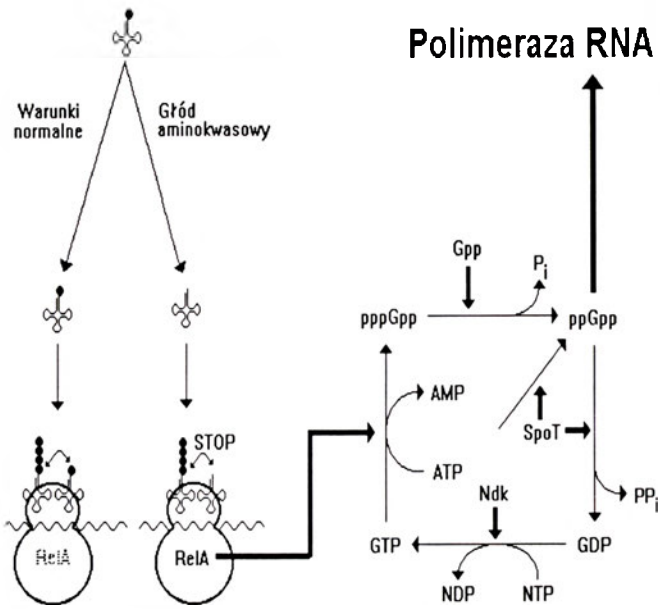
Odpowiedzią komórek bakteryjnych na warunki głodu aminokwasowego jest tak zwana kontrola ścisła metabolizmu. Przejawia się ona szeregiem zmian fizjologicznych i biochemicznych prowadzących do zahamowania większości procesów komórkowych i aktywacji nielicznych z nich [1]. Na poziomie molekularnym pierwszym efektem braku aminokwasów w komórce jest produkcja specyficznego nukleotydu, zwanego w skrócie ppGpp. Nukleotyd ten jest pośrednim produktem reakcji katalizowanej przez syntetazę I (p)ppGpp (ATP:GTP 3′-pirofosfotransferazę), produkt genu *relA* [2, 3]. Enzym ten jest związany z rybosomem [4, 5] i aktywowany w momencie przyłączenia się nienaładowanej aminokwasem cząsteczki tRNA w miejsce aminoacylowe (A) na rybosomie podczas translacji [6, 7]. Reakcja przeprowadzona przez syntetazę I (p)ppGpp prowadzi do syntezy guanozyno 5′-trójfosforanu-3′dwufosforanu (pppGpp) [7]. Ponieważ, jak się wydaje, pppGpp jest toksyczny w wyższych stężeniach w komórce [8], zostaje on szybko przekształcony w ppGpp przez produkt genu

* Dr, Pracownia Genetyki Molekularnej, Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

http://rcin.org.pl

gpp [9, 10]. Guanozyno 5′-dwufosforan-3′-dwufosforan (ppGpp) może być także syntetyzowany w komórkach *Escherichia coli* na drodze niezależnej od produktu genu *relA*. Ta droga syntezy ppGpp wymaga jednak aktywności genu *spoT* [11, 12]. Ponieważ SpoT jest jednocześnie białkiem odpowiedzialnym za szybką degradację ppGpp w komórce [13-17] wydaje się, że jest to enzym spełniający dwie przeciwstawne funkcje: degradację ppGpp (ppGpp-aza) oraz jego syntezę (syntetaza II ppGpp). Mutanty *relA*, mające nieaktywną syntetazę I ppGpp, zawierają w normalnych warunkach wzrostu poziom ppGpp zbliżony do tego jaki jest obserwowany w komórkach dzikiego typu [11]. Jednakże w głodzonych mutantach *relA*, które nie mają aktywnej syntetazy I ppGpp, syntetaza II ppGpp jest nieaktywna [12, 18, 19]. W związku z tym brak lub niedobór aminokwasów w mutantach *relA* prowadzi do szybkiego spadku stężenia ppGpp w komórkach. Taka reakcja komórek bakteryjnych zwana jest odpowiedzią rozluźnioną. Schemat powstawania i degradacji ppGpp w komórkach *E. coli* przedstawiony jest na rycinie 1.

Czterofosforan guanozyny oddziaływuje bezpośrednio z podjednostką β polimerazy RNA [20-22], zmieniając jej właściwości katalityczne. Skutkiem tego jest zahamowanie transkrypcji rozpoczynającej się z wielu promotorów i aktywacja transkrypcji nielicznych operonów. Szczególnie wrażliwe na ppGpp są promotory warunkujące syntezę stabilnych RNA: rRNA i tRNA [23]. Wprawdzie wiadomo, że zmiany polimerazy RNA wywołane przez jej oddziaływanie z ppGpp są odpowiedzialne za obserwowane różnice w przebiegu transkrypcji u bakterii głodzonych i niegłodzonych, lecz bezpośrednia przyczyna tych różnic jest w dalszym ciągu sprawą sporną. Zahamowanie transkrypcji może wynikać z wrażliwości różnych promotorów na ppGpp i niezdolności polimerazy RNA związanej z tym nukleotydem do inicjacji transkrypcji z tych promotorów [24-27], albo też z inaktywacji polimerazy RNA przez ppGpp spowodowanej przedwczesną terminacją transkrypcji w przypadku zmienionego enzymu [28]. Ostatnio wykazano, że proces elongacji transkrypcji przebiega znacznie wolniej w głodzonych bakteriach w porównaniu z normalnymi warunkami wzrostu [29-32]. W związku z tym znaczna część cząsteczek polimerazy RNA może być zaangażowana w stosunkowo wolno przebiegającą podczas odpowiedzi ścisłej transkrypcję (na etapie elongacji) i dlatego niedostępna dla zainicjowania transkrypcji w nowych miejscach. Promotory, które wymagają dużego stężenia polimerazy RNA do zainicjowania transkrypcji mogą być nieaktywne w głodzonych komórkach. Mimo wcześniejszych sugestii, że ppGpp hamuje także translację [33], ostatnio wykazano że nukleotyd ten nie wpływa bezpośrednio na syntezę białek [30]. Zmiany transkrypcji są pierwotnymi efektami odpowiedzi ścisłej i prowadzą do szeregu wtórnych zmian wpływających praktycznie na cały metabolizm komórki [1].



Ryc. 1. Wywołanie odpowiedzi ścisłej i przemiany jej głównego efektora — ppGpp (guanozyno 5′-dwufosforanu-3′-dwufosforanu). W warunkach normalnego wzrostu w komórkach znajduje się wystarczająca ilość aminokwasów (oznaczonych jako małe wypełnione kółka), w związku z czym większość cząsteczek tRNA jest naładowana aminokwasami. W wyniku braku któregoś z aminokwasów, czyli w stanie głodu aminokwasowego, pojawiają się liczne nienaładowane aminokwasami cząsteczki tRNA. Po przyłączeniu się takiego tRNA w miejsce aminoacylowe na rybosomie następuje zahamowanie translacji (STOP) i aktywacja związanego z rybosomem produktu genu *relA*. Białko to, mające aktywność ATP:GTP 3′-pirofosfotransferazy i zwane również syntetazą I (p)ppGpp, katalizuje powstanie guanozyno 5′-trójfosforanu-3′-dwufosforanu (pppGpp). Nukleotyd ten zostaje przekształcony w guanozyno 5′-dwufosforan-3′-dwufosforan (ppGpp) przez produkt genu *gpp* odłączający jedną grupę fosforanową (P_i) od pppGpp. Cząsteczki ppGpp oddziaływują z polimerazą RNA zmieniając właściwości katalityczne tego enzymu. Czterofosforan guanozyny (ppGpp) jest degradowany do guanozyno-dwufosforanu (GDP) przez produkt genu *spoT*. Ponieważ białko SpoT odpowiedzialne jest także za niezależną od funkcji RelA produkcję ppGpp, wydaje się że posiada ono dwie przeciwstawne aktywności: rozkładu ppGpp (ppGpp-azy) i jego syntezy (syntetazy II ppGpp). Powstałe w wyniku rozkładu ppGpp cząsteczki GDP są przekształcane w GTP w reakcji katalizowanej przez produkt genu *ndk*.

III. Replikacja DNA w warunkach kontroli ścisłej i rozluźnionej

Replikacja materiału genetycznego jest jednym z podstawowych procesów zachodzących w żywych komórkach. Ponieważ polimeraza RNA jest bezpośrednio lub pośrednio zaangażowana w regulację replikacji większości replikonów, należało się spodziewać, że procesy te mogą podlegać kontroli ścisłej. Jednakże do niedawna doniesienia o kontroli ścisłej replikacji DNA były zadziwiająco nieliczne. Ponadto prezentowane przez różnych autorów wyniki wydawały się sprzeczne ze sobą [34, 35]. W okresie ostatnich kilku lat ukazało się kilkanaście prac opisujących wyniki badań nad replikacją DNA przykładowych replikonów w warunkach odpowiedzi ścisłej i rozluź-

http://rcin.org.pl

nionej. Skonstruowanie plazmidów zawierających gen *relA* pod kontrolą indukowanego promotora [33] pozwoliło na zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia ppGpp bez konieczności głodzenia bakterii i bezpośrednie badanie wpływu efektora odpowiedzi ścisłej na replikację DNA. Prace te pozwoliły wyjaśnić opisane wyżej sprzeczności, a w przypadku dwu replikonów (plazmidów typu ColE1 i plazmidów pochodzących od bakteriofaga λ) zaproponować mechanizmy kontroli ścisłej ich replikacji.

Dotychczas znane są doniesienia o badaniach nad kontrolą ścisłą replikacji DNA jedynie w komórkach dwóch gatunków bakterii: *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*. Poniżej przedstawione zostaną kolejno problemy regulacji replikacji DNA poszczególnych replikonów w warunkach odpowiedzi ścisłej i rozluźnionej.

III-1. Kontrola ścisła replikacji DNA w komórkach *Bacillus subtilis*

Replikacja chromosomu *Bacillus subtilis* jest zahamowana w warunkach odpowiedzi ścisłej, podczas gdy zachodzi ona nadal w głodzonych mutantach *relA* [36]. Niespodziewanie okazało się, że zahamowanie replikacji DNA w głodzonych komórkach *relA*$^+$ nie jest równoznaczne z zablokowaniem inicjacji tego procesu. W warunkach odpowiedzi ścisłej replikacja rozpoczyna się normalnie w rejonie *origin* i przebiega dwukierunkowo (tak jak w normalnych warunkach) na odcinkach o długości około 200 tysięcy par zasad. Dopiero wtedy następuje zahamowanie ruchu widełek replikacyjnych [37]. Przypuszcza się zatem, że w okolicach wspomnianego zatrzymania replikacji istnieje specyficzny rejon kontrolny DNA odpowiedzialny za odwracalne zahamowanie ruchu widełek replikacyjnych. Może to odbywać się poprzez modyfikację jednego ze składników replisomu, wrażliwego na warunki odpowiedzi ścisłej [37].

III-2. Kontrola ścisła replikacji DNA w komórkach *Escherichia coli*

Badania kontroli ścisłej replikacji DNA w komórkach *Escherichia coli* były przeprowadzane na kilku replikonach. Ich wyniki są podsumowane w tabeli 1.

Tabela 1

Replikcja DNA w komórkach *E. coli* w warunkach kontroli ścisłej i rozluźnionej (czyli w głodzonych szczepach *relA*$^+$ i *relA*$^-$) oraz w niegłodzonych komórkach zawierających wysoki poziom ppGpp.

Typ replikonu	Replikon	Głodzenie wywołane brakiem aminokwasów			Wysoki poziom ppGpp bez głodzenia	Piśmiennictwo
		Głód	*relA*$^+$	*relA*$^-$		
oriC	Chromosom *E. coli*	Ile	–	+	NB	37,38,39
		Arg	–	–		
		Val	–	–		
	Plazmidy *oriC*	Ile	–	+	–	38, 39, 40
		Arg	–	–		
		Val	–	–		
ColE1	pBR322 i pochodne	Ile	–	+	–	34, 35, 38, 40, 41-47, 51
		Arg	–	+		
		Leu	–	+		
		His	–	+		
		Met	NB	+		
		Trp	–	NB		
		Val	–	+		
		Phe	+	+		
	pUC19	Ile	+	+	NB	47, 48
		Arg	+	+		
	Pochodne p15A	Ile	–	+	–	40, 42, 49
		Arg	+	+		
λ	Plazmidy λ	Ile	–	+	–	40, 49-53
		Arg	–	+		
pSC101	pSC101 i pochodne	Ile	–	–	–	40, 49
		Arg	+	+		
RK2	pLAFRx	Ile	–	–	+	40, 49
		Arg	–	–		

Oznaczenia: *relA*$^+$ i *relA*$^-$ — odpowiednie szczepy *E. coli*; Ile, Arg, Val, Leu, His, Met, Trp, Phe — głód wywołany brakiem odpowiednio: izoleucyny, argininy, waliny, leucyny, histydyny, metioniny, tryptofanu, fenyloalaniny; (-) zahamowanie replikacji; (+)zachodząca replikacja; NB — nie badano;

http://rcin.org.pl

III-2.1. *oriC*

Replikacja chromosomu *Escherichia coli* rozpoczyna się w specyficznym miejscu zwanym *oriC*. Podobnie jak w przypadku chromosomu *Bacillus subtilis*, synteza DNA w komórkach *E. coli* jest zahamowana podczas odpowiedzi ścisłej. Jednakże w odróżnieniu od *B. subtilis*, zablokowaniu ulega proces inicjacji replikacji w *oriC* [37]. Podobne zjawisko było obserwowane w przypadku plazmidów zawierających rejon *oriC* z chromosomu *E. coli* jako jedyne miejsce inicjacji replikacji [38]. Co ciekawe, w mutantach *relA*, głód wywołany brakiem izoleucyny nie powodował istotnych zaburzeń w replikacji plazmidów *oriC* jak również chromosomu *E. coli*, podczas gdy brak innych aminokwasów był przyczyną zahamowania replikacji obu replikonów [38]. Zaproponowano, że hipotetyczne, niestabilne białko nie zawierające w swojej sekwencji izoleucyny jest niezbędne do inicjacji replikacji DNA w *oriC*. Białko takie może być syntetyzowane podczas odpowiedzi rozluźnionej (gdy proces transkrypcji prowadzący do utworzenia mRNA może zachodzić normalnie), lecz nie podczas odpowiedzi ścisłej (gdy transkrypcja może być zahamowana) [38]. Dalsze prace doprowadziły do znalezienia białka (nazwanego Pin), które może być kandydatem spełniającym powyższe założenia [39]. Zarówno przedstawione wyżej badania jak wyniki innych prac [28] wskazują na pośredni wpływ ppGpp na proces inicjacji replikacji rozpoczynającej się z *oriC*. Niemniej jednak wpływ ten jest bardzo istotny, gdyż podwyższony poziom tego nukleotydu w niegłodzonych komórkach powodował zahamowanie replikacji plazmidów *oriC* (Tabela 1). Jedną z możliwości wytłumaczenia zablokowania syntezy DNA chromosomu *E. coli* przez wysokie stężenie ppGpp jest zahamowanie w tych warunkach transkrypcji rozpoczynającej się z promotorów mających istotne znaczenie dla procesu inicjacji replikacji. Wiadomo, że promotory *dnaA*P1 i *dnaA*P2, z których rozpoczyna się transkrypcja operonu zawierającego między innymi gen kodujący inicjatorowe białko DnaA, znajdują się pod kontrolą ścisłą [54]. Znaczne obniżenie efektywności transkrypcji z tych promotorów, oraz z dwu innych promotorów odgrywających ważną rolę w aktywacji rejonu *orgin* (P*mioC* i P*gid*) może doprowadzić do braku inicjacji replikacji DNA podczas głodzenia komórek *relA*$^+$ jak również w niegłodzonych komórkach zawierających wysokie stężenie ppGpp. Podobny mechanizm może być odpowiedzialny za regulowane przez wewnątrzkomórkowy poziom ppGpp sprzężenie kontroli częstości inicjacji replikacji DNA z szybkością wzrostu komórki bakteryjnej [54, 55].

III-2.2. Plazmidy ColE1

Plazmidy ColE1 stanowią dużą grupę replikonów, u których regulacja inicjacji replikacji odbywa się w podobny sposób. Plazmid pBR322 [56], należący do grupy ColE1, był pierwszym replikonem, którego replikacja była badana w warunkach odpowiedzi ścisłej i rozluźnionej. Pierwsze doniesienia o zahamowaniu replikacji plazmidu pBR322 podczas kontroli ścisłej [34] zostały wkrótce podważone przez innych autorów, dokumentujących zachodzącą nadal replikację plazmidowego DNA w głodzonych szczepach *relA*$^-$ jak i *relA*$^+$ [35]. Pewnym zaskoczeniem było w związku z tym potwierdzenie w innych laboratoriach poprzednich doniesień o zahamowaniu replikacji plazmidu pBR322 w warunkach odpowiedzi ścisłej [38, 51].

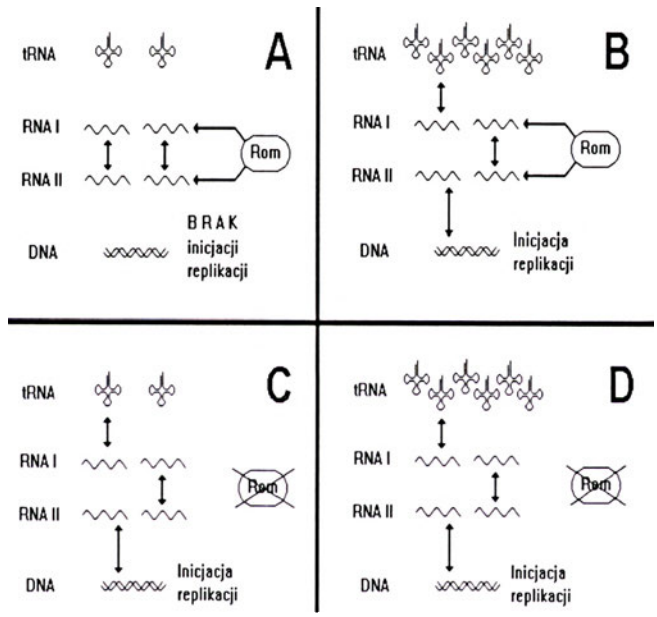
Plazmid pBR322, podobnie jak inne plazmidy z grupy ColE1, wymaga do inicjacji replikacji jedynie białek kodowanych przez genom komórki gospodarza. Niemniej jednak, w regulacji procesu replikacji najważniejszą rolę odgrywają dwa transkrypty pochodzące z plazmidu (RNA I i RNA II) oraz jedno białko (Rom) kodowane przez gen położony na plazmidzie. RNA II jest cząsteczką tworzącą połączenie hybrydowe ze swoją matrycą DNA w pobliżu miejsca rozpoczęcia replikacji (*ori*) [57]. Utworzony hybryd RNA-DNA jest następnie trawiony przez RN-azę H (enzym nacinający RNA będący w hybrydzie z DNA). Powstałe w ten sposób krótkie odcinki RNA są wydłużane przez polimerazę DNA, która dodaje deoksyrybonukleotydy do ich końców 3'-OH [57]. RNA I jest negatywnym regulatorem inicjacji replikacji. Może on hybrydyzować z RNA II, konkurując w ten sposób z matrycą DNA. Utworzenie hybrydu RNA I-RNA II uniemożliwia hybrydyzację RNA II z matrycą DNA [58, 59]. Również białko Rom jest negatywnym regulatorem inicjacji replikacji, gdyż wzmacnia ono oddziaływania RNA I z RNA II [60].

W świetle przedstawionego powyżej mechanizmu regulacyjnego, zahamowanie replikacji DNA plazmidu pBR322 w warunkach odpowiedzi ścisłej, lecz nie w warunkach odpowiedzi rozluźnionej, mogłoby być wytłumaczone w najprostszy sposób przez wrażliwość promotora p_{RNAII} na ppGpp lub aktywację promotora p_{RNAI} w głodzonych komórkach *relA*$^+$. Jednakże Lin-Chao i Bremer [35] udowodnili, że obydwa te promotory nie podlegają kontroli ścisłej. Dodatkowo zdawał się komplikować sprawę fakt, że inny plazmid z grupy ColE1 — pACYC184, pochodny replikonu p15A [61] — replikował się lub nie podczas odpowiedzi ścisłej w zależności od zastosowanego rodzaju głodzenia [49]. Ta pozorna komplikacja problemu przyczyniła się do zrozumienia poprzednio opisanego paradoksu, polegającego na sprzecznych ze sobą wynikach otrzymanych w różnych laboratoriach [34, 35, 38, 51]. Ponowna analiza wyników wykazała, że rodzaj brakującego aminokwasu podczas głodzenia bakterii *relA*$^+$ decyduje o tym, czy replikacja plazmidów z grupy ColE1 jest zahamowana czy też przebiega nadal. Dla przykładu, w szczepach *relA*$^+$ replikacja plazmidu pBR322 była zahamowana podczas braku izoleucyny, histydyny czy waliny [34, 38, 44,

http://rcin.org.pl

51], zaś brak fenyloalaniny nie wpływał w znaczący sposób na replikację tego plazmidu [35]. Wytłumaczenie tego zdawałoby się dziwnego zjawiska było możliwe po analizie komputerowej sekwencji RNA I, RNA II oraz tRNA. Cząsteczki różnych rodzajów tRNA posiadają sekwencje komplementarne do RNA I bądź RNA II. W związku z tym, w stanie wolnym (nienaładowanym aminokwasami) cząsteczki tRNA mogą hybrydyzować z cząsteczkami RNA kontrolującymi częstość inicjacji replikacji plazmidów typu ColE1, szczególnie z RNA I [62]. W warunkach braku lub niedoboru aminokwasów ilość nienaładowanych cząsteczek tRNA gwałtownie wzrasta, a ich hybrydyzacja z RNA I wpływa znacząco na poziom funkcjonalnych cząsteczek RNA I — negatywnego regulatora replikacji. Może to doprowadzić do efektywnego łączenia się RNA II z matrycą DNA, a co za tym idzie, do inicjacji replikacji plazmidu. Należy przy tym pamiętać, że synteza tRNA przebiega normalnie w głodzonych mutantach *relA*, jest jednak silnie zahamowana podczas odpowiedzi ścisłej [23]. Zatem pozytywny wpływ wolnych cząsteczek tRNA na replikację plazmidów ColE1 powinien być znacznie większy podczas kontroli rozluźnionej. Faktycznie, replikacja plazmidów ColE1 i ich amplifikacja w szczepach $relA^-$ była obserwowana w przypadku wszystkich do tej pory badanych plazmidów we wszystkich rodzajach głodzenia (Tabela 1). Z drugiej strony, różne rodzaje tRNA posiadają różny stopień komplementarności do RNA I. Ponadto różne geny tRNA należą do różnych operonów i w związku z tym efektywność ich transkrypcji może być w różnym stopniu obniżona podczas odpowiedzi ścisłej. Zatem brak różnych aminokwasów może powodować pojawienie się różnych nienaładowanych cząsteczek tRNA w różnych ilościach a co za tym idzie różnie wpływać na replikację różnych plazmidów z grupy ColE1 [49].

Kolejnym niespodziewanym odkryciem było stwierdzenie, że plazmid pUC19 [63] replikuje się podczas głodzenia wywołanego brakiem izoleucyny jak i argininy zarówno w szczepach $relA^-$ jak i $relA^+$ [47, 48]. Plazmid pUC19 jest pochodnym plazmidu pBR322 [56], nie replikującego się w wyżej opisanych warunkach w szczepach $relA^+$ (Tabela 1). Jedyne istotne różnice pomiędzy replikonami pBR322 a pUC19 to punktowa mutacja w RNA II w pUC19 odpowiedzialna za podwyższoną ilość kopii tego plazmidu w komórkach *E. coli* [64] oraz brak w pU19 genu *rom*, obecnego w pBR322 [56, 63]. Skonstruowanie plazmidu zawierającego rejon *origin* z pBR322 lecz bez funkcjonalnego genu *rom* oraz plazmidu zawierającego rejon *origin* z pUC19 i gen *rom*, a także zbadanie ich replikacji w warunkach odpowiedzi ścisłej i rozluźnionej pozwoliło na stwierdzenie, że białko Rom odgrywa bardzo istotną rolę w regulacji replikacji plazmidu pBR322 w głodzonych szczepach *E. coli* [47]. Replikacja plazmidu podczas odpowiedzi ścisłej zachodziła bowiem tylko przy nieobecności funkcjonalnego genu *rom*. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano mechanizm kontroli ścisłej replikacji plazmidu pBR322 [47]. Białko Rom wzmacnia hybrydyzację RNA I z RNA II poprzez oddziaływanie z obiema tymi cząsteczkami [65, 66] ewentualnie głównie z RNA II, jeśli RNA II pochodzi z plazmidu pUC [64]. W związku z tym, białko Rom nie jest w stanie wzmacniać oddziaływania RNA I z tRNA [47]. W głodzonych komórkach funkcja Rom nie wystarcza do zahamowania replikacji plazmidu pBR322, jeśli synteza tRNA może zachodzić normalnie i poziom nienaładowanych aminokwasami cząsteczek tRNA mogących hybrydyzować z RNA I jest stosunkowo wysoki, tak jak to ma miejsce podczas odpowiedzi rozluźnionej. Podczas kontroli ścisłej wydajność transkrypcji genów tRNA jest znacznie obniżona, zatem poziom nienaładowanych cząsteczek



Ryc. 2. Mechanizm kontroli ścisłej replikacji plazmidu pBR322 i jego pochodnych w komórkach *Escherichia coli*. **A** — warunki odpowiedzi ścisłej i obecności funkcji białka Rom: ilość nienaładowanych cząsteczek tRNA jest ograniczona ze względu na zahamowanie transkrypcji z odpowiednich promotorów; białko Rom ułatwia oddziaływanie (strzałki) RNA I z RNA II a nie z tRNA. W związku z tym RNA II hybrydyzuje z RNA I a nie z matrycą DNA, co uniemożliwia inicjację replikacji. **B** — warunki odpowiedzi rozluźnionej i obecności funkcji białka Rom: ilość nienaładowanych cząsteczek tRNA wzrasta znacznie; białko Rom ułatwia oddziaływanie RNA I z RNA II ale ze względu na wysokie stężenie wolnych tRNA wiele cząsteczek RNA I hybrydyzuje z cząsteczkami tRNA; powoduje to, że pewna pula RNA II może hybrydyzować z matrycą DNA co jest pierwszym etapem inicjacji replikacji. **C** — warunki odpowiedzi ścisłej i braku funkcji Rom; ilość nienaładowanych cząsteczek tRNA jest ograniczona ze względu na zahamowanie transkrypcji z odpowiednich promotorów, jednak ze względu na brak funkcji Rom, RNA I może hybrydyzować zarówno z RNA II jak z tRNA; powoduje to, że pewna pula RNA II może hybrydyzować z matrycą DNA co jest pierwszym etapem inicjacji replikacji **D** — warunki odpowiedzi rozluźnionej i braku funkcji Rom: ilość nienaładowanych cząsteczek tRNA wzrasta znacznie; wiele cząsteczek RNA I hybrydyzuje z cząsteczkami tRNA; powoduje to, że RNA II może hybrydyzować z matrycą DNA co jest pierwszym etapem inicjacji replikacji.

http://rcin.org.pl

tRNA w komórce jest zdecydowanie niższy niż w szczepach *relA*$^-$. W takiej sytuacji RNA I hybrydyzuje głównie z RNA II a nie z tRNA dzięki funkcji białka Rom wspomagającej oddziaływania RNA I-RNA II. Doprowadza to w konsekwencji do zahamowania lub znacznego obniżenia częstości inicjacji replikacji plazmidu pBR322 [47]. Omówiony wyżej mechanizm kontroli ścisłej replikacji plazmidu pBR322 i jego pochodnych jest przedstawiony schematycznie na rycinie 2.

III-2.3. Plazmidy λ

Plazmidy pochodzące od bakteriofaga λ, czyli tak zwane plamidy λ, zawierają część genomu faga λ — tak zwany rejon replikacyjny. Rejon ten obejmuje wszystkie geny i sekwencje sygnałowe niezbędne do inicjacji replikacji DNA. W związku z tym plazmidy λ mogą replikować się w komórkach *E. coli* podobnie jak inne plazmidy i są utrzymywane w liczbie kilkunastu kopii na komórkę [67]. Wspomniany rejon replikacyjny λ obejmuje operator o_R i promotor p_R oraz będące pod ich kontrolą i położone w jednym operonie geny *cro*, *cII*, *O* i *P*. Sekwencja *ori*λ, miejsce w którym rozpoczyna się replikacja DNA, znajduje się wewnątrz genu λ*O*. Inicjacja replikacji plazmidu λ była badana głównie *in vitro* z zastosowaniem oczyszczonych białek replikacyjnych bakteriofaga λ oraz bakterii *E. coli*. Badania te pozwoliły poznać poszczególne etapy montażu kompleksu replikacyjnego tworzonego w *ori*λ. Pierwszym etapem jest związanie się inicjatorowego białka λO z sekwencją *ori*λ i utworzenie tak zwanego „O-somu" [68, 69]. Do O-somu wiąże się kompleks dwóch białek λP·DnaB, tworząc stabilny kompleks nukleoproteinowy *ori*λ·λO·λP·DnaB [69]. Ponieważ białko λP jest równocześnie inhibitorem helikazy DnaB [70], powstały kompleks nie może rozpocząć rozwijania podwójnej helisy DNA, a tym samym proces replikacji DNA nie może się rozpocząć. Funkcja białek szoku termicznego DnaJ, DnaK i GrpE jest niezbędna do przekształcenia wyżej opisanego kompleksu w taki sposób, aby uwolnić helikazę DnaB od inhibitora λP [71-74]. Następnie helikaza DnaB rozwija dwuniciową strukturę DNA w okolicach *ori*λ a primaza DnaG tworzy pierwsze primery RNA. Wreszcie holoenzym polimerazy III DNA wydłuża powstałe uprzednio primery przeprowadzając dalej proces replikacji [75]. Do inicjacji replikacji DNA plazmidów λ *in vivo* funkcja polimerazy RNA jest niezbędna nie tylko do produkcji mRNA potrzebnego do syntezy białek replikacyjnych, lecz także do procesu transkrypcyjnej aktywacji *ori*λ [76]. Proces ten polega na przejściu transkrypcji przez *ori*λ lub w okolicach tej sekwencji. Transkrypcyjna aktywacja *ori*λ jest również niezbędna do replikacji plazmidu λ *in vitro* odtworzonej z oczyszczonych białek λO i λP oraz ekstraktu białkowego z komórek *E. coli* zwanego frakcją II [77]. Jednakże funkcja polimerazy RNA nie jest konieczna do replikacji plazmidu λ odtworzonej *in vitro* z oczyszczonych białek replikacyjnych faga λ i *E. coli* [78, 79]. Przypuszcza się, że *in vivo* histonopodobne białko HU wiąże się z DNA w okolicach *ori*λ i uniemożliwia prawidłowe utworzenie lub funkcjonowanie kompleksu *ori*λ·λO·λP·DnaB [79]. Rolą transkrypcyjnej aktywacji *ori*λ może być w takim razie zniesienie negatywnego wpływu białka HU na replikację plazmidu λ. Inicjatorowe białko λO jest bardzo niestabilne w komórkach *E. coli* [80, 81]. Dlatego też zakładano, że związanie się inicjatorowego białka z sekwencją *ori*λ prowadzi do jednorazowej inicjacji replikacji, po której kompleks replikacyjny ulega rozpadowi [82]. Zapoczątkowanie następnej rundy replikacyjnej byłoby pośrednim efektem rozcieńczenia białka Cro, będącego represorem promotora p_R (dzięki wiązaniu się z sekwencją operatora o_R), w wyniku wzrostu objętości komórki. Transkrypcja startująca z promotora p_R daje w rezultacie mRNA dla syntezy białek λO i λP oraz gra rolę aktywacji transkrypcyjnej *ori*λ. Ponieważ gen λ*cro* należy do tego samego operonu co geny λ*O* i λ*P*, w wyżej opisanych warunkach dochodzi również do produkcji kolejnej porcji białka Cro, co z kolei powoduje ponowne zablokowanie promotora p_R.

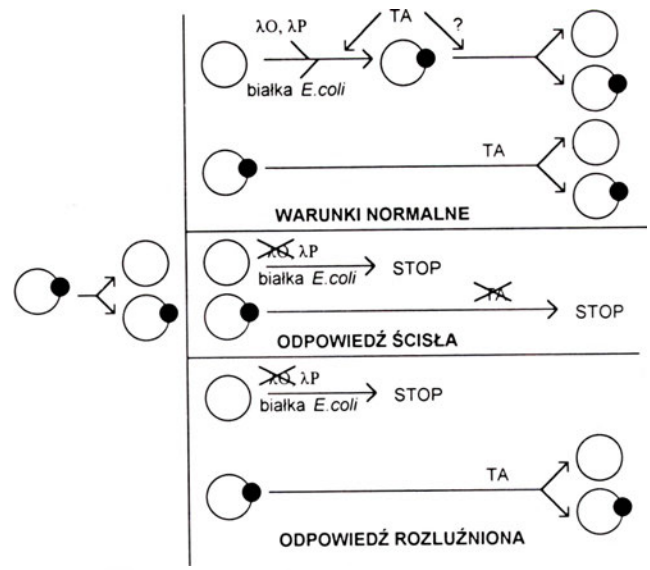
Biorąc pod uwagę wyżej przedstawiony mechanizm regulacyjny stwierdzenie, że plazmid λ może replikować się w warunkach braku możliwości syntezy białek (w tym również białka λO) było raczej nieoczekiwane [50]. Replikacja plamidu λ jest bowiem co prawda zahamowana podczas odpowiedzi ścisłej, jednakże zachodzi przez co najmniej kilka godzin w głodzonych mutantach *relA* [51]. Zjawisko to jest niezależne od rodzaju brakującego aminokwasu [49-53]. Wykazano, że replikacja plazmidu λ podczas odpowiedzi rozluźnionej zachodzi dzięki kompleksowi replikacyjnemu utworzonemu jeszcze przed rozpoczęciem głodzenia i dziedziczonemu przez jedną z dwu potomnych kopii plazmidowych po każdej rundzie replikacyjnej [52]. Kompleks ten zawiera białko λO chronione przed działaniem specyficznej proteazy ClpXP [83-85] przez inne elementy kompleksu [86, 87]. Białko λO zawarte w kompleksie replikacyjnym jest uwidaczniane jako frakcja stabilnego białka w eksperymentach typu wypłaszania piętna [86, 87]. Ponieważ frakcja stabilnego białka λO była obserwowana zarówno w szczepach *relA*$^-$ jak i *relA*$^+$ [86, 87], zaś funkcja represora Cro nie ma istotnego znaczenia regulacyjnego podczas głodzenia bakterii [51], przyczyna zahamowania replikacji DNA plazmidu λ w warunkach odpowiedzi ścisłej pozostawała do niedawna sprawą niejasną. Dopiero ostatnio wykazano, że replikacja plazmidu λ w głodzonych mutantach *relA* jest wrażliwa na rifampicynę (inhibitor polimerazy RNA) [53]. Synteza białek λO i λP nie jest w tych warunkach konieczna do replikacji, zatem jedyną transkrypcją mogącą mieć znaczenie pozostawała transkrypcyjna aktywacja *ori*λ. Okazało się, że promotor p_R, z które-

http://rcin.org.pl

go rozpoczyna się transkrypcja aktywująca *oriλ*, jest wrażliwy na podwyższony poziom ppGpp w komórce [53]. Zatem obniżenie wydajności aktywacji transkrypcyjnej może być powodem zahamowania replikacji plazmidu λ w warunkach odpowiedzi ścisłej. Zakładano, że jeśli ta hipoteza jest prawdziwa, to zmiana promotora p_R w plazmidzie λ na inny promotor, niewrażliwy na ppGpp, powinna dać w efekcie plazmid replikujący się zarówno w głodzonych szczepach *relA*$^-$ jak i *relA*$^+$, jak i w niegłodzonych komórkach zawierających wysoki poziom ppGpp. Rzeczywiście, plazmid taki — zawierający promotor p_{lac} (niewrażliwy na ppGpp [29]) — został skonstruowany i spełnił wszystkie wymienione wyżej warunki [53].

Uzyskane w wyżej opisany sposób wyniki pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu kontroli ścisłej replikacji plazmidu λ (Ryc. 3). Po każdej rundzie replikacji plazmidu λ, zachodzącej także w normalnych warunkach wzrostu, uprzednio zmontowany kompleks replikacyjny jest dziedziczny przez jedną z dwu potomnych kopii plazmidowych [52]. Po przejściu bakterii *relA*$^-$ w stan głodu wywołanego brakiem aminokwasów (czyli podczas odpowiedzi rozluźnionej) nowy kompleks replikacyjny nie może być utworzony ze względu na brak syntezy inicjatorowego białka λO; jednakże replikacja tych plazmidów, które odziedziczyły kompleks replikacyjny po poprzedniej rundzie może zachodzić nadal. Warto zwrócić uwagę, że przyrost ilości plazmidu λ w głodzonych komórkach *relA*$^-$ ma charakter funkcji liniowej [51, 53] a nie wykładniczej (czego należałoby się spodziewać gdyby replikowały się wszystkie nowo powstające po każdej rundzie cząsteczki plazmidowe). Ponadto synteza DNA plazmidowego utrzymuje się w tych warunkach przez cały czas na stałym poziomie [52]. Fakty te silnie przemawiają za właśnie takim sposobem replikacji plazmidów λ jak przedstawiono powyżej. W głodzonach dzikich szczepach *E. coli* (czyli podczas odpowiedzi ścisłej) również nie może dochodzić do powstawania nowych kompleksów replikacyjnych. Jednakże w odróżnieniu od mutantów *relA*, wysoki poziom ppGpp w dzikich komórkach nie pozwala na efektywną aktywację transkrypcyjną *oriλ*, co z kolei uniemożliwia rozpoczęcie nowych rund replikacyjnych plazmidów posiadających odziedziczony kompleks.

Przedstawiony mechanizm kontroli ścisłej replikacji DNA plazmidów λ ma reż istotne znaczenie dla zrozumienia regulacji tego procesu w normalnych warunkach. Dziedziczenie kompleksu replikacyjnego zachodzi podczas replikacji plazmidów λ w niegłodzonych bakteriach [52], zatem nowe kompleksy replikacyjne muszą być tworzone od nowa jedynie na tych cząsteczkach plazmidowych, które nie otrzymały uprzednio zmontowanego kompleksu. Wynika z tego, że samo utworzenie kompleksu replikacyjnego w *oriλ* nie jest wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia replikacji. Ostatnio wykazano, że ani brak ani nadmiar



Ryc. 3. Mechanizm replikacji plazmidu λ w komórkach *Escherichia coli* rosnących w warunkach normalnych (WARUNKI NORMALNE), podczas odpowiedzi ścisłej (ODPOWIEDŹ ŚCISŁA) i podczas odpowiedzi rozluźnionej (ODPOWIEDŹ ROZLUŹNIONA). Każda runda replikacyjna (lewa część schematu) daje w rezultacie dwie potomne cząsteczki plazmidu λ (duże kółka), z których jedna dziedziczy utworzony uprzednio kompleks replikacyjny (małe zaczernione kółka). W warunkach normalnego wzrostu nowy kompleks replikacyjny musi być na nowo zmontowany w *oriλ* (z kodowanych na plazmidzie białek λO, λP i białek replikacyjnych *E. coli*) jedynie na kopii plazmidowej pozbawionej „starego" kompleksu. Transkrypcyjna aktywacja *oriλ* (TA) może mieć podwójną rolę: zniesienie negatywnego oddziaływania białka HU w celu umożliwienia prawidłowego montażu i funkcjonowania kompleksu replikacyjnego oraz prawidłowe umiejscowienie kompleksu replikacyjnego dzięki rozluźnieniu dwuniciowej struktury DNA w *oriλ*, co umożliwia rozpoczęcie replikacji. Obie te funkcje mogą być (lub nie) spełniane podczas tego samego jednorazowego procesu transkrypcji. W przypadku replikacji przeprowadzonej przez „stary" kompleks replikacyjny, konieczna jest jedynie druga z wymienionych funkcji transkrypcyjnej aktywacji *oriλ*. Podczas odpowiedzi ścisłej utworzenie nowego kompleksu replikacyjnego jest niemożliwe ze względu na brak syntezy białka λO. Replikacja nie może być też rozpoczęta przez uprzednio zmontowany i odziedziczony po poprzedniej rundzie replikacyjnej kompleks ze względu na zahamowanie transkrypcyjnej aktywacji *oriλ*. Chociaż synteza białka λO jest również niemożliwa podczas odpowiedzi rozluźnionej, to normalnie przebiegająca transkrypcyjna aktywacja *oriλ* pozwala na inicjację replikacji tych cząsteczek, które posiadają „stary" kompleks replikacyjny.

proteazy ClpXP, która trawi specyficznie białko λO i jest odpowiedzialna za jego szybki rozpad w komórce, nie wpływa w istotny sposób na replikację plazmidów λ i rozwój faga λ [88]. Wobec tego, głównym procesem regulującym częstość inicjacji replikacji plazmidu λ wydaje się być transkrypcyjna aktywacja *oriλ*. Warto zwrócić uwagę, że gdyby rzeczywiście jedyną rolą transkrypcyjnej aktywacji *oriλ* było zniesienie negatywnego wpływu białek HU na proces montażu kompleksu *oriλ* · λO · λP · DnaB lub też na jego prawidłowe funkcjonowanie (jak sugerowano wcześniej [79]), to w mutantach *hupA hupB*, pozbawionych białka HU, replikacja plazmidu λ powinna zachodzić także podczas odpowiedzi ścisłej. Stwierdzenie zaha-

http://rcin.org.pl

mowania replikacji plazmidu λ w głodzonych aminokwasowo bakteriach *relA*$^+$ *hupA*$^-$ *hupB*$^-$ [89] wskazuje na istnienie dodatkowej, najprawdopodobniej regulacyjnej roli aktywacji transkrypcyjnej *ori*λ.

Warto w tym momencie przypomnieć istnienie wielu analogii pomiędzy replikacją DNA plazmidu λ i faga λ a regulacją replikacji DNA w komórkach eukariotycznych [90]. Wykazano ostatnio, że podobnie jak w przypadku plazmidu λ, samo utworzenie kompleksu replikacyjnego w rejonie *origin* nie wystarcza do zainicjowania replikacji chromosomów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [91, 92]. Zaproponowano istnienie hipotetycznego czynnika odpowiedzialnego za inicjację replikacji chromosomów eukariotycznych w odpowiednim momencie fazy S cyklu komórkowego [93]. Bardzo kuszące jest spekulowanie, że może być to czynnik transkrypcyjny a regulowana przez niego transkrypcja ma decydujące znaczenie w rozpoczęciu nowej rundy replikacyjnej, analogicznie do sytuacji mającej miejsce w przypadku plazmidu λ.

III-2.4. Plazmid pSC101

Mechanizm regulacji replikacji plazmidu pSC101 [94] w warunkach odpowiedzi ścisłej i rozluźnionej jest jeszcze słabo poznany. Niemniej wykazano, że replikacja tego plazmidu jest zahamowana w szczepach *relA*$^+$ i *relA*$^-$ podczas braku izoleucyny, zachodzi natomiast nadal w obu tych szczepach podczas braku arigininy [49]. Sytuacja ta przypomina nieco wyniki uzyskiwane podczas badania replikacji rozpoczynającej się w *oriC* [38, 39]. Analogicznie do prób wytłumaczenia mechanizmu kontroli ścisłej replikacji chromosomu *E. coli* (rozdział III-2.1), można zakładać istnienie hipotetycznego negatywnego regulatora replikacji plazmidu pSC101, który w swojej sekwencji zawiera reszty argininy a nie zawiera reszt izoleucyny [49]. Wykazano, że replikacja plazmidu pochodzącego od pSC101 jest hamowana przez wysoki poziom ppGpp w niegłodzonych komórkach [40]. Wyniki te skłaniają do wniosku, że proces replikacji plazmidu pSC101 podlega kontroli ścisłej a brak argininy stwarza specyficzne warunki, w których plazmid ten może replikować się nawet przy wysokim stężeniu ppGpp. Istnieje wiele białek zaangażowanych w inicjację replikacji plazmidu pSC101. Ponadto, również w przypadku pSC101 do inicjacji replikacji potrzebna jest aktywacja transkrypcyjna *origin* [95]. Zatem istnieje wiele promotorów, które potencjalnie mogą być wrażliwe na ppGpp a zahamowanie transkrypcji z tych promotorów może w znaczący sposób wpływać na replikację plazmidu pSC101.

III-2.5. Plazmid RK2

Replikacja plazmidu pochodzącego od RK2 [96, 97] była zahamowana podczas wszystkich stosowanych do tej pory rodzajów głodzenia zarówno w szczepach *relA*$^+$ jak i *relA*$^-$ (Tabela 1). Sugeruje to, że raczej brak syntezy białek a nie ewentualne zahamowanie przez ppGpp transkrypcji z odpowiednich promotorów jest bezpośrednio odpowiedzialny za obserwowane zablokowanie replikacji replikonu RK2 podczas odpowiedzi ścisłej i rozluźnionej [49]. Potwierdzają to wyniki badań replikacji plazmidu pochodnego RK2 w niegłodzonych komórkach *E. coli* zawierających wysoki poziom ppGpp. W przeciwieństwie do wszystkich innych badanych replikonów, plazmid pochodzący od RK2 replikował się efektywnie w wyżej opisanych warunkach [40]. Poprzednio wykazano też, że zarówno transkrypcja jak i translacja są procesami niezbędnymi do zainicjowania nowej rundy replikacji plazmidu RK2 [98]. Najprostszym wytłumaczeniem uzyskanych wyników jest zatem założenie, że promotory z których rozpoczyna się transkrypcja niezbędna bezpośrednio lub pośrednio do inicjacji replikacji plazmidu RK2 nie podlegają kontroli ścisłej. Z drugiej strony, ekspresja negatywnych regulatorów replikacji plazmidu RK2 może być zahamowana przez wysokie stężenie ppGpp w komórce.

IV. Uwagi końcowe

Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w zrozumieniu mechanizmów kontrolujących procesy replikacji DNA w komórkach bakteryjnych w warunkach głodowych, które co prawda rzadko stosuje się w praktyce laboratoryjnej, ale które są codziennością w naturalnym środowisku. Obecnie w miarę dobrze poznana jest regulacja replikacji DNA niektórych replikonów podczas odpowiedzi ścisłej i rozluźnionej. Dotyczy to przede wszystkim plazmidów z grupy ColE1 oraz plazmidów λ. W tych dwu przypadkach zaproponowano molekularne mechanizmy wyjaśniające regulację inicjacji replikacji w głodzonych komórkach. W przypadku innych replikonów, zwłaszcza pSC101 i RK2, potrzebne są dalsze badania, które mogłyby rozwiązać wiele do tej pory niewyjaśnionych problemów. Zwraca uwagę fakt, że poznanie mechanizmów kontrolujących replikację DNA w głodzonych komórkach *E. coli* pozwoliło na weryfikację poprzednich hipotez próbujących tłumaczyć regulację replikacji DNA w normalnych warunkach wzrostu, poznanie nowych czynników regulujących ten podstawowy proces komórkowy a nawet zasugerowanie możliwości istnienia analogicznych mechanizmów w komórkach eukariotycznych. Uzyskane wyniki badań nad kontrolą ścisłą replikacji DNA mają też pewien aspekt praktyczny. Odpowiednie głodzenie aminokwasowe szczepów *E. coli* może być bowiem z powodzeniem stosowane jako tania i efektywna metoda amplifikacji DNA plazmidowego [41, 43, 44, 46, 49].

Artykuł otrzymano 13 października 1994 r.
Zaakceptowano do druku 24 listopada 1994 r.

http://rcin.org.pl

Piśmiennictwo

1. Cashel M, Rudd K E (1987) W: Neidhardt F C, Ingraham J L, Low K B, Magasanic B, Schaechter M, Umbarger H E (red) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, American Society for Microbiology, Washington, DC, str. 1410-1438
2. Cochran J W, Byrne R W (1974) *J Biol Chem* **249:** 353-360
3. Lipmann F, Sy J (1976) *Prog. Nucleic Acids Res Mol Biol* **17:** 1-14
4. Pedersen F C, Kjelgaard N O (1977) *Eur J Biochem* **76:** 91-97
5. Schmale H, Fehr S, Richter D (1978) *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **359:** 125-127
6. Haseltine W A, Block R (1973) *Proc Natl Acad Sci USA* **70:** 1564-1568
7. Pedersen F S, Lund E, Kjelgaard N O (1973) *Nature New Biol* **243:** 13-15
8. Somerville D R, Ahmed A (1977) *J Mol Biol* **111:** 77-81
9. Hara A, Sy J (1983) *J Biol Chem* **258:** 1678-1683
10. Somerville C R, Ahmed A (1979) *Mol Gen Genet* **169:** 315-323
11. Xiao H, Kalman M, Ikehara K, Zemel S, Glaser G, Cashel M (1991) *J Biol Chem* **266:** 5980-5990
12. Hernandez V J, Bremer H (1991) *J Biol Chem* **266:** 5991-5999
13. Heinemeyer E A, Geis M, Richter D (1978) *Eur J Biochem* **89:** 125-131
14. Heinemeyer E A, Richter D (1977) *FEBS Lett* **84:** 357-361
15. Heinemeyer E A, Richter D (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75:** 4180-4183
16. Heinemeyer E A, Richter D (1978) *Biochemistry* **12:** 5368-4372
17. Sy J (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74:** 5529-5533
18. Lagosky P A, Chang F N (1980) *J Bacteriol* **144:** 499-508
19. Lagosky P A, Chang F N (1981) *J Biol Chem* **256:** 11651-11656
20. Glass R E, Jones S T, Ishihama A (1986) *Mol Gen Genet* **203:** 265-268
21. Tedin K, Bremer H (1992) *J Biol Chem* **267:** 2337-2344
22. Vinella D, D'Ari R (1994) *J Bacteriol* **176:** 966-972
23. Ryals J, Little R, Bremer H (1982) *J Bacteriol* **151:** 1261-1268
24. Travers A (1980) *J Bacteriol* **141:** 973-976
25. Travers A (1980) *J Mol Biol* **141:** 91-97
26. Travers A (1984) *Nucleic Acids Res* **12:** 2605-2618
27. Glass R E, Jones S T, Nomura T, Ishihama A (1987) *Mol Gen Genet* **210:** 1-4
28. Hernandez V J, Bremer H (1993 *J Biol Chem* **268:** 10851-10862
29. Vogel U, Sorensen M, Pedersen S, Jensen K F, Kilstrup M (1992) *Mol Microbiol* **6:** 2191-2200
30. Sorensen Ma, Jensen K F, Pedersen S (1994) *J Mol Biol* **236:** 441-454
31. Vogel U, Jensen K F (1994) *J Bacteriol* **176:** 2807-2813
32. Vogel U, Jensen K F (1994) *J Biol Chem* **269:** 16236-16241
33. Svitil A L, Cashel M, Zyskind J W (1993) *J Biol Chem* **268:** 2307-2311
34. Hecker M, Schroeter A, Mach F (1983) *Mol Gen Genet* **190:** 355-357
35. Lin-Chao S, Bremer H (1986) *Mol gen Genet* **203:** 150-153
36. Seror SJ, Vannier F, Levine A, Henckes G (1986) *Nature* (Lond) **321:** 709-710
37. Levine A, Vannier F, Dehbi M, Henckes G, Seror SJ (1991) *J Mol Biol* **219:** 605-613
38. Guzman E C, Carrillo F J, Jimenez-Sanchez A (1988) *Genet Res* **51:** 173-177
39. Guzman E C, Pritchard R H, Jimenez-Sanchez A (1991) *Res Microbiol* **142:** 137-140
40. Herman A, Węgrzyn G (1995) *J Basic Microbiol*, **35:** 37-43
41. Hecker M, Schroeter A, Mach F (1985) *FEMS Microbiol Lett* **29:** 331-334
42. Schroeter A, Rithdorf S, Hecker M (1988) *J Basic Microbiol* **28:** 553-555
43. Hecker M, Riethdorf S, Bauer H, Schroeter A, Borris R (1988) *Mol Gen Genet* **215:** 181-183
44. Riethdorf S, Schroeter A, Hecker M (1989) *Genet Res* **54:** 167-171
45. Riethdorf S, Ulrich A, Vulker U, Hecker M (1990) *Z Naturforsch* **45c:** 240-244
46. Hofmann K H, Neubauer P, Riethodorf S, Hecker M (1990) *J Basic Microbiol* **30:** 37-41
47. Herman A, Węgrzyn A, Węgrzyn G (1994) *Mol Gen Genet* **243:** 374-378
48. Herman A, Węgrzyn A, Węgrzyn G (1994) *Acta Biochim Polon* **41:** 122-124
49. Herman A, Węgrzyn A, Węgrzyn G (1994) *Plasmid* **32:** 89-94
50. Węgrzyn G, Kwaśnik E, Taylor K (1991) *Acta Biochim Polon* **38:** 181-186
51. Węgrzyn G, Neubauer P, Krueger S, Hecker M, Taylor K (1991) *Mol Gen Genet* **225:** 94-98
52. Węgrzyn G, Taylor K (1992) *J Mol Biol* **226:** 681-688
53. Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Herman A, Węgrzyn G (1994) *EMBO J*, **13**: 5779-5785
54. Chiaramello A E, Zyskind J W (1990) *J Bacteriol* **172:** 2013-2019
55. Zyskind J W, Smith D W (1992) *Cell* **69:** 5-8
56 Bolivar F, Rodriguez R L, Greene P J, Betlach M C, Meynecker H L, Boyer H W, Crosa J H, Valkow S (1977) *Gene* **2:** 95-113
57. Itoh T, Tomizawa J (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77:** 2450-2454
58. Lacatena R M, Cesareni G (1981) *Nature* (Lond) **294:** 623-626
59. Tomizawa J, Itoh T, Selzer G, Som T (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78:** 1421-1425
60. Tomizawa J, Som T (1984) *Cell* **38:** 871-878
61. Chang A C Y, Cohen S N (1978) *J Bacteriol* **134:** 1141-1156
62. Yavachev L, Ivanov I (1988) *J Theor Biol* **131:** 235-141
63. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) *Gene* **33:** 103-119
64. Lin-Chao S, Wen-Tsuan C, Ten-Tsao W (1992) *Mol Microbiol* **6:** 3358-3393
65. Helmer-Citterich M, Anceschi M M, Banner D W, Cesareni G (1988) *EMBO J* **7:** 557-566
66. Eguchi Y, Tomizawa J (1990) *Cell* **60:** 199-209
67. Podhajska A J (1980) *Postępy Mikrobiologii* **XIX:** 183-208
68. Dodson M, Echols H, Wickner S, Alfano C, Mensa-Wilmot K, Gomes B, LeBowitz J, Roberts J D, McMacken R (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83:** 7638-7642
69. Alfano C, McMacken R (1989) *J Biol Chem* **264:** 10699-10708
70. Biswas S B, Biswas E E (1987) *J Biol Chem* **262:** 7831-7838
71. Liberek K, Georgopoulos C, Żylicz M (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 6632-6636
72. Alfano C, McMacken R (1989) *J Biol Chem* **264:** 10709-10718
73. Żylicz M, Ang D, Liberek K, Georgopoulos C (1989) *EMBO J* **8:** 1601-1608
74. Żylicz M (1993) *Phil Trans R Soc Lond* **339:** 271-278
75. Żylicz M, Ang D, Liberek K, Yamamoto T, Georgopoulos C (1988) *Biochim Biophys Acta* **951:** 344-350
76. Dove W F, Hargrove E, Ohashi M, Haugli F, Guha A (1969) *Japan J Genet* **44:** (suppl. 1): 11-22
77. Wold M S, Mallory J B, Roberts J D, LeBowitz J H, McMacken R (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79:** 6176-6180
78. Mensa-Wilmot K, Seaby R, Alfano C, Wold M S, Gomes B, McMacken R (1989) *J Biol Chem* **264:** 2853-2861
79. Mensa-Wilmot K, Carroll K, Mc Macken R (1989) *EMBO J* **8:** 2393-2402
80. Lipińska B, Podhajska A, Taylor K (1980) *Biochem Biophys Res Commun* **92:** 120-126
81. Gottesman S, Gottesman M, Shaw J E, Pearson M L (1981) *Cell* **24:** 225-233
82. Matsubara K (1981) *Plasmid* **5:** 32-52
83. Wojtkowiak D, Georgopoulos C, Żylicz M (1993) *J Biol Chem* **268:** 22609-22617
84. Gottesman S, Clark W P, de Crecy-Legard V,

http://rcin.org.pl

Maurizi M R (1993) *J Biol Chem* **268:** 22618-22626
85. Bejarano I, Klemens Y, Schoulaker-Schwarz R, Engelberg-Kulka H (1993) *J Bacteriol* **175:** 7720-7723
86. Węgrzyn G, Pawłowicz A, Taylor K (1992) *J Mol Biol* **226:** 675-680
87. Pawłowicz A, Węgrzyn G, Taylor K (1993) *Acta Biochim Polon* **40:** 29-31
88. Szalewska A, Węgrzyn G, Taylor K (1994) *Mol Microbiol* **13:** 469-474
89. Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G (1994) *Biochem Biophys Res Commun*, **205:** 802-806
90. Stillman B (1994) *J Biol Chem* **269:** 7047-7050
91. Bell SP, Stillman B (1992) *Nature* (Lond) **357:** 128-134
92. Diffley JFX, Cocker JH (1992) *Nature* (Lond) **357:** 169-172
93. Leno GH, Downes CS, Laskey RS (1992) *Cell* **69:** 151-158
94. Cohen SN, Chang ACY (1977) *J Bacteriol* **132:** 734-737
95. Kues U, Stahl U (1989) *Microbiol Rev* **53:** 491-516
96. Figurski DH, Meyer RJ, Helinski DR (1979) *J Mol Biol* **133:** 295-318
97. Grinter NJ (1984) *Plasmid* **11:** 74-81
98. Kornacki JA, Firshein W (1986) *J Bacteriol* **167:** 319-326

Peptydowe kwasy nukleinowe — nowa grupa analogów DNA

Peptide nucleic acids — a new group of DNA analogues

CEZARY ŻEKANOWSKI*

Spis treści:

I. **Związki przeciwgenowe i antysensowne rozpoznają komplementarne sekwencje DNA i RNA**
II. **PNA — stabilność i specyficzność w jednej cząsteczce**
III. **PNA tworzą z kwasami nukleinowymi struktury dwu- i trójniciowe**
IV. **Podstawową strukturę PNA można modyfikować**
V. **Zastosowania PNA wynikają bezpośrednio z charakterystycznej struktury cząsteczkowej**
VI. **PNA jako cząsteczka antysensowna i przeciwgenowa**
VII. **Czy istniał „świat PNA"?**
VIII. **Perspektywy**

Contents:

I. **Antigene and antisense agents bind to complementary DNA and RNA sequences**
II. **PNA — stability and specifity in one molecule**
III. **PNA form double and triple helical structures with nucleic acids**
IV. **PNA basic structure could be modified**
V. **A characteristic structure suggests possible embodiments**
VI. **PNA: potential antigene and antisense agents**
VII. **Was there a „PNA world"?**
VIII. **Perspectives**

Wykaz stosowanych skrótów: PNA — peptydowe kwasy nukleinowe; ODN — oligodeoksynukleotydy; T_m — temperatura topnienia; ARMS — system amplifikacyjnego odwzorowywania mutacji; ACRS — sztucznie tworzone miejsca restrykcyjne; RFLP — polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

I. Związki przeciwgenowe i antysensowne rozpoznają komplementarne sekwencje DNA i RNA

W ciągu ostatnich lat zaprojektowano wiele związków chemicznych zdolnych do specyficznego i trwałego wiązania się z DNA i RNA. Oprócz oczywistego znaczenia w badaniu molekularnych mechanizmów rozpoznawania określonych sekwencji DNA, związki takie mogłyby mieć szereg zastosowań praktycznych. Przede wszystkim w rozwoju nowych technik biologii molekularnej, jak również we wprowadzaniu nowych metod terapeutycznych, polegających na modyfikowaniu stężenia wybranego białka czy RNA. Regulacja następuje na poziomie transkrypcji (działanie przeciwgenowe), bądź translacji (działanie antysensowne) [1].

W biologii molekularnej i diagnostyce molekularnej szczególne miejsce zajmują syntetyczne oligodeoksynukleotydy (ODN). Wykorzystuje się zwykle krótkie odcinki niezmodyfikowanego lub zmodyfikowanego na różne sposoby DNA. Wiele uwagi poświęcono również analogom kwasów nukleinowych np. fosfotiooctanowym, metylofosfotiooctanowym czy formacetalowym. Wszystkie one mają podobną budowę cząsteczkową, przypominającą rdzeń fosfocukrowy kwasów nukleinowych. Zachowują również zdolności do hybrydyzacji z komplementarnymi sekwencjami DNA i RNA poprzez parowanie zasad azotowych. Stabilność takich kompleksów jest bardzo różna. Jednak

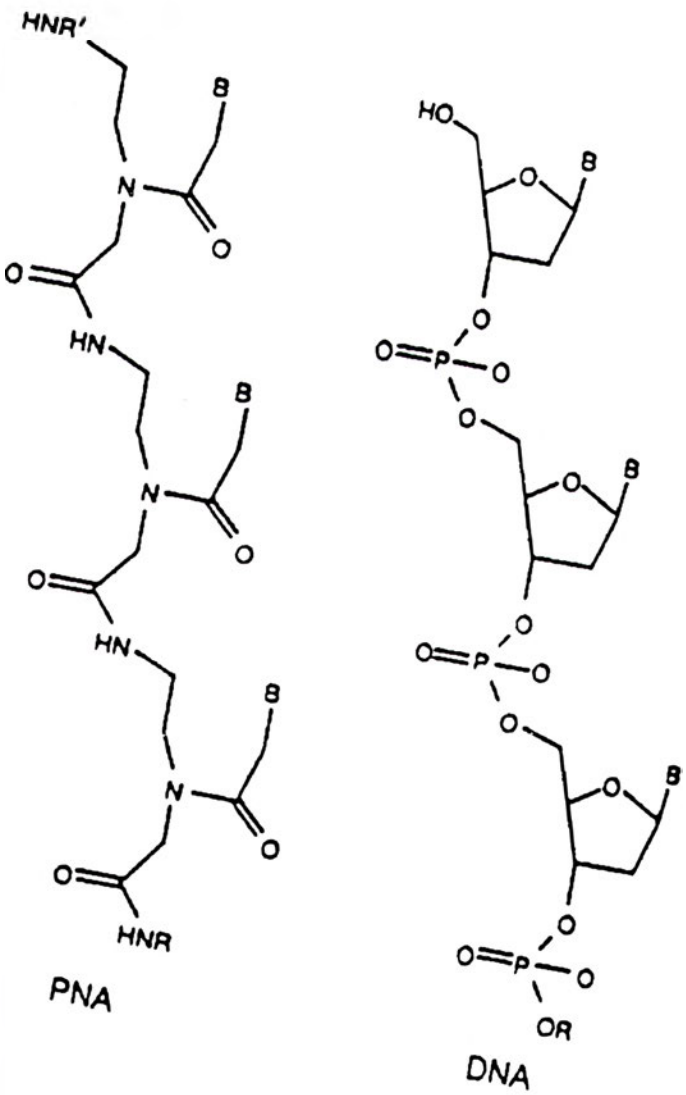
* Mgr, Zakład Genetyki Instytutu Matki i Dziecka 01-211 Warszawa ul. Kasprzaka 17A

http://rcin.org.pl

żaden z tych związków nie jest dostatecznie stabilny, rozpuszczalny w roztworach wodnych, niskotoksyczny, łatwo wchłaniany przez komórki, ani też łatwy do syntezy i chemicznej modyfikacji. Nie spełnia więc idealnych wymagań stawianych cząsteczkom o działaniu przeciwgenowym i antysensownym [2-5].

II. PNA — stabilność i specyficzność w jednej cząsteczce

W ostatnim czasie coraz większego znaczenia nabierają tzw. peptydowe kwasy nukleinowe (PNA), będące strukturalnymi i funkcjonalnymi analogami kwasów nukleinowych. Posiadają one nowe, zaskakujące właściwości, o potencjalnie bardzo szerokim zakresie zastosowań: od badań podstawowych, poprzez diagnostykę molekularną, antysensowną terapię przeciwwirusową i przeciwrakową, po aktywowanie wybranych odcinków DNA [6, 7].



Ryc. 1. Porównanie podstawowych struktur DNA i PNA. Najprostsze PNA składają się z powtarzalnych jednostek N-(2-aminoetylo)-glicynowych połączonych wiązaniami poliamidowymi. Zasady azotowe (na rycinie oznaczone literą B) przyłączone są do rdzenia cząsteczki łącznikami metylenokarbonylowymi. Na końcu cząsteczki PNA mogą znajdować się dwa różne ligandy (R i R').

Specyficzność cząsteczek PNA, podobnie jak DNA i RNA, określana jest przez sekwencję czterech zasad azotowych. Są one przyłączone jednak nie do rdzenia polifosfocukrowego, lecz poliamidowego, podobnego do występującego w peptydach (Ryc 1). Architektura cząsteczki PNA jest niejako repliką architektury cząsteczki DNA. Poliamidowy rdzeń PNA utrzymuje właściwą orientację i przestrzenne rozmieszczenie zasad, tak że możliwe jest tworzenie klasycznych par A:T, C:G. Ponieważ rdzeń poliamidowy nie posiada ładunku ujemnego — wiązania wodorowe są silniejsze niż w przypadku kwasów nukleinowych. Polarność cząsteczki PNA określa się tak, jak peptydu (koniec N i C). Na końcu N cząsteczki znajduje się zwykle przyłączona lizyna, co zwiększa rozpuszczalność i zmniejsza agregację cząsteczek w roztworze. Nie wpływa natomiast na stabilność termiczną dupleksów [8].

Najprostsze peptydowe kwasy nukleinowe syntezuje się z podjednostek N-(2-aminoetylo)glicynowych, serynowych, lub opartych na kwasie aminopentanowym lub aminoheksanowym. Do poliamidowego rdzenia, poprzez łączniki octanowe, przyłączone są zasady azotowe. Zarówno specyficzność, jak siłę oddziaływań pomiędzy DNA i komplementarnym PNA można zmieniać, odpowiednio modyfikując rdzeń cząsteczki oligomeru [9].

Synteza oligomerów PNA — ze względu na to, że monomery są nieczynne optycznie — jest wielokrotnie łatwiejsza niż odpowiednich oligonukleotydów. Proces oparty jest na dobrze znanej i zautomatyzowanej metodzie syntezy peptydów w fazie stałej wg Merrifielda [10].

Nazwa „peptydowe kwasy nukleinowe" jest więc z chemicznego punktu widzenia myląca — PNA nie są ani kwasami, ani naturalnymi peptydami. Podkreśla jednak fakt, że do syntezy wykorzystuje się rutynowe techniki stosowane w przemysłowej syntezie peptydów, a PNA są bliskimi analogami funkcjonalnymi i strukturalnymi kwasów nukleinowych.

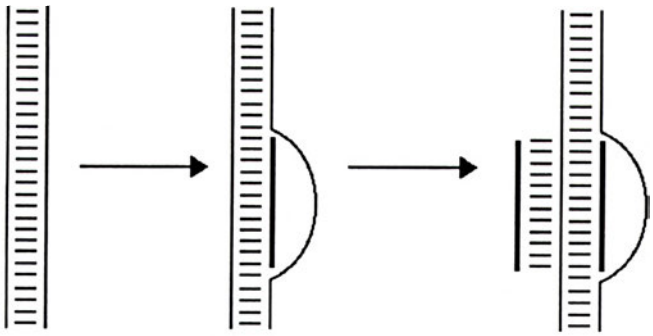
III. PNA tworzą z kwasami nukleinowymi struktury dwu- i trójniciowe

Oligomery PNA są zdecydowanie bardziej stabilne chemicznie niż ich oligonukleotydowe odpowiedniki. Wykazują również większe powinowactwo do komplementarnych sekwencji DNA i RNA [11].

Wzajemne ułożenie cząsteczek w kompleksie może być równoległe, gdy N koniec cząsteczki PNA znajduje się naprzeciw 5' końca DNA, bądź antyrównoległe: N koniec PNA naprzeciw 3' końca DNA.

Temperatura topnienia dupleksu oligoglicynowych dekamerów PNA: H-GTAGATCACT-L-Lys-NH_2 i H-AGTGATCTAC-L-Lys-NH_2 wynosi 67°C. Wartości T_m odpowiedniego dupleksu DNA-PNA w orientacji antyrównoległej, oraz dupleksu DNA-DNA wynoszą: 51°C i 38°C i 33.5°C (w 100 m M NaCl) [12, 13].

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Uproszczony schemat przedstawiający powstawanie wypętlonego obszaru jednoniciowego w DNA (pętla D). Oligomery PNA łączące się z komplementarną sekwencją DNA zaznaczono pogrubioną linią.

W przypadku PNA opartego na rdzeniu oligoglicynowym temperatura topnienia kompleksu H-T_{10}-Lys-NH_2: $(dA)_{10}$ wynosi 72°C, w porównaniu z 23°C dla odpowiedniego dupleksu oligodeoksyrybonukleinowego. Powodem tak dużej stabilności homopirymidynowych kompleksów PNA/DNA jest powstawanie trójniciowej struktury $(PNA)_2$/DNA, w której jedna nić DNA wiąże dwie cząsteczki PNA. Struktura stabilizowana jest trzema rodzajami oddziaływań: klasycznym parowaniem zasad, wiązaniami Hoogstena oraz oddziaływaniami van der Waalsa pomiędzy dwoma niepolarnymi rdzeniami poliamidowymi PNA. Struktury trójniciowe wykazują helikalną konformację prawoskrętną, bardzo przypominającą konformację trójniciowych kompleksów DNA.

Powstawanie struktur trójniciowych pomiędzy PNA i dwuniciowym DNA może następować poprzez mechanizm „odsuwania nici" (*strand displacement*), z utworzeniem stabilnej pętli D (patrz Ryc 2). Strukturę taką oznacza się skrótem: $(PNA)_2$/DNA, DNA). W roztworach o wysokiej sile jonowej, stabilizujących strukturę dwuniciową DNA, prawdopodobieństwo powstawania pętli D jest zdecydowanie mniejsze.

Ponieważ rdzeń cząsteczki PNA jest nieczynny optycznie, PNA wiąże się w obu orientacjach z komplementarnymi sekwencjami kwasu nukleinowego. Wydaje się jednak, że preferowana jest orientacja równoległa [14].

Stabilna struktura trójniciowa powstaje wtedy, gdy sekwencja DNA komplementarna do PNA zawiera wyłącznie pirymidyny. Istnieją jednak wskazówki, że struktury takie mogą powstawać również przy mieszanym składzie zasad cząsteczki PNA. Jeżeli tak jest istotnie, to PNA mogło by być wykorzystane do stabilnego wiązania się z dowolnymi sekwencjami w genomie [15].

Zarówno struktury trój-, jak i dwuniciowe, badane metodą dichroizmu kołowego, wykazują konformację bardzo zbliżoną do konformacji dupleksów DNA/DNA i DNA/RNA. Dane otrzymane z pomiarów efektu hiperchromowego i kinetyki hybrydyzacji PNA-DNA sugerują, że struktura jednoniciowego PNA jest identyczna ze strukturą jednoniciowego DNA. Rdzeń cząsteczki PNA przyjmuje konformację helikalną, stabilizowaną m.in. wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi między protonem grupy amidowej, a grupą COO^- kolejnych monomerów. W odróżnieniu od DNA, w których skręt helisy warunkowany jest konformacją deoksyrybozy, helikalność dupleksów PNA-PNA wynika również z wzajemnego oddziaływania zasad azotowych [16].

PNA o mieszanym składzie zasad tworzą prawoskrętne struktury dwuniciowe, stabilizowane klasycznymi wiązaniami Watsona-Cricka. Nić PNA przyjmuje konformację bardzo zbliżoną do klasycznej struktury B, z C2'-endo deoksyrybozą. W dupleksach PNA-DNA i PNA-RNA (odmiennie niż w strukturach trójniciowych) preferowana jest orientacja antyrównoległa cząsteczek. Stabilność termiczna powstających cząsteczek jest również większa niż odpowiadających im dwuniciowych struktur DNA/DNA czy RNA/DNA. Jest to być może wynikiem zarówno niepolarnego charakteru rdzenia cząsteczki PNA, jak również istnienia wiązań wodorowych między podjednostkami amidowymi PNA [16, 17].

Można przyjąć, że w roztworach o fizjologicznych siłach jonowych dupleksy DNA/PNA są o około 1.0-1.5°C bardziej stabilne w porównaniu z odpowiadającymi im dupleksami DNA/DNA (w roztworach o wyższych siłach jonowych różnica ta zanika). Ponadto, wprowadzenie pojedynczej, niesparowanej pary zasad do dupleksu PNA-DNA o orientacji antyrównoległej powoduje o wiele większe zmniejszenie się stabilności termicznej takiej struktury, niż w odpowiadającym jej dupleksie DNA-DNA. Na przykład w przypadku dupleksu DNA i dekameru PNA wartość T_m zmniejsza się o około 12°C na każdą niesparowaną zasadę. Wydaje się, że wydajność tworzenia struktur trójniciowych zależy również od położenia i typu niesparowanej zasady [18].

Zasadniczą i unikatową cechą PNA jest więc zdolność tworzenia wyjątkowo stabilnych struktur z komplementarnymi sekwencjami kwasów nukleinowych. Żaden z istniejących związków opartych na schemacie oligonukleotydu nie tworzy tak stabilnych kompleksów.

IV. Podstawową strukturę PNA można modyfikować

Duże znaczenie dla specyficzności oddziaływań PNA-DNA ma właściwa odległość między zasadami w PNA. Na przykład rozszerzenie podstawowej jednostki glicynowej grupą metylenową, czy przedłużenie łącznika wiążącego zasady azotowe z rdzeniem, prowadzi do znacznego obniżenia powinowactwa oligomeru do komplementarnej sekwencji DNA. Zachowaniu ulega natomiast specyficzność tego oddziaływania. Pojedyncze, tak zmodyfikowane monomery mogą być włączane do oligomerów glicynowych PNA, zmieniając w zaplanowany i stopniowy sposób siłę wiązania.

http://rcin.org.pl

Odwrócenie jednego z wiązań amidowych między podjednostkami PNA nie zmienia odległości sąsiadujących zasad i nie zmienia również T_m. Cząsteczka taka jednak łatwiej tworzy trójłańcuchowe struktury w orientacji antyrównoległej, niż równoległej. Wprowadzanie zamiast cząsteczki nieczynnej optycznie glicyny, aminokwasów występujących w formach D i L (np. alaniny), pozwala na kontrolowanie kierunku wiązań w szkielecie syntezowanej cząsteczki [19-21]. Umożliwia również wykorzystanie specyficznych cech różnych aminokwasów np. oddziaływania tryptofanu z G czy zmiany ładunku rdzenia PNA [21].

Tworząc szkielet peptydowy z różnych podjednostek aminokwasowych można modyfikować różne cechy cząsteczki PNA: specyficzność i siłę wiązania, zdolność do penetracji do wnętrza komórki, rozpuszczalność, stopień oporności na peptydazy, zdolność rozpoznawania różnych form konformacyjnych helisy DNA (Z, B), trzeciorzędowych struktur RNA itd.

Możliwych jest wiele modyfikacji podstawowego rdzenia cząsteczki PNA. Zmieniać można na przykład jego sztywność, hydrofobowość czy ładunek elektryczny. Łatwo przyłączać również znaczniki i różnego rodzaju ligandy do wybranego końca cząsteczki PNA.

V. Zastosowania PNA wynikają bezpośrednio z charakterystycznej struktury cząsteczkowej

W fizjologicznej sile jonowej dupleksy PNA/DNA i PNA/RNA są o około 1.0-1.5°C na parę zasad stabilniejsze, niż odpowiadające im dupleksy DNA/DNA i DNA/RNA. Znacznie wyższa jest zdolność rozróżniania niedopasowania sekwencji hybrydów PNA/DNA, niż hybrydów DNA/DNA [22].

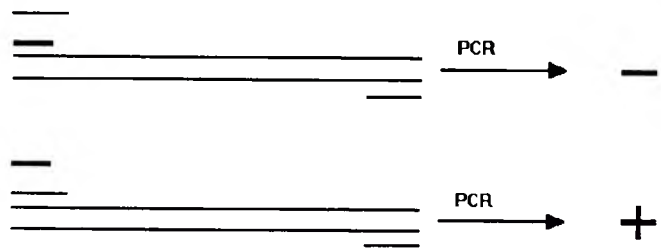
PNA można więc wykorzystywać podobnie jak tradycyjne oligonukleotydy, np. jako znakowane nieizotopowo sondy molekularne. Ze względu na wyższą siłę przyłączenia oligomerów PNA do komplementarnych sekwencji DNA możliwe zapewne będzie skrócenie czasu hybrydyzacji, podwyższenie jej specyficzności i zastosowanie krótszych sond oligonukleotydowych. To ostanie może mieć znaczenie przy poszukiwaniu w bibliotekach genowych sekwencji, znanych jedynie z analizy sekwencji białka.

Oligomery PNA można będzie wykorzystać zapewne także do fizycznego mapowania pojedynczych cząsteczek DNA. Jeżeli unieruchomiony w formie liniowej DNA hybrydyzowany będzie z wyznakowanymi różnokolorowymi znacznikami fluorescencyjnymi sondami PNA, to na odcinkach komplementarnych powstaną łatwo rozróżnialne pętle D [6].

Ponieważ enzymy restrykcyjne nie rozpoznają i nie przecinają cząsteczek PNA, możliwe jest blokowanie miejsc restrykcyjnych poprzez hybrydyzację PNA do DNA w obrębie danej sekwencji lub tuż przed nią. „Wygaszanie" wybranych miejsc restrykcyjnych jest precyzyjne, tak że miejsca sąsiednie, odległe o kilka nukleotydów, nie są blokowane. Metoda ta może znacznie ułatwić subklonowanie fragmentów DNA w wektorach [23].

W podobny sposób można hamować transkrypcję, translację czy odwrotną transkrypcję wybranych sekwencji DNA. Jest to możliwe dzięki stosunkowo dużej stabilności kompleksów $(PNA)_2$/DNA, w odróżnieniu od niestabilnych w warunkach fizjologicznych trójniciowych kompleksów DNA-DNA. Hamowanie procesu elongacji transkrypcji przy pomocy oligonukleotydów możliwe jest dopiero po kowalencyjnym przyłączeniu oligonukleotydu do matrycy.

Odmianą wymienionych technik jast tzw. „wykluczanie startera" (PCR *clamping*, blokowanie reakcji PCR) [22]. Technika ta może zastąpić różnego rodzaju modyfikacje PCR, wykorzystywane w diagnostyce medycznej do rozróżniania allelu zmutowanego od normalnego, np. ARMS (*amplification refractory mutation system*), ACRS (*artificially created restriction site*) czy PCR RFLP (Ryc 3).



Ryc. 3. Schemat obrazujący technikę „wykluczania startera". Jeżeli we fragmencie genu poszukuje się określonej mutacji punktowej, należy zsyntezować oligomer PNA komplementarny do sekwencji niezmutowanej. „Starter" PNA (zaznaczona pogrubioną linią) wiąże się z komplementarną sekwencją DNA z wyższą siłą i specyficznością niż odpowiadający mu oligometr DNA, nie jest jednak wydłużany przez polimerazę Taq. Reakcję PCR z DNA pacjenta przeprowadza się ze „starterem" PNA oraz dwoma starterami DNA, z których jeden jest komplementarny do sekwencji zmutowanej. Powstający u pacjentów bez mutacji dupleks PNA-DNA skutecznie uniemożliwia reakcję PCR. Technika ta pozwala rozróżnić matryce różniące się tylko jednym nukleotydem.

Reakcja wygaszania PCR może zachodzić również wtedy, gdy sekwencja komplementarna do oligomeru PNA położona jest dalej od sekwencji komplementarnej do jednego ze starterów. W takim przypadku blokowanie może zachodzić albo poprzez „wykluczanie startera", albo „hamowanie reakcji wydłużania". Jeżeli miejsca rozpoznawane przez PNA i DNA nakładają się, wtedy — ze względu na wyższą stabilność dupleksu PNA-DNA — ma miejsce wykluczanie startera. Jeżeli miejsce rozpoznawane przez oligomer PNA położone jest w pewnej odległości od miejsca startu PCR, ma miejsce hamowanie elongacji. Jeżeli natomiast miejsce rozpoznawane przez PNA położone jest w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca startu reakcji PCR — blokowanie polega na ograniczaniu dostępu polimerazy Taq czy też zapobieganiu inicjacji wydłużania startera DNA.

http://rcin.org.pl

Oligomery PNA można wykorzystać również do precyzyjnego wyznaczania miejsca cięcia nukleazą S1. Wypętlone odcinki DNA podatne są także na działanie czynników utleniających [24, 25].

Wszystkie przebadane do tej pory rodzaje PNA tworzą stabilne kompleksy z dwuniciowym DNA w niskiej sile jonowej (tj. < 50 mM Na^+ lub < 2 mM Mg^{2+}). Raz utworzone połączenie jest jednak na tyle silne, że stężenie soli w roztworze może zostać podniesione do wartości wymaganych np. do trawienia enzymami restrykcyjnymi czy transkrypcji [7]. Ponadto, duża łatwość modyfikowania podstawowej struktury cząsteczki PNA pozwala mieć nadzieję na szybkie opracowanie cząsteczki wiążącej się stabilnie z dwuniciowym DNA w warunkach fizjologicznych.

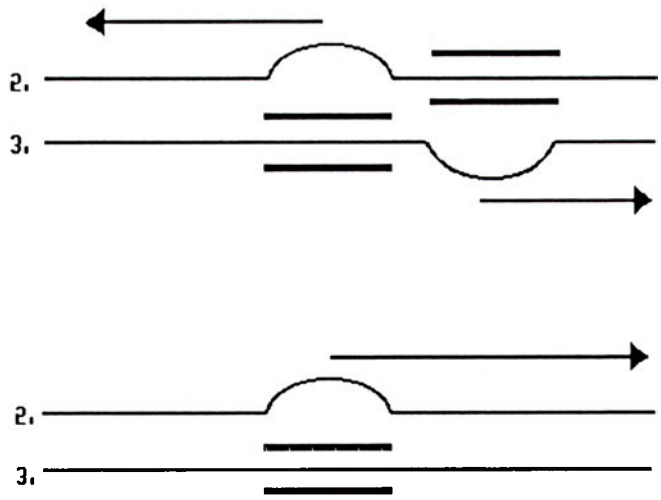
Z ostatnio opublikowanych prac wynika, że PNA mogą pełnić funkcję nie tylko inhibitorów lecz również inicjatorów transkrypcji [25]. Wiadomo, że transkrypcja może być inicjowana w miejscu utworzenia dupleksu DNA/RNA z wypętloną drugą nicią DNA. Transkrypcja inicjowana jest na łańcuchu RNA. Podobne działanie mają trójniciowe kompleksy $(PNA)_2$/DNA, DNA, z tym że transkrypcja inicjowana jest w kilku przypadkowych miejscach pętli D i zależy wprost proporcjonalnie od jej wielkości. Transkrypcja zachodzi z większą wydajnością i zazwyczaj w obu kierunkach, gdy stosuje się dwa, położone blisko siebie na przeciwległych niciach DNA, miejsca wiązania oligomerów PNA. Powstają wtedy dwie pętle D w konfiguracji cis. PNA aktywują transkrypcję również w eukariotycznym układzie do transkrypcji *in vitro*, zawierającym ekstrakt z jąder śledziony szczura.

Wydaje się jednak, że działanie inicjujące transkrypcję zależy również od sekwencji otaczających miejsca wiązania oligomerów PNA [25] (Ryc 4).

Oba te, przeciwstawne procesy, można prawdopodobnie kontrolować projektując odpowiednie cząsteczki PNA. Do zahamowania transkrypcji wystarcza pojedyncza cząsteczka PNA, o niewielkiej długości (około 10 jednostek). Do aktywacji potrzeba kilku dłuższych, „współdziałających" ze sobą cząsteczek PNA. Ponadto zahamowanie transkrypcji następuje na nici DNA do której przyłącza się oligomer PNA — odmiennie więc niż aktywacja.

VI. PNA jako cząsteczka antysensowna i przeciwgenowa

Do modulowania ekspresji genów wykorzystuje się najczęściej naturalne lub zmodyfikowane na różne sposoby ODN, tworzące dupleksy z komplementarnymi sekwencjami RNA lub struktury trójniciowe z dsDNA. W układach *in vitro* można blokować transkrypcję, odwrotną transkrypcję i translację, Jednak efektywne i trwałe blokowanie uzyskuje się dopiero po kowalencyjnym przyłączeniu ODN do sekwencji docelowej. Problem stanowi nadal uzyskanie cząsteczek o wystarczającej efektywności, specyficzności,



Ryc. 4. Schemat przedstawiający inicjację transkrypcji z pętli D. Linią pogrubioną zaznaczono oligomery PNA. Strzałka wskazuje możliwe kierunki, zainicjowanej w obrębie pętli D, transkrypcji.

trwałości i niskiej toksyczności, użytecznych w układach *in vivo* [26].

Do tej pory opublikowano jedynie kilka prac przedstawiających działanie antysensownych PNA.

Doświadczenia przeprowadzone w układach transkrypcji *in vitro* wykazały, że w miejscu przyłączenia oligomeru PNA następuje zahamowanie translacji. Nie wiadomo dokładnie czy w fizjologicznych siłach jonowych powstają stabilne struktury trójniciowe. Ponieważ jednak stabilność dupleksów RNA z PNA o mieszanym składzie zasad jest większa niż DNA-PNA, wydaje się więc że również struktury dwuniciowe hamują proces translacji.

Z opublikowanej w 1992 r. pracy wynika, że wprowadzona metodą mikroiniekcji do komórki ssaczej cząsteczka PNA o długości 15 lub 20 jednostek, zawierająca A, T i C hamuje powstawanie antygenu T SV40. PNA oddziaływuje najprawdopodobniej z mRNA antygenu. Ze względu na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów efektywne tworzenie trójniciowych struktur z DNA jast mało prawdopodobne [27]. PNA wiąże się natomiast z jednoniciowym DNA lub RNA niezależnie od stężenia jonów [9].

W podobnych warunkach 19-nukleotydowy, naturalny ODN nie hamował ekspresji antygenu T.

Duże nadzieje wiąże się również z wykorzystaniem PNA o zmodyfikowanym szkielecie cząsteczkowym, do wygaszania aktywności genów na etapie transkrypcji. Struktury $(PNA)_2$/DNA, w odróżnieniu od trójniciowych struktur oligonukleotydowych, hamują transkrypcje na etapie elongacji.

Pewną przeszkodę stanowi stosunkowo mała zdolność przenikania cząsteczek PNA przez błony komórkowe. Również tu pomocna będzie zapewne duża plastyczność podstawowego schematu budowy cząsteczek PNA oraz możliwość łączenia ich z odpowiednio dobranymi ligandami, ułatwiającymi np. penetrację do wybranych komórek. Tak zmodyfikowane PNA

http://rcin.org.pl

stanowić mogą doskonałe narzędzie do badania zjawisk fizjologicznych na poziomie komórkowym [28].

VII. Czy istniał „świat PNA"?

Jedna ze stosunkowo popularnych hipotez dotycząca powstania życia na Ziemi mówi, że pierwsze organizmy były samoreplikującymi się cząsteczkami RNA. „Świat RNA" stanowiłby pomost między światem prebiotycznym a współczesnymi organizmami, których materiałem genetycznym jest niezdolny do samodzielnego namnażania DNA [29]. RNA jest jednak cząsteczką nietrwałą i trudno wyobrazić sobie w jaki sposób przetrwałby w ekstremalnych, prebiotycznych warunkach [30].

Niedawno P. E. Nielsen zaproponował, że związki analogiczne do PNA — nie zawierające fosforanów ani cukrów — mogły przenosić informację dziedziczną w sposód podobny do kwasów nukleinowych [31].

Z klasycznych doświadczeń Millera wynika, że zarówno aminokwasy, jak zasady azotowe mogą być syntezowane w warunkach istniejących przypuszczalnie w „pierwotnym bulionie", na początku ewolucji organicznej. Podstawowa jednostka takiego „pre-PNA" oparta mogłaby być na kwasie dwuaminomasłowym, kwasie hydroksyoctowym czy ornitynie. Związki tego typu tworzyłyby PNA o nieco mniejszej stabilności termicznej, łatwiejsze do namnażania i „transkrypcji" [31].

Większe problemy stwarza jednak zrozumienie w jaki sposób powstały cukry, i w jaki sposób jeden rodzaj izomeru optycznego zdominował świat istot żywych. Jedna z możliwych hipotez zakłada, że czynne optycznie krystalicznie minerały odegrały zasadniczą rolę w tym procesie: pełniąc rolę zarówno podłoża, jak katalizatora dla procesów syntezy polimerów RNA [32].

PNA są cząsteczkami nieczynnymi optycznie. Jednak przyjmowanie np. prawoskrętnej struktury helikalnej mogła ułatwiać adsorbcja na czynnych optycznie minerałach. Kompleksy takie mogłyby stanowić stabilną matrycę służącą do syntezy aktywnych katalitycznie cząsteczek RNA — umożliwiające z kolei np. syntezę wiązań peptydowych [33, 34].

Przedstawiona hipoteza nie jest oczywiście poparta żadnymi danymi eksperymentalnymi. Jednak sugestia, że pierwotny materiał genetyczny, analogiczny do współczesnych kwasów nukleinowych mógł mieć odmienną strukturę chemiczną otwiera nowe możliwości badawcze.

VIII. Perspektywy

PNA łączą w sobie kilka niezwykle użytecznych cech: wysoką specyficzność oddziaływania z komplementarnymi sekwencjami kwasów nukleinowych, dużą stabilność powstających dwu- i trójniciowych kompleksów, znaczne możliwości modyfikowania podstawowego szkieletu cząsteczki, oporność na działanie nukleaz i proteaz [35]. Wszystkie te cechy przyczynią się zapewne do bardzo szerokiego wykorzystania PNA [36-38].

Artykuł otrzymano 28 października 1994 r.
Zaakceptowano do druku 29 listopada 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Crooke ST, Lebleu B (1993) W: Antisense Research and Applications, CRS Press
2. Crook ST (1992) *Curr Opinion Biotechnol* **3**: 656-661
3. Szklarczyk A (1994) *Post Bioch* **40**: 166-174
4. Bohun E, Twardowski T (1994) *Post Bioch* **40**: 18-21
5. Chubb JM, Hogan ME (1992) *Trends Biotechnol* **10**: 132-136
6. Nielsen PE, Egholm M, Buchartd O (1994) *Bioconjugate Chem* **5**: 3-7
7. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (1993) *Anti-Cancer Drug Des* **8**: 53-63
8. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (1991) *Science* **254**: 1497-1501
9. Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE, Berg RH (1992) *J Am Chem Soc* **114**: 1895-1897
10. Dueholm KL, Egholm M, Behrens C, Christensen L, Hansen HF, Vulpius T, Petersen KH, Berg RH, Nielsen PE, Buchardt O (1994) *J Organic Chem* **59**: 5767-5773
11. Almarsson O, Briuce TC, Kerr J, Zuckermann RN (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**: 7518-7522
12. Wittung P, Nielsen PE, Burchardt O, Egholm M, Norden B (1994) *Nature* (Lond) **368**: 561-563
13. Egholm M, Burchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier S, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE (1993) *Nature* (Lond) **365**: 566-568
14. Almarsson O, Bruice T, Kerr J, Zuckermann RN (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**: 7518-7522
15. Patel DJ (1993) *Nature* (Lond) **365**: 490-491
16. Almarsson O, Bruice TC (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**: 9542-9546
17. Leijon M, Graslunnd A, Nielsen PE, Buchardt O, Norden O, Kristensen SM, Eriksson M (1994) *Biochemistry* **33**: 9820-9825
18. Pfeffer NJ, Hanvey JC, Bisi JE, Thomson SA, Hassman F, Noble SA, Babiss LE (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**: 10648-10652
19. Dueholm KL, Petersen KH, Jensen DK, Egholm M, Nielsen PE, Buchardt O (1994) *Bioorg Med Chem Lett* **4**: 1077-1080
20. Lagriffoul PH, Egholm M, Nielsen PE, Berg RH, Buchardt O (1994) *Bioorg Med Chem Lett* **4**:1081-1082
21. Kosynkina L, Wang W, Liang TC (1994) *Tetrahedron Lett* **35**: 5173-5176
22. Orum H, Nielsen PE, Eghom M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 5332-5336
23. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 197-200
24. Demidov V, Frank-Kamenetskij MD, Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 2103-2108
25. Mollegaard NE, Buchardt O, Egholm M, Nielsen PE (1994) *Proc Natl Acad Sci* **91**: 3892-3895
26. Ratajczak MZ, Skórski T (1994) *Post Biol Kom* **21**: 177-196
27. Hanvey JC, Peffer NJ, Bisi JE, Thomson SA, Cadilla R, Josey JA, Ricca DJ, Hassman CF, Bonham MA, Au KG, Carter SG, Bruckenstein DA, Boyd AL, Noble SA, Babiss LE (1992) *Science* **258**: 1481-1485
28. Brown SC, Thomson SA, Veal JM, Devies GD (1994) *Science* **265**: 777-780
29. Orgel LE, Crick FHC (1993) *FASEB J* **7**: 238-239

http://rcin.org.pl

30. de Duve Ch (1991) W: Bleuprint for a Cell. The Nature and Origin of Life. Neil Patterson, Burlington
31. Nielsen PE (1993) *Origins Life Evol Biosph* **23**: 323-327
32. Lahaw N, White DH (1980) *J Mol Evol* **16**: 11-21
33. Noller HF, Hoffarth V, Zimniak L (1992) *Science* **256**: 1416-1419
34. Petsko GA (1992) *Science* **256**: 1403-1404
35. Domidov VV, Potman VN, Frank-Kamenetskij MD, Egholm M, Buchardt O, Sonnichsen SH, Nielsen PE (1994) *Biochem Pharmacol* **48**: 1310-1313
36. Buchardt O, Egholm M, Berg RH, Nielsen PE (1993) *Trends Biotechnol* **11**: 384-386
37. Nielsen PE (1991) *Bioconjugate Chem* **2**: 1-12
38. Coull A (1994) *Int Biotech Lab* **5**: 16

Podłoże molekularne niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej

Molecular basis of steroid 21-hydroxylase deficiency

PIOTR KUPCZYK[1],
PIOTR SAWIŃSKI[2],
WIESŁAW H. TRZECIAK[3]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Synteza hormonów sterydowych w korze nadnerczy
II-1. Źródła substratu do syntezy hormonów sterydowych
II-2. Enzymy biorące udział w syntezie hormonów sterydowych w korze nadnerczy
II-3. Hormonalnie czynne produkty syntezy sterydów w komórkach kory nadnerczy
III. Cytochromy P450 biorące udział w hydroksylacji sterydów
III-1. Cytochrom $P450_{21}$
IV. Zespół nadnerczowo-płciowy spowodowany niedoborem 21-hydroksylazy sterydowej
IV-1. Konsekwencje metaboliczne niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej
IV-2. Postacie kliniczne
IV-3. Badania hormonalne
IV-4. Częstość występowania
V. Budowa genów CYP21
VI. Strategia badań mutacji genów CYP21
VI-1. Metody stosowane do badań genu CYP21B
VI-2. Inne metody, które mogą zostać wykorzystane do wykrywania mutacji genów CYP21
VII. Wyniki badań mutacji genu CYP21B
VIII. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. Synthesis of steroid hormones in adrenal cortex
II-1. Sources of substrate for adrenal steroid synthesis
II-2. Enzymes involved in steroid hormone synthesis in the adrenal cortex
II-3. Hormonally active products of steroid synthesis within the adrenal cells
III. Cytochromes P450 involved in steroid hydroxylation
IV. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency
IV-1. Metabolic consequences of steroid 21-hydroxylase deficiency
IV-2. Clinical forms
IV-3. Hormonal studies
IV-4. The incidence
V. Structure of CYP21 genes
VI. Strategy of investigations on mutations in CYP21 genes
VI-1. Methods used in studies of CYP21 genes
VI-2. Other methods which can be used in detection of CYP21 genes mutations
VII. The results of investigations on mutations of CYP21B gene
VIII. Concludnig remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ACAT — acylotransferaza acylo-CoA: cholesterol (2.3.1.26); ACTH — kortykotropina; Bf — gen czynnika properdyny Bf; C2 — gen komponenty drugiej układu dopełniacza; C4A i B — geny niealleliczne dla komponenty czwartej układu dopełniacza; cAMP — cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; CYP21A — pseudogen cytochromu $P450_{21}$; CYP21B — funkcjonalny gen cytochromu $P450_{21}$; CCM (*chemical cleavage method*) — metoda chemicznego rozbijania, DHEA— dehydroepiandrosteron; DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) elektroforeza w gradiencie denaturującym; EC — esteraza cholesterolowa (6.3.1.13); G11 — gen dotąd niescharakteryzowany; HDL (*high density lipoproteins*) — lipoproteiny o dużej gęstości; HLA (*human leucocytes antigens*) — antygeny leukocytów ludzkich; 3βHSD — dehydrogenaza 3-β-hydroksysterydowa/$^5\Delta$ izomeraza (1.1.1.145); 11β HSD — dehydrogenaza 11-β-hydroksysterydowa (1.1.1.146); kDa — kilodalton; kpz — 1000 par zasad; kz — 1000 zasad; LDL (*low density lipoproteins*) — lipoproteiny o małej gęstości; NK — postać nieklasyczna; PCR (*polymerase chain reaction*) — reakcja łańcuchowa polimerazy; $P450_{SCC}$ — cytochrom $P450_{SCC}$ (1.14.15.6); $P450_{11\beta}$ — cytochrom $P450_{11\beta}$ (1.14.15.4); $P450_{17\alpha}$

[1] Mgr, Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej AM; [2] lek. med., Katedra i Zakład Histologii i Embriologii AM, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; [3] prof. dr hab., Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań.

http://rcin.org.pl

— cytochrom $P450_{17\alpha}$ (1.14.99.9); $P450_{21}$ — cytochrom $P450_{21}$ (1.14.99.10); RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*) — polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych; SCP2 (*sterol carrier protein* 2) — białko przenoszące sterole; SEH (*sterol ester hydrolase*) — hydrolaza estrów sterolowych (3.1.1.13); SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) — polimorfizm konformacji jednej nici DNA; US — postać z utratą soli; WP — wirylizacja prosta; XA i XB — gen nieaktywny i gen funkcjonalny dla białka macierzy pozakomórkowej, tenascin-X; ZNP — zespół nadnerczowo-płciowy.

I. Wstęp

Hormony sterydowe kory nadnerczy należą do najważniejszych czynników regulujących przemiany metaboliczne w ogranizmie człowieka [1]. Mineralokortykoidy (aldosteron i dezoksykortykosteron) wpływają na gospodarkę wodno-elektrolitową pobudzając wchłanianie zwrotne jonów sodu oraz wydalanie jonów potasu w kanalikach dalszych nerki. Glukokortykoidy (kortyzol, kortyzon i kortykosteron) zwiększają intensywność glukoneogenezy oraz stężenie glukozy we krwi i glikogenu w wątrobie. Uwalniając kwasy tłuszczowe z tkanki tłuszczowej zwiększają zawartość lipidów w organizmie i zmieniają rozmieszczenie tej tkanki. Pobudzają także katabolizm białek i hamują syntezę kwasów nukleinowych w większości narządów z wyjątkiem wątroby, gdzie wzmagają produkcję RNA. Ponadto działają przeciwzapalnie i przeciwalergicznie oraz biorą udział w reakcji alarmowej (stress). Androgeny (dehydroepiandrosteron i androstendion) uczestniczą w procesie różnicowania zewnętrznych narządów płciowych. Testosteron i estrogeny są syntetyzowane w korze nadnerczy w niewielkich ilościach [2, 3].

Jednym z kluczowych enzymów, uczestniczących w syntezie hormonów sterydowych w korze nadnerczy, jest 21-hydroksylaza sterydowa, która składa się z dwóch białek: reduktazy cytochromu P450 oraz cytochromu $P450_{21}$. Niedobór cytochromu $P450_{21}$ stanowi najczęstszą przyczynę (około 90-95% przypadków) zespołu nadnerczowo-płciowego, dziedziczącego się autosomalnie recesywnie. Zespół nadnerczowo-płciowy jest jednym z najpospoliciej występujących zaburzeń funkcji wewnątrzwydzielniczej, stwierdzanych u ludzi. Może on być także wywołany niedoborem dehydrogenazy 3β-hydroksysterydowej i hydroksylazy 11β-hydroksysterydowej, te jednak rozpoznaje się bardzo rzadko [4, 5].

Badania przyczyn niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej doprowadziły do poznania sekwencji cDNA cytochromu $P450_{21}$ [6] i budowy genów kodujących ten cytochrom [7], a także do wykrycia mutacji odpowiedzialnych za ich nieprawidłowe funkcjonowanie [4, 5, 8, 9]. Stworzyło to szansę głębszego poznania patogenezy i udoskonalenia metod diagnostyki zespołu nadnerczowo-płciowego.

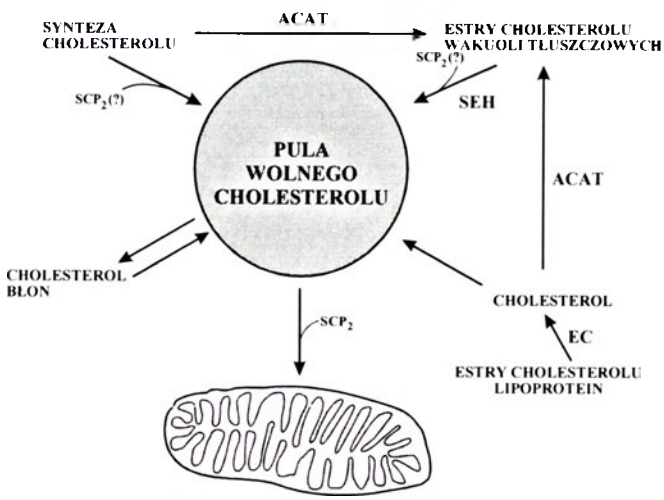
Celem pracy jest przedstawienie podłoża molekularnego oraz metod i wyników badań niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej. Przegląd piśmiennictwa z tej dziedziny poprzedza zwięzłe omówienie syntezy hormonów sterydowych kory nadnerczy oraz objawów klinicznych zespołu nadnerczowo-płciowego.

II. Synteza hormonów sterydowych w korze nadnerczy

II-1. Źródła substratu do syntezy hormonów sterydowych

Hormony kory nadnerczy są wytwarzane z cholesterolu, który może być syntetyzowany *de novo*, z acetylo-CoA, lub też pochodzić z lipoprotein osocza krwi. U człowieka, głównym źródłem cholesterolu wykorzystywanego do syntezy hormonów sterydowych są lipoproteiny o małej gęstości (*low density lipoproteins*, LDL) [10, 11], podczas gdy u szczura lipoproteiny o dużej gęstości (*high density lipoproteins*, HDL) [12, 13]. Wykazano, że pobieranie tych lipoprotein przez komórki wymaga specyficznych receptorów i następuje na drodze endocytozy adsorptywnej [11, 13].

Cholesterol, który nie został wykorzystany do syntezy hormonów sterydowych, jest magazynowany, w postaci estrów, w wakuolach tłuszczowych, skąd może być uwalniany przez hormono-zależną hydrolazę estrów sterolowych/lipazę (Ryc. 1). Procesy endocytozy lipoprotein i metabolizm estrów cholesterolu są kontrolowane przez kortykotropinę [14-17].



Ryc. 1. Potencjalne źródła wolnego cholesterolu do syntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy.
ACAT — acylotransferaza acyloCoA:cholesterol, SEH — hydrolaza estrów sterolowych, SCP_2 — białko przenoszące sterole, EC — lizosomalna esteraza cholesterolowa.

II-2. Enzymy biorące udział w syntezie hormonów sterydowych w korze nadnerczy

Z syntezą hormonów kory nadnerczy związanych jest kilka grup enzymów: (1) enzymy uczestniczące w biosyntezie cholesterolu; (2) enzymy biorące udział w estryfikacji i hydrolizie estrów cholesterolu: acylotransferaza acyloCoA: cholesterol (ACAT) i hydrolaza

http://rcin.org.pl

estrów sterolowych (SEH); (3) hydroksylazy sterydowe zawierające specyficzne cytochromy P450:desmolaza, 11β-hydroksylaza, 17α-hydroksylaza/17,20-liaza, aromataza i 21-hydroksylaza sterydowa; (4) dehydrogenazy: 3β-hydroksysterydowa/$^5\Delta$ izomeraza, 11β-hydroksysterydowa i 17-hydroksysterydowa [1].

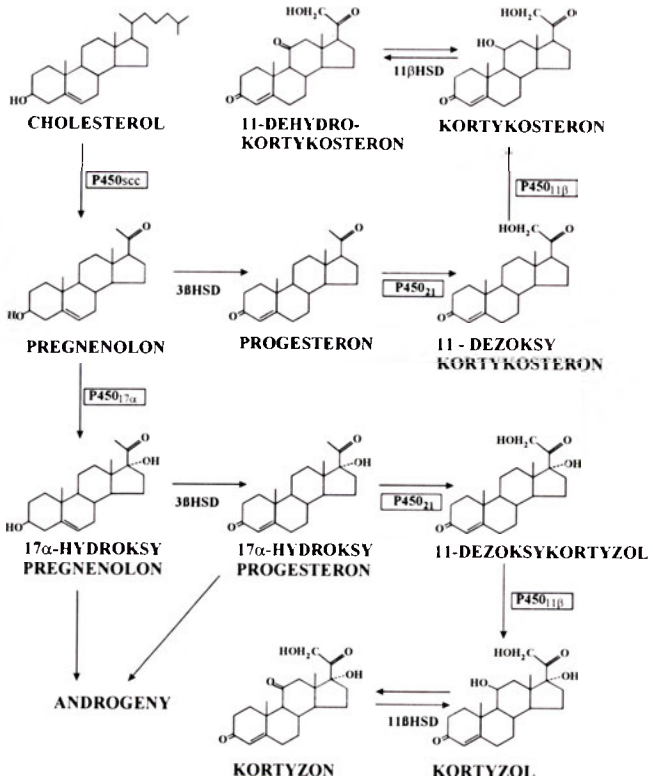
II-3. Hormonalnie czynne produkty syntezy sterydów w komórkach kory nadnerczy

Przemianę cholesterolu w hormony sterydowe zapoczątkowuje przeniesienie cholesterolu z cytosolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ułatwia to białko przenoszące sterole (*sterol carrier protein* — 2, SCP_2) [18], którego synteza jest indukowana przez ACTH [19].

W mitochondriach następuje hydroksylacja cholesterolu w pozycji 22R i 20α, której towarzyszy odszczepienie aldehydu izokapronowego z łańcucha bocznego. Reakcja hydroksylacji cholesterolu ogranicza wielkość syntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy i znajduje się pod kontrolą ACTH, który za pośrednictwem cAMP pobudza ekspresję genów kompleksu enzymatycznego desmolazy cholesterolu [20]. Powstaje pregnenolon, który opuszcza mitochondria i w siateczce śródplazmatycznej gładkiej ulega hydroksylacji w pozycji 17α pod wpływem 17α-hydroksylazy/17,20 liazy oraz przemianie w 17α-hydroksyprogesteron przy udziale dehydrogenazy 3β-hydroksysterydowej/$^5\Delta$ izomerazy. Progesteron i 17α-hydroksyprogesteron mogą być hydroksylowane w pozycji 21, przemieniając się w dezoksykortykosteron i dezoksykortyzol. Powstałe związki są transportowane do mitochondriów, gdzie dochodzi do ich kolejnej hydroksylacji w pozycji 11 β z utworzeniem odpowiednio kortykosteronu lub kortyzolu (Ryc. 2). Mechanizmy transportu produktów pośrednich pomiędzy miejscami lokalizacji enzymów uczestniczących w biosyntezie nie zostały dokładnie poznane.

W strefie kłębkowatej kory nadnerczy synteza aldosteronu odbywa się poprzez 18-hydroksykortykosteron produkowany z kortykosteronu pod wpływem specyficznej 11β-hydroksylazy. Inny szlak syntezy prowadzi poprzez pulę 18-hydroksylowanych produktów pośrednich, głównie 18-hydroksydezoksykortykosteron [21].

W syntezie androgenów nadnerczowych dochodzi do reakcji, katalizowanej przez 17α-hydroksylazę/17,20 liazę, w której zostaje usunięty łańcuch boczny 17α-hydroksypregnenolonu lub 17α-hydroksyprogesteronu. Powstają dehydroepiandrosteron (DHEA) lub androstendion. Androstendion może też powstawać z DHEA w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę 3β-hydroksysterydową/$^5\Delta$ izomerazę. Związek ten może następnie przekształcać się w estron przy udziale aromatazy, a ten pod wpływem dehydrogenazy 17β-hydroksysterydowej przemienia się w 17β-estradiol. Wydajność tych reakcji w korze nadnerczy jest mała [20].



Ryc. 2. Szlak syntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy. P450scc — desmolaza, P450$_{11\beta}$ — 11β-hydroksylaza sterydowa, P450$_{17\alpha}$ — 17α-hydroksylaza/17,20-liaza, P450$_{21}$ — 21-hydroksylaza sterydowa, 3βHSD — dehydrogenaza 3β-hydroksysterydowa/$^5\Delta$ izomeraza, 11βHSD — dehydrogenaza 11β-hydroksysterydowa.

III. Cytochromy P450 biorące udział w hydroksylacji sterydów

Cytochromy P450 są składnikami kompleksu enzymatycznego monooksygenaz zawierających hem. Uczestniczą w hydroksylacji sterydów, syntezie prostaglandyn, metabolizmie leków etc. i posiadają szereg wspólnych cech strukturalnych [22]. Obejmują one, stosunkowo dużego stopnia „konserwatywność" obszarów hydrofobowych oraz regionu, zlokalizowanego blisko końca karboksylowego cząsteczki i zawierającego resztę cysteiny, związaną koordynacyjnie z atomem żelaza grupy prostetycznej hemu. W łańcuchach peptydowych cytochromów, biorących udział w syntezie hormonów sterydowych, występują dodatkowo dwa krótkie regiony o dużej „konserwatywności", zlokalizowane pomiędzy aminokwasami 53-60 oraz 342-358. Regiony te przypuszczalnie uczestniczą w oddziaływaniu z substratem. Mitochondrialne cytochromy P450 posiadają na końcu aminowym sekwencję sygnałową, która kieruje nowozsyntetyzowane białko do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Mikrosomalne cytochromy P450 mają z kolei na końcu N sekwencję hydrofobową, która „zakotwicza" enzym w błonie siateczki śródplazmatycznej [4].

W korze nadnerczy z wewnętrzną błoną mitochondrialną związany jest cytochrom $P450_{SCC}$ wchodzący w skład kompleksu desmolazy i cytochrom $P450_{11\beta}$

http://rcin.org.pl

— składnik kompleku 11β- i 18-hydroksylaz [23-25]. Z siateczką śródplazmatyczną związany jest cytochrom $P450_{17\alpha}$ występujący w kompleksie 17α-hydroksylazy/17,20-liazy, cytochrom $P450_{21}$ — składnik 21-hydroksylazy sterydowej oraz cytochrom $P450_{arom}$ — składnik kompleksu aromatazy. Równoważniki redukcyjne, potrzebne w reakcjach hydroksylacji, pochodzą ze zredukowanego NADP. W przypadku cytochromów mikrosomalnych, elektrony są przenoszone na cytochrom P450 za pomocą flawoproteiny, reduktazy cytochromu P450 [26, 27]. W mitochondriach elektrony są przekazywane ze zredukowanego NADP na reduktazę adrenodoksyny, a następnie na adrenodoksynę i odpowiedni cytochrom P450 [28, 29].

III-1. Cytochrom $P450_{21}$

Cytochrom $P450_{21}$ należy do rodziny P450XXI [30], a cDNA, kodujący ten cytochrom, został sklonowany w 1985 r. przez White'a i wsp. [6]. Długość mRNA wynosi około 2 kz, natomiast łańcuch peptydowy białka cytochromu $P450_{21}$ zawiera 494 do 495 aminokwasów [31]. Substratami 21-hydroksylazy sterydowej, w skład której wchodzi ten cytochrom są progesteron i 17α-hydroksyprogesteron. Sekwencja aminokwasów cytochromu $P450_{21}$ wykazuje 36% zgodności z sekwencją cytochromu $P450_{17\alpha}$ (dotyczy to przede wszystkim odcinków w pobliżu końców aminowego i karboksylowego [31]), podczas gdy zgodność z sekwencjami cytochromów mitochondrialnych wynosi mniej niż 20%. Ponadto, kolejność aminokwasów cytochromu $P450_{21}$ wykazuje około 30% homologii z kilkoma wątrobowymi cytochromami P450, metabolizującymi leki [4]. Sugeruje to, że w trakcie ewolucji, cytochromy mikrosomalne, biorące udział w syntezie sterydów, powstały z cytochromów metabolizujących leki, a dopiero potem uległy zróżnicowaniu na odrębne enzymy.

IV. Zespół nadnerczowo-płciowy spowodowany niedoborem 21-hydroksylazy sterydowej

IV-1. Konsekwencje metaboliczne niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej

Wynikiem niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej jest zablokowanie przemian progesteronu i 17α-progesteronu w kortykosteron i kortyzol (Ryc. 2). Z powodu braku ujemnego sprzężenia zwrotnego na poziomie podwzgórza i przysadki mózgowej wzrasta wydzielanie ACTH, co prowadzi do nadmiernej stymulacji kory nadnerczy i jej przerostu. Gromadzące się prekursory (17α-hydroksypregnenolon i 17α-hydroksyprogesteron) przekształcane są w androgeny: DHEA i androstendion, z których, w wyniku przemiany pozanadnerczowej, powstaje testosteron. Wysokie stężenie androgenów powoduje u chłopców przedwczesne dojrzewanie płciowe, a u dziewcząt występowanie niektórych cech fenotypowych męskich (wirylizacja) i przyspieszenie wzrostu u obu płci [4].

IV-2. Postacie kliniczne

Niedobór 21-hydroksylazy sterydowej stanowi 90-95% przypadków zespołu nadnerczowo-płciowego [32-34]. Wyróżnia się trzy postacie kliniczne niedoboru tego enzymu: 1) wirylizację prostą (WP); 2) postać z utratą soli (US) — obie określane też jako forma „klasyczna"; 3) postać „nieklasyczną" (NK) [35, 36]. W postaci klasycznej, ze względu na obecność zaburzeń enzymatycznych w życiu płodowym, cechy zespołu nadnerczowo-płciowego występują już u noworodków. Szczególnie silnie wyrażone są one u noworodków płci żeńskiej, u których stwierdza się narządy płciowe obojnacze [34, 36]. W okresie pourodzeniowym obie płcie wykazują szybki wzrost z intensywnym rozwojem układu kostnego. Następuje jednak przedwczesne zamknięcie nasad kostnych. Dlatego ostateczny wzrost osoby dotkniętej defektem zwykle nie przekracza 155 cm. U chłopców dojrzewanie komórek nabłonka plemnikotwórczego jest nieprawidłowe i prowadzi do oligo- lub azoospermii. U dziewcząt budowa ciała staje się androidalna, a typ owłosienia męski. Nie rozwijają się sutki, brak jest miesiączek. Rozwój psychiczny i umysłowy nie są przyspieszone. Nasilenie objawów wirylizacji u dziewcząt może przejawiać się popędem homoseksualnym [36, 37].

U 75% chorych, u których rozpoznano postać klasyczną zespołu nadnerczowo-płciowego, obserwuje się utratę jonów sodu i wody, spowodowaną zaburzeniem syntezy aldosteronu. Groźne dla życia objawy kliniczne pojawiają się już w pierwszych dniach po urodzeniu. Obejmują one biegunkę i gwałtownie narastające odwodnienie (wskutek utraty jonów sodu i wody), a także zaburzenia w pracy serca (z powodu zwiększenia stężenia jonów potasu w komórkach) [36]. U pozostałych 25% chorych nie stwierdza się zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej, a na plan pierwszy wybijają się objawy nadmiaru androgenów.

Postaci nieklasycznej zwykle nie rozpoznaje się u noworodków i dzieci, gdyż objawy kliniczne choroby często nie ujawniają się w tym okresie. Konsekwencje nadmiaru androgenów mogą pojawiać się dopiero w późniejszym okresie życia [36].

Poszczególnym postaciom klinicznym zespołu nadnerczowo-płciowego towarzyszą określone haplotypy HLA. Postaci, przebiegającej z utratą soli, haplotyp HLA-AcBw47, DR 7 oraz Bw60. Postaci, której głównym objawem jest wirylizacja prosta, haplotyp HLA-Bw51, podczas gdy nieklasycznej postaci choroby, HLA-B14, DR1. Natomiast haplotyp HLA-A1, B8, DR3 nie towarzyszy objawom zespołu nadnerczowo-płciowego [4, 5].

http://rcin.org.pl

IV-3. Badania hormonalne

Badania hormonalne, pomocne w rozpoznawaniu zespołu nadnerczowo-płciowego obejmują oznaczenie stężenia 17α-hydroksyprogesteronu (17α-OHP) w osoczu krwi w godzinach rannych (ze względu na dobowy cykl wydzielania) oraz test stymulacji kortykotropiną [4, 37], polegający na oznaczeniu stężeń niektórych hormonów kory nadnerczy (pregnenolonu, 17α-hydroksypregnenolonu, 17α-OHP, 11-dezoksykortyzolu, dehydroepiandrosteronu i androstendionu) w surowicy krwi przed i 60 min. po dożylnym podaniu 0,25 mg ACTH. W przypadku niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej, stwierdza się podwyższony poziom podstawowy i nadmierne zwiększenie stężenia wszystkich hormonów sterydowych, proksymalnie do bloku metabolicznego. Stężenie wymienionych hormonów, zarówno podstawowe, jak i stymulowane, jest wyższe u pacjentów z postacią klasyczną zespołu nadnerczowo-płciowego, niż z formą nieklasyczną [38]. Oznaczanie wszystkich wymienionych hormonów sterydowych pozwala odróżnić niedobór 21-hydroksylazy sterydowej od niedoboru dehydrogenazy 3β-hydroksysterydowej/^{5}Δ-izmerazy i 11β-hydroksylazy [4, 37]. W rozpoznaniu ZNP pomocne jest także oznaczenie pregnandiolu, pregnantriolu i DHEA oraz w przypadku postaci zespołu z utratą soli, poziomu stężenia 17-ketosterydów, wydalanych z moczem [36].

IV-4. Częstość występowania

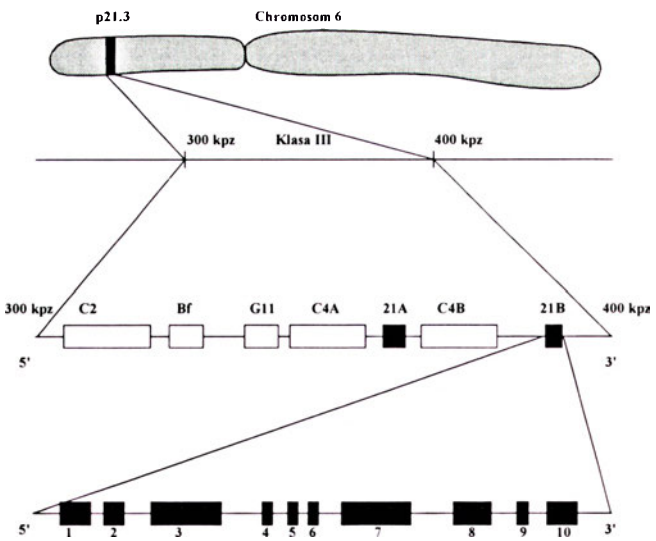
Częstość występowania postaci klasycznej zespołu różni się znacznie w badaniach przeprowadzonych wśród różnych populacji. M c K u s i c k [39] podaje, że średnia częstość homozygot i heterozygot, w populacji ogólnej, wynosi łącznie 1 : 5000. Jednakże, nowsze dane [40] wskazują na średnią częstość występowania na świecie wynoszącą 1 : 14199 żywych urodzeń dla homozygot i 1 : 60 dla heterozygot. Badania wykazały różnice między populacjami w poszczególnych krajach, a nawet ich regionach. Najwyższą częstość występowania postaci klasycznej zanotowano u Eskimosów Yupik oraz wśród ludności La Réunion (odpowiednio 1 : 282 i 1 : 2141). Z kolei populacja azjatycka cechowała się znacznie niższą częstością występowania tej postaci, wynoszącą 1 : 43764. Średnią częstość występowania postaci nieklasycznej wśród populacji rasy białej oszacowano na 1 : 100 [41]. W poszczególnych grupach etnicznych częstość ta wynosiła: 1 : 27 u Żydów Aszkenazyjskich, 1 : 53 u ludności latynoamerykańskiej, 1 : 63 u mieszkańców byłej Jugosławii, 1 : 333 dla Włochów i 1 : 1000 dla pozostałej ludności białej [41, 42]. Badania te wykazały, że więcej niż 1% populacji stanowią heterozygoty, nosiciele allelu tej postaci zespołu i że jest ona jedną z najbardziej powszechnie występujących chorób autosomalnych recesywnych [4, 9]. Dotąd nie określono częstości występowania postaci klasycznej ZNP w populacji polskiej.

V. Budowa genów CYP21

U człowieka znaleziono dwa geny CYP21: pseudogen (CYP21A) i gen funkcjonalny (CYP21B) [43]. Oba zlokalizowane są na ramieniu krótkim chromosomu 6 w pasmie 21.3, w pobliżu głównego kompleksu genów zgodności tkankowej, pomiędzy *locus* HLA B i HLA DR (region klasy III). W obszarze tym znajdują się także geny kodujące: składnik drugi układu dopełniacza (C2), czynnik properdyny (Bf), składnik czwarty układu dopełniacza (C4A i C4B) oraz białko macierzy pozakomórkowej — tenascin-X (XAi XB) [37, 44], (Ryc. 3).

Porównanie sekwencji, genów funkcjonalnego i pseudogenu, ujawniło, że są one wysoce (98%) homologiczne i różnią się tylko 88 pz. Spostrzeżenie to dotyczy także intronów i sekwencji oskrzydlających. Bliskie sąsiedztwo wysoce podobnych genów CYP21A i CYP21B może być odpowiedzialne za dużą częstość niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej, jako wynik wymiany sekwencji DNA w procesie rekombinacji homologicznej, lub nierównomiernej rekombinacji krzyżowej w czasie mejozy [7].

Sądzi się, że duża plastyczność genetyczna regionu kodującego antygeny HLA zapewnia utrzymanie odrębności komórkowej poszczególnych osobników. Jednocześnie prowadzi ona do powstania wielu konfiguracji alleli oraz duplikacji genów w obrębie *locus*



Ryc. 3. Region genów klasy III głównego kompleksu zgodności tkankowej.
Na środkowej linii przedstawiono geny tego regionu, które są transkrybowane w tym samym kierunku (5'→3'). Geny XA i XB, leżące na przeciwległej nici DNA, zostały pominięte. Na dolnej linii przedstawiono sekwencję 10 eksonów i introny genu funkcjonalnego (21B). Długości fragmentów DNA są przybliżone. C2 — gen składnika drugiego układu dopełniacza, Bf — gen dla czynnika properdyny Bf, G11 — gen niescharakteryzowany, C4A i C4B — niealleliczne geny kodujące dwie formy składnika czwartego układu dopełniacza, 21A — pseudogen. Wg [9] — zmodyfikowano.

http://rcin.org.pl

[37]. Dotyczy to także genu CYP21B i prowadzi do wyjątkowej sytuacji, w której większość chorych to złożone heterozygoty, posiadające dwa różne, nieprawidłowe allele, pochodzące po jednym od każdego z rodziców. Z tego względu, najczęściej nie można mówić o homozygotyczności względem zmutowanego genu, jak to ma miejsce w wielu innych chorobach autosomalnych recesywnych. U heterozygot złożonych, ciężkość przebiegu choroby zależy od tego allelu, którego nieprawidłowość wywiera mniejszy skutek [37].

Wykazano, że geny CYP21A i CYP21B zlokalizowane są w sąsiedztwie genów XA i XB i tworzą grupę -C4A-CYP21A-XA-C4B-CYP21B-XB- [7, 37], przy czym geny XA i XB, położone na przeciwległych niciach DNA, nakładają się na ostatnie eksony genów CYP21 [9, 37]. Dzięki podobieństwu sekwencji nukleotydów DNA, między parami genów CYP21A-XA i CYP21B-XB, bardzo często występują rekombinacje krzyżowe, których konsekwencją może być niedobór 21-hydroksylazy sterydowej.

W genie CYP21A znajdują się z reguły trzy mutacje, które są odpowiedzialne za jego unieczynnienie: brak 8 zasad 5'-GAGACTA-3', w eksonie 3 (powodujący przesunięcie ramki odczytu), obecność dodatkowej T w eksonie 7 oraz zamiana C na T w eksonie 8 (obie mutacje powodują powstanie przedwczesnego kodonu nonsensownego) [7, 9, 45]. Nowsze badania wskazały, że geny CYP21A i XA ulegają transkrypcji w komórkach kory nadnerczy, ale nie zawierają one otwartej ramki odczytu i z tego względu przypuszczalnie nie kodują białek [46, 47]. Każdy z genów CYP21 (wielkości około 3,4 kpz), zawiera 10 eksonów o długościach: 199, 90, 155, 102, 102, 87, 201, 179, 104 i 266 pz) [7]. Produktem genu CYP 21B jest mRNA wielkości około 2kz [9].

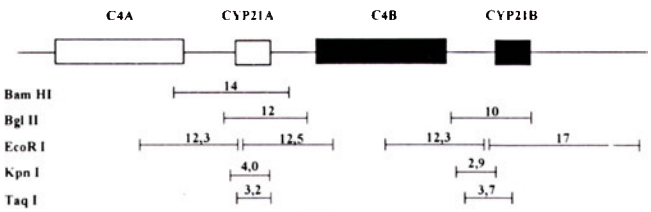
VI. Strategia badań mutacji genów CYP21

VI-1. Metody stosowane do badań genu CYP21B

W celu odróżnienia genu funkcjonalnego (CYP21B) od pseudogenu (CYP21A) oraz ewentualnego wykrycia podwojeń, konwersji, ubytków lub większych wstawek przeprowadzono analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP) [46, 48-52], blotting Southerna, analizę polimorfizmu konformacji jednej nici DNA i in. [53].

Trawiąc DNA osoby zdrowej restryktazą Taq I i Bgl II, uzyskuje się fragmenty: o długości 3,7 kpz (odpowiadający genowi CYP21B) oraz o długości 3,2 kpz (odpowiadający pseudogenowi CYP21A). Analiza elektroforetyczna tych fragmentów wykazuje wówczas dwa prążki o jednakowej intensywności. Brak jednego z nich wskazuje na delecję danego genu względnie konwersję jednego w drugi [9, 54].

Inne najczęściej używane enzymy restrykcyjne, wykorzystywane do badania genów CYP21, metodą RFLP oraz wielkości uzyskanych fragmentów podano



Ryc. 4. Analiza restrykcyjna genów CYP21.
CYP21A oznacza pseudogen, CYP21B gen funkcjonalny, C4A i C4B oznaczają geny kodujące dwie formy składnika czwartego układu dopełniacza. W dolnej części ryciny przedstawiono najczęściej używane enzymy restrykcyjne oraz przybliżone długości otrzymywanych fragmentów (kpz).

na rycinie 4 oraz w tabeli 1.

Fragmenty restrykcyjne genomowego DNA można również przenieść na błonę nitrocelulozową lub nylonową, w sposób opisany przez Southerna [55] (*Southern blot*) i poddać hybrydyzacji ze znakowaną radioaktywnie sondą, zawierającą pełnej długości cDNA kodujący ludzki cytochrom $P450_{21}$. Fragment zawierający mutację nie hybrydyzuje z sondą i dlatego nie stwierdza się go na autoradiogramie, jest natomiast widoczny po wybarwieniu bromkiem etydyny. Technika ta stanowi nadal jedną z najczęściej używanych metod wykrywania mutacji genu CYP21B [56-58].

Aby wykryć mutacje zastosowano także metodę badania polimorfizmu konformacji jednej nici DNA (*single-strand conformation polymorphism*, SSCP) polegającą na wykorzystaniu różnic w migracji w żelu poliakryloamidowym zdenaturowanego fragmentu DNA obarczonego mutacją, w stosunku do analogicznego fragmentu prawidłowego. Taki efekt może być

Tabela 1

Identyfikacja fragmentów DNA prawidłowego genu CYP21B i pseudogenu CYP21A za pomocą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)

Nazwa enzymu restrykcyjnego	Długość fragmentów (kpz)				
Bam H I	14				[48]
Bgl II	**10**	11	*12*		[50]
Bgl II/Eco R I	*2*	2.4	8	*10*	[49]
Eco R I	12.3	12.5	14	**17**	[51]
Eco R V	25				[51]
Hind III	18	20			[51]
Kpn I	1.1	2.0	**2.9**	*4*	[52]
Nco I	0.9	2.3	3.2	4	[52]
Pvu II	**1.8**	*2.0*	3.3	3.5	[51]
Taq I	*2.4*	*3.2*	**2.5**	**3.7**	[46]

Tłustym drukiem zaznaczono fragmenty charakterystyczne dla CYP21B, kursywą dla CYP21A, a zwykłym drukiem dla CYP21A i CYP21B. Cyfry w nawiasach klamrowych oznaczają pozycje piśmiennictwa.

http://rcin.org.pl

już wywołany pojedynczą mutacją punktową, polegającą na przykład na zamianie pojedynczego nukleotydu w odcinku DNA o długości nawet kilkuset zasad [53, 59]. Poszczególne fragmenty są wcześniej amplifikowane techniką PCR (*polymerase chain reaction*) z wykorzystaniem znakowanych starterów [60]. Fragmenty genu, zawierające mutacje, wykryte za pomocą metody SSCP, można sekwencjonować technikami klasycznymi lub automatycznymi [61-64].

Lokalizacje mutacji punktowych w DNA genu CYP21B określano również metodą chemicznego rozbijania, za pomocą piperydyny, (*chemical cleavage method*, CCM) [65], po uprzedniej modyfikacji DNA czterotlenkiem osmu i hydroksylaminą. Zastosowanie techniki amplifikacji DNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) [66] pozwoliło na dalszą, dokładniejszą analizę fragmentów genów CYP21, a poznanie sekwencji nukleotydów genów CYP21 umożliwiło zaprojektowanie starterów komplementarnych do odcinków, których sekwencja w genie funkcjonalnym i pseudogenie różni się zaledwie kilkoma nukleotydami [67, 68]. Pozwoliło to na łatwe rozróżnienie sekwencji pseudogenu CYP21A od genu funkcjonalnego CYP21B. Zestawienie sekwencji starterów najczęściej używanych do amplifikacji fragmentów restrykcyjnych genu CYP21B przedstawiono w tabeli 2.

Dzięki zastosowaniu, dla fragmentów otrzymanych w pierwotnej reakcji PCR, dodatkowych starterów wewnętrznych, uzyskiwano produkty o długości mniejszej niż 1 kpz, które poddawano dalszej analizie metodą "dot-blot" bądź sekwencjonowano [49, 69].

Tabela 2

Sekwencje nukleotydów używanych jako startery w reakcji amplifikacji fragmentów genu CYP21B metodą PCR wg [45]

Symbol	Ekson i pozycja	Sekwencja (5'-3')
H	1; 17-22	CTGCTGTGGAACTGGTGG
Ir	1; 24-19	GAGCTTCCACCAGTTCCA
Jr	1; 113-108	CTGCAGCAAGTGCAAGAA
M	2; 68-73	GTGGTGCTGAACTCCAAG
Kr	2; 89-85	AGCAAAGTCTGCCCA
N	2; 91-96	AGACCTGAGCCACTTACC
Lr	3; 109-104	CCAAGGACAGGTCCGGGT
Ar	3; 112-108	AGTAGTCTCCCAAGGACA
A	3; 107-112	CTTGTCCTTGGGAGACTA
Or	3; 143-148	CTCACAGAACTCCTGGGT
P	4; 170-174	CAGCATCATCTGTTA
Br	4; 185-180	CTTGATCTTGTCTCCGAA
C	6; 234-238	GATCACATCGTGGAG
Cr	6; 239-235	GCATCTCCACGATGT
Q	7; 266-270	GCAGCCGAGCATGGA
S	8; 316-320	AGCGACTGCAGGAGG

VI-2. Inne metody, które mogą zostać wykorzystane do wykrywania mutacji genów CYP21

Najnowsza metoda wykrywania mutacji, dotąd nie stosowana do badań mutacji genu CYP21B, polega na rozdzieleniu amplifikowanych fragmentów DNA w żelu poliakrylamidowym, zawierającym wzrastający gradient związku denaturującego (*denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE*) [70]. Do badanego fragmentu DNA wprowadza się ok. 40-nukleotydowy odcinek złożony z sekwencji GC, który ochrania obydwie nici przed rozdzieleniem w czasie denaturacji. Nić DNA, zawierająca mutację tworzy z prawidłową nicią komplementarną heterodupleks, który jest trwalszy niż homodupleks, złożony z obu nici prawidłowych. Nić zawierająca mutację wykrywa się na podstawie obrazu prążków po rozdziale elektroforetycznym w żelu poliakryloamidowym [71].

Nadzieję na łatwiejszą lokalizację mutacji w genie CYP21B stwarza również wykorzystanie zjawiska nieuprawnionej transkrypcji (*illegitimate transcription*) [72]. Analiza transkryptów ektopowych wymaga odwrotnej transkrypcji RNA, a następnie amplifikacji uzyskanego cDNA i jego sekwencjonowania.

VII. Wyniki badań mutacji genu CYP21B

Badania mutacji genu CYP21B dowiodły, że przyczyną ZNP mogą być konwersje, ubytki, wstawki, podwojenia oraz mutacje punktowe wywołujące zahamowanie ekspresji genu, przedwczesną terminację, przesunięcie ramki odczytu i in.

Około 60% przypadków formy klasycznej ZNP jest wywołane konwersją genu CYP21B w pseudogen CYP21A [49, 73, 74]. Sąsiadujące geny C4A i C4B, które okalają CYP21B, są przy tym zachowane i ulegają ekspresji. W sporadycznych przypadkach konwersja genów CYP21 może jednak spowodować wydłużenie genu C4B [9].

U chorych, u których występuje rzadko spotykany haplotyp HLA-A3w47Dr7, stwierdza się całkowitą delecję genów CYP21B i C4B. Powoduje ona ok. 20% przypadków ZNP, przebiegającego z utratą soli (forma US). Przypuszcza się, iż jest ona spowodowana nierównomierną rekombinacją typu krzyżowego (*crossing-over*) między genami CYP21A i CYP21B [49, 74-76]. Częściej jednak (ok. 50% znanych przypadków formy US) spotyka się ubytek odcinka o długości ok. 30 kpz, obejmującego fragment 3' genu CYP21A, cały gen C4B oraz fragment 5' genu CYP21B [9] (Ryc. 3).

Przyczyną wystąpienia objawów formy US może być ubytek 8 par zasad w eksonie 3 genu CYP21A [57, 77, 78]. Przeniesienie tej mutacji podczas mejozy,

http://rcin.org.pl

poprzez *crossing-over*, do genu CYP21B powoduje powstanie fragmentu, w którym koniec 3' jest typowy dla CYP21B, zaś koniec 5' dla CYP21A. Natomiast, 20% poznanych przypadków WP, związanych jest z podwojeniem genów CYP21A i C4B [84]. Analiza sekwencyjna ujawniła liczne przypadki mutacji punktowych genu CYP21B. Objawy formy US mogą być spowodowane np. włączeniem dodatkowej T w pozycji 1761 eksonu 7 [58, 79], lub wstawieniem GG zamiast C w eksonie 10. Zarówno omówione ubytki, jak i wstawki, powodują przesunięcie ramki odczytu, co sprawia, że syntetyzowane białko posiada nieprawidłową sekwencję aminokwasów.

Wśród licznych przypadków podstawienia zwraca uwagę tranzycja C→G w intronie 2 (pozycja 655), wywołująca zaburzenie składania pre-mRNA. Mutacja ta powoduje obniżenie aktywności 21-hydroksylazy sterydowej do 5% i związana jest z formami US i WP zespołu nadnerczowo-płciowego [73, 79, 80]. Inne wykryte dotąd podstawienia w genie CYP21B przedstawiono w tabeli 3.

VIII. Uwagi końcowe

Niedobór 21-hydroksylazy sterydowej, wywołujący objawy zespołu nadnerczowo-płciowego, jest najlepiej poznanym zaburzeniem, ze wszystkich przypadków niedoborów enzymatycznych, jakie mogą wystąpić w procesie syntezy hormonów sterydowych. Badania niedoboru innych enzymów uczestniczących w syntezie hormonów sterydowych: dehydrogenazy 3β-hydroksysterydowej/^{5}Δ-izomerazy, 11β-hydroksylazy sterydowej [34], 17 α-hydroksylazy sterydowej czy też 5α-reduktazy sterydowej [86, 87] znajdują się jeszcze w fazie początkowej, lecz rozwój innych, dotąd nie stosowanych, technik biologii molekularnej pozwala przypuszczać, iż w krótkim czasie nastąpi dogłębne poznanie genetycznych uwarunkowań tych zaburzeń [59, 60]. Należy wiązać duże nadzieje z dalszym postępem metod sekwencjonowania DNA (z użyciem polimerazy T7 [88] oraz przez hybrydyzację [89]), a także nowych, powiązanych z techniką PCR, metod wykrywania mutacji (DGGE, nieuprawniona transkrypcja).

Ze względu na duże znaczenie zaburzeń syntezy hormonów sterydowych dla praktyki lekarskiej, należy przypuszczać, że postęp w tej dziedzinie będzie bardzo szybki.

Tabela 3

Niektóre mutacje punktowe wykryte w genie CYP21B

Symbol	Ekson i pozycja	Defekt DNA	Defekt białka	Kodon	Objawy	Aktywność 21-HS (%)
P30L	1; 89	C→T	Pro→Leu	30	NK	30-60 [81]
I172N	4; 999	T→A	Ile→Asn	172	WP	3-7 [82]
I236D	6; 1380	T→A	Ile→Asn	236	US	0 [7]
V237G	6; 1383	T→A	Val→Glu	237	US	0 [7]
M236	6; 1389	T→A	Met→Lys	239	US	0 [7]
E268	7; 1645	G→C	Ser→Thr	268	US	5 [85]
V281L	7; 1683	G→T	Val→Leu	280	NK	20-50 [83]
G291S	7; 1713	G→A	Gly→Ser	291	US	0 [83]
G318X	8; 1994	C→T	Gln→stop	318	US	0 [58]
R356W	8; 2108	C→T	Arg→Trp	356	US	0 [78]
P453S	10; 2578	C→T	Pro→Ser	453	NK	20-50 [84]

NK — forma nieklasyczna; WP — wirylizacja prosta; US — postać z utratą soli; 21-HS — 21-hydroksylaza sterydowa (aktywność mierzono *in vitro*). Cyfry w nawiasach klamrowych oznaczają pozycję piśmiennictwa.

Podziękowania

Autorzy dziękują pani Aleksandrze Jakubowskiej-Pawłowskiej za pomoc edytorską. Pracę finansowano z programu badań statutowych A.M. 502-1-067 oraz z grantu KBN 6 6294 92 03.

Artykuł otrzymano 11 listopada 1994 r.
Zaakceptowano do druku 12 grudnia 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Vinson PG, Whitehouse B, Hinson J (1992) The Adrenal Cortex, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey
2. Williams DH, Dluhy RG (1994) W: Isselbacher KJ, Braunwald,E, Wilson JD, Martin JD, Fauci AS, Kasper DL (red) Harrison's Principles of Internal Medicine t 2. McGraw-Hill, New York, str 1953-58
3. Konturek S (1989) W: Traczyk WZ, Trzebski A (red) Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej t 1. PZWL, Warszawa, str. 407-417
4. New MI, White PC, Pang S, Dupont B, Speiser PW (1989) W: Sciver C, Beaudet A, Sly S, Valle D (red) The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, New York str 1881-1917
5. New MJ (1994) *J Steroid Biochem Mol Biol* **48:** 15-22
6. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin D, New MI, Dupont B, Strominger JL, (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82:** 1089-1093
7. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83:** 2841-2845
8. Aisenberg JE, Speiser PW (1994) *The Endocrinologist* **4:** 92-98
9. Morel Y, Murena M, Nicolino M, Forest MG (1992) W: Saez JM, Brownie AC, Capponi A, Chambaz EM, Mantero F (red) Cellular and Molecular Biology of the Adrenal Cortex t 2 John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge str 123-126
10. Kovanen PT, Schneider WJ, Hillman GM, Goldstein JL, Brown MS (1979) *J Biol Chem* **254:** 5498-5505
11. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL (1979) *Recent Progr Hormone Res* **35:** 215-249 (cyt. wg 1)
12. Gwynne JT, Mahaffee D, Brewer HB, Ney RL (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73:** 4329-4333
13. Gwynne JT, Hess B (1980) *J Biol Chem* **255:** 10875-10883
14. Boyd GS, Trzeciak WH (1973) *Ann NY Acad Sci* **212:** 361-377
15. Trzeciak WH, Boyd GS (1974) *Eur J Biochem* **46:** 201-207
16. Naghshineh S, Treadwell DR, Gallo L, Vahouny GV (1974) *Biochem Biophys Res Commun* **61:** 1076-1082

http://rcin.org.pl

17. Vahouny GV, Chanderbhan R, Noland BJ, Scallen TJ (1984-85) *Endocrine Res* **10:** 473-505
18. Vahouny GV, Chanderbhan R, Noland BJ, Irvin D, Dennis P, Lambeth JD, Scallen TJ (1983) *J Biol Chem* **258:** 11731-11737
19. Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV, Waterman MR (1987) *J Biol Chem* **262:** 3713-3717
20. Kmieciak D, Trzeciak WH (1994) *Post Biochem* **40:** 240-247
21. Lauber M, Sugano S, Ohnishi T, Okamoto M, Müller J (1987) *J Steroid Biochem* **26:** 693-698
22. Nebert DW, Gonzalez FJ (1987) *Annu Rev Biochem* **56:** 945-955
23. Dawson JH (1988) *Science* **240:** 443-449
24. McMurry TJ, Groves JT (1996) W: Ortiz de Montellano PR (red) Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry. Plenum Press, New York-London str 1-28 (cyt wg 1)
25. Ortiz de Montellano PR (1986) W: Ortiz de Montellano PR (red) Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry. Plenum Press, New York-London str 217-271 (cyt wg 1)
26. Kominami S, Hara H, Ogishima T, Takemori S (1984) *J Biol Chem* **259:** 2991-2999
27. Takemori S, Kominami S (1984) *Trends Biochem Sci* **9:** 393-396
28. Kimura T, Nakamura S, Huang JJ, Chu JW, Wang HP, Tsernoglou D (1973) *Ann NY Acad Sci* **212:** 94-104
29. Waterman MR Simpson ER (1985) *Mol Cell Endocrinol* **39:** 81-89
30. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzales FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Laper JC, Waterman MR, Waxman DJ (1991) *DNA Cell Biol* **10:** 1-14
31. Hanukogku I (1992) *J Steroid Biochem Mol Biol* **43:** 779-804
32. Owerbach D, Crawford YM, Draznin MB (1990) *Mol Endocrinol* **4:** 125-131
33. Wilson JD, Griffin JE (1994) W: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (red) Harrison's Principles of Internal Medicine t 2. McGraw-Hill, New York, str 2045-2047
34. Azziz R, Dewailly D, Owerbach D (1994) *J Clin Endocrinol Metab* **78:** 810-815
35. Kałużewski B, Jakubowski L (1992) W: Pawlikowski M (red) Zarys endokrynologii klinicznej PZWL, str 153-157
36. Walczak M (1991) W: Walczak M (red) Zarys pediatrii t 2. PZWL, Warszawa str 416-419
37. Miller WL (1994) *J Clin Endocrinol Metab* **78:** 241-224
38. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pangh S, Levine LS (1983) *J Clin Endocrinol Metab* **57:** 320-327
39. McKusick VA (1988) Mendelian inheritance in man. John Hopkins University Press, Baltimore str 788-791
40. Pang S, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon ICT, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S (1988) *Pediatrics* **81:** 866-874 (cyt wg 9)
41. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI (1985) *Am J Hum Genet* **37:** 650-667
42. Dumik M, Brkljacic L, Speiser PW, Wood E, Crawford C, Plavsic V, Braniceviac M, Radamanovic S, Radica A, Kastelan A, New MI (1990) *Acta Endocrinol* **122:** 703-710
43. Caroll MC, Campbell RD, Porter RR (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82:** 521-525
44. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin D, New MJ, Dupont B, Strominger JL (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82:** 1089-1093
45. Owerbach D, Ballard AL, Draznin MB (1992) *J Clin Endocrinol Metab* **74:** 553-558
46. Gitelman SE, Bristow IJ, Miller WL (1992) *Mol Cell Biol* **12:** 2124-2134
47. Bristow J, Gitelman SE, Tee MK, Steals B, Miller WL (1993) *J Biol Chem.* **268:** 12919-12924
48. Lawn RM, Fritsch EF, Parker RC, Blake G, Maniatis T (1978) *Cell* **15:** 1157-1174
49. Mornet E, Crete P, Kutten F, Raux-Dermay MC, Boue J, White PC, Boue A (1991) *Am J Hum Genet* **48:** 79-88
50. Jospe N, Donohoue PA, Van Dop C, McLean RH, Bias WB, Migeon CJ (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **142:** 798-804
51. Mornet E, Couillin P, Kutten F, Raux MC, White PC, Cohen D, Boue A, Dausset J (1986) *Hum Genet.* **74:** 402-408
52. Donohoue PA, Neto RS, Collins MM, Migeon CJ (1990) *Mol Endocrinol* **4:** 1354-1361
53. Hayashi K (1991) *PCR Methods Appl* **1:** 34-38
54. Donohoue PA, Jospe N, Migeon CJ, McLean RH, Bias WB, White PC, Van Dop C (1986) *Biochem Biophys Res Commun* **136:** 722-729
55. Southern EM (1975) *J Mol Biol* **98:** 503-517
56. Feinberg AP, Vogelstein B (1983) *Anal Biochem* **132:** 6-13
57. White PC, New MI, Dupont B (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83:** 5111-5115
58. Globerman H, Amor M, Parker KL, New MJ, White PC (1988) *J Clin Invest* **82:** 139-144
59. Orita M, Iwahana H, Kanazawa K, Hayashi K, Sekiya T (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86:** 2766-277
60. Chehab FF, Kan YW (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86:** 9178-9182
61. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) *Science* **238:** 336-341
62. Maxam AM, Gilbert W (1980) *Methods Enzymol* **65:** 499-560
63. Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74:** 5463-5467
64. Kraft R, Tardiff J, Krauter KS, Leinwand LA (1988) *Bio Techniques* **6:** 544-547
65. Cotton RGH, Rodrigues NR, Campbell RD (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 4397-4401
66. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) *Cold Spring Harbor Symp* **51:** 263-273
67. Crauters MH, Beaucage SL, Efcavitch JW, Fisher EF, Matteucci MD, Stabinsky Y (1980) *Nucleic Acids Symp Ser* **7:** 215-223
68. Matteucci MD, Caruthers MH (1981) *J Am Chem Soc* **103:** 3185-3191
69. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) W: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
70. Fodde R, Losekoot M (1994) *Hum Mut* **3:** 83-94
71. Myers RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T (1985) *Nature* (Lond) **313:** 495-498
72. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86:** 2617-2621
73. Higashi Y, Tanae A, Ynoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 7486-7490
74. Urabe K, Kimura A, Harada F, Iwanaga T, Sasazuki T (1990) *Am J Hum Genet* **46:** 1178-1186
75. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 4436-4440
76. Partanen J, Koshimes S, Sipilä, Lipsanen V (1989) *Am J Hum Genet* **44:** 660-670
77. Rodrigues NR, Dunham J, Yu CY, Carrol MC, Porter RR Campbell RD(1987) *Embo J* **6:** 1653-1661
78. Chiou SM, Hu MC, Chung BC (1990) *J Biol Chem* **265:** 3549-3552
79. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, Ohura T, Ogawa E, Nakayama K, Fujii-Kuriama Y (1991) *J Biochem* (Tokyo) **109:** 638-644
80. Tajiama T, Fujieda K, Nakayama K, Fuji-Kuriyama Y (1993) *J Clin Lnvest* **92:** 2182-2190
81. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumie M, New MI, White PC (1991) *Mol Endocrinol* **5:** 685-692
82. Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85:** 1600-1640
83. Wu DA, Chung B (1991) *J Clin Invest* **88:** 519-523
84. Helmburg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler R, White PC (1992) *Mol Endocrinol* **6:** 1318-1322

http://rcin.org.pl

85. Strachan T (1990) *Clin Endocrinol* **32:** 373-393
86. Kostyrko A, Antkowiak J, Warenik-Szymankiewicz A, Trzeciak WH (1994) *Gin Pol* **45:** 400-417
87. Kostyrko A, Trzeciak WH (1994) *Endokrynol Pol* **45:** 117-124
88. Tabor S, Richardson CC (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **82:** 4767-4773
89. Janitz M, Kurpisz M (1994) *Post Biochem* **40:** 72-76

Neurosteroidy — synteza i metabolizm

Neurosteroids — synthesis and metabolism

ELŻBIETA RĘBAS[1],
LILLA LACHOWICZ[2]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Neurosteroidy
III. Synteza i metabolizm neurosteroidów
IV. Działanie steroidów w ośrodkowym układzie nerwowym
IV-1. Oddziaływanie pośrednie powolne
IV-2. Oddziaływanie bezpośrednie szybkie

Contents:

I. Introduction
II. Neurosteroids
III. Synthesis and metabolism of neurosteroids
IV. Action of neurosteroids in central nervous system
IV-1. Genomic action of steroids
IV-2. Non-genomic action of steroids

Wykaz stosowanych skrótów: DHEA-S — siarczan dehydroepiandrosteronu; PS — siarczan pregnenolonu; PL — estry pregnenolonu z kwasem tłuszczowym; OUN — ośrodkowy układ nerwowy; P_{450} — cytochrom P_{450}

I. Wstęp

Pięćdziesiąt lat temu Seyle wykazał, że hormony steroidowe wykazują działania anestetyczne i przeciwdrgawkowe. Od tego odkrycia pojawiło się wiele różnych obserwacji dotyczących wywoływanych przez steroidy zmian w aktywności neuronalnej, które występowały bardzo szybko, już nawet po kilku sekundach lub minutach. Przyjmuje się, że hormony steroidowe mogą wpływać na aktywność neuronalną na drodze dwóch mechanizmów, z których jeden polega na aktywacji genomu, drugi zaś prowadzi do wytworzenia sygnału transmembranowego. Potwierdzono, że steroidy występujące w mózgowiu pochodzą bądź z gruczołów płciowych i nadnerczy, a przenoszone przez krew i pokonujące barierę krew — mózg, bądź też syntetyzowane są w komórkach mózgowia. Hormony pochodzące spoza mózgowia występują w nim w bardzo małym stężeniu, o wiele niższym niż ich stężenie we krwi. Przypisuje się im możliwość modulacji funkcji ośrodkowego układu nerwowego i wówczas nazywane są neuroaktywnymi steroidami [1-3]. Wykazano, że steroidy w fizjologicznych stężeniach mogą allosterycznie modulować m.in. receptory kwasu γ-aminomasłowego [1]. Szczególnie interesujące okazały się dane wskazujące, że niektóre ze steroidów aktywnych wobec GABA-A mają właściwości neurosteroidów — steroidów, syntetyzowanych w mózgowiu.

II. Neurosteroidy

O wiele większe znaczenie biologiczne mają steroidy syntetyzowane w komórkach mózgowia tzw. neurosteroidy, w porównaniu z neuroaktywnymi steroidami. Ich stężenie w mózgowiu przewyższa stężenie we krwi, a ponieważ nie pokonują bariery krew — mózg utrudniona jest ich ucieczka z miejsca syntezy. Obecnie określenie neurosteroidy odnosi się do pregnenolonu i dehydroepiandrosteronu oraz ich pochodnych i metabolitów [4-7]. W komórkach ośrodkowego układu nerwowego neurosteroidy występują jako niezwiązane steroidy bądź jako estry kwasu siarkowego lub kwasów tłuszczowych. Poziom neurosteroidów w mózgowiu nie różni się u zwierząt obu płci i jest niezależny od działania gruczołów obwodowych takich jak gonady i nadnercza, które wytwarzają steroidy. Stężenie pregnenolonu i jego siarczanu w mózgowiu jest ok. 10 razy wyższe od stężenia dehydroepiandrosteronu. Zawartość neurosteroidów w mózgowiu wynosi ok. 20-

[1] Mgr, [2] prof. dr hab. II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

http://rcin.org.pl

-45 ng/g tkanki. Poziom ten może się wahać w trakcie doby [6-8].

Synteza neurosteroidów przebiega tylko w określonych komórkach tkanki nerwowej. Przypuszczalnie większość enzymów odpowiedzialnych za syntezę neurosteroidów zlokalizowana jest w oligodendrocytach. Wykazano występowanie w błonie mitochondrialnej oligodendrocytów obecność kompleksu enzymatycznego katalizującego powstanie pregnenolonu. Inny typ komórek glejowych — astrocyty, nawet jeżeli odgrywają one istotną rolę w różnicowaniu aktywności steroidogennej oligodendrocytów, bezpośrednio nie biorą udziału w syntezie neurosteroidów [9-10].

III. Synteza i metabolizm neurosteroidów

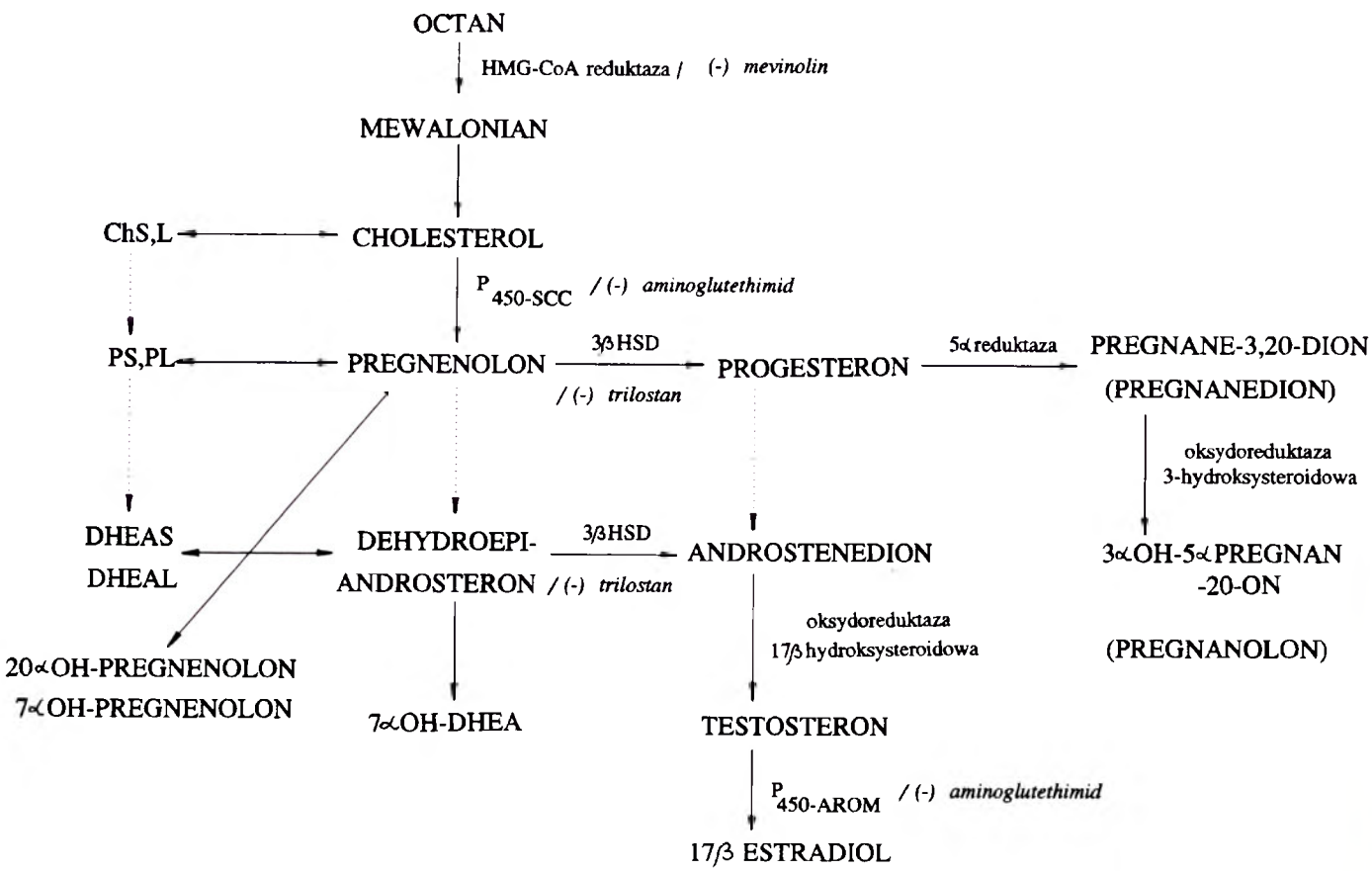
Powszechnie akceptowana jest hipoteza mówiąca, że synteza neurosteroidów w mózgowiu zachodzi *de novo* z cholesterolu, a przebiega tą samą drogą, jak w gruczołach wydzielania wewnętrznego. Poziom neurosteroidów w mózgowiu nie zmienia się u zwierząt kastrowanych i niekastrowanych, podczas gdy np. poziom testosteronu we krwi zwierząt po kastracji gwałtownie spada, a w mózgowiu jego zawartość jest wówczas nieoznaczalna. W komórkach mózgowia wykryto enzymy niezbędne do przekształcenia cholesterolu w pregnenolon, powodując odszczepienie łańcucha bocznego cholesterolu. Reakcję tę katalizuje kompleks enzymatyczny, w skład którego wchodzą enzym $P_{450\text{-}SCC}$, adrenodoksyna i reduktaza adrenodoksyny. Kompleks ten uważany był za charakterystyczny dla kory nadnerczy, niedawno jednak odkryto obecność tych enzymów w błonie mitochondrialnej oligodendrocytów. Po podaniu szczurom doświadczalnym aminoglutetymidu, inhibitora enzymu $P_{450\text{-}SCC}$, poziom neurosteroidów obniża się około czterokrotnie w porównaniu z ich poziomem u szczurów grupy kontrolnej, którym nie podano inhibitora [5-6; 10-15].

Biosyntezę neurosteroidów *in situ* w ośrodkowym układzie nerwowym potwierdzono stosując inhibitory aktywności niektórych enzymów biorących udział w ich syntezie. Większość doświadczeń prowadzona była w warunkach *in vitro* w hodowlach komórek glejowych. W ten sposób wykazano, że mewinolin — specyficzny inhibitor kompetycyjny reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutaryloCoA dodany do hodowli komórkowej oligodendrocytów hamuje powstawanie mewalonianu — prekursora cholesterolu.

Natomiast trilostan, który hamuje aktywność dehydrogenazy 3-β-hydroksysteroidowej i izomerazy blokuje przekształcenie pregnenolonu w progesteron, a także przekształcenie dehydroepiandrosteron w androstenedion [4-5].

Schemat syntezy i przekształceń neurosteroidów w komórkach mózgowia przedstawia rycina 1.

Wiadomo, że przemiany pregesteronu w mózgowiu wiążą się z syntezą 5-α zredukowanych metabolitów



Ryc. 1. Schemat syntezy i metabolizmu neurosteroidów w mózgowiu.
3-β-HSD — dehydrogenaza 3-β-hydroksysteroidowa; ----- przekształcenie prawdopodobne

http://rcin.org.pl

jak 5-α-pregnane-3,20-dionu (pregnanedion) oraz 3-α-hydroksy-5-α-pregnane-20-onu (pregnanolon) [4-5; 16]. Natomiast drogi przekształcenia pregnenolonu w dehydroepiandrosteron oraz progesteronu w androstenedion (linia kropkowana na ryc. 1) są na razie nie znane. Wykazano jednak, że poziom tych steroidów w mózgowiu jest niezależny od wydzielania obwodowego [17]. Testosteron i jego prekursor androstenedion mogą być źródłem estrogenów w mózgowiu, a układ cytochromu $P_{450\text{-}AROM}$ bierze udział w utworzeniu aromatycznego pierścienia w steranie [4].

Oprócz głównych szlaków metabolizmu przedstawionych na rycinie 1, steroidy w mózgowiu mogą ulegać innym przemianom. Opisano kilka aktywnych dehydrogenaz hydroksysteroidowych np. dehydrogenezę 20-α-hydroksysteroidową, której substratami mogą być pregnenolon lub progesteron. Dehydrogenaza 17-β-hydroksysteroidowa może katalizować przemianę dehydroepiandrosteronu w 5-α-androsten-3-β-17-β-diol. Dehydroepiandrosteron jest również metabolizowany do bardziej polarnych metabolitów z podstawieniem grupy OH w pozycji α przy 7 atomie węgla przez bliżej nie scharakteryzowany układ enzymatyczny frakcji mikrosomalnej mózgowia. Należy podkreślić, że wzrost temperatury lub podanie tlenku węgla hamuje ten proces [4,5].

Steroidy syntetyzowane w mózgowiu mogą być estryfikowane przez kwas siarkowy lub przez kwasy tłuszczowe i w tej postaci mogą stanowić formę magazynowania tych związków. Acylotransferazy katalizujące reakcję estryfikacji hormonów wykorzystują endogenne kwasy tłuszczowe takie jak: palmitynowy, oleinowy, linoleinowy, stearynowy i mirystynowy. Szczególnie wysoki poziom aktywności acylotransferaz wykryto w mózgowiu młodych samców szczurzych (ok. 1-3 tygodni życia), który spada wraz z wiekiem zwierzęcia. Wyróżnia się różne rodzaje acylotransferaz w zależności od rodzajów steroidów i kwasów tłuszczowych. Natomiast warto podkreślić że np. testosteron i dehydroepiandrosteron mogą hamować aktywność acylotransferazy 17-β-estradiolu, a więc hamować estryfikację biologicznie ważnego estrogenu [5,18-19].

IV. Działanie

Mimo intensywnych badań podjętych w ostatnich latach mechanizmy działania neurosteroidów w OUN nie są dokładnie wyjaśnione. Ważnym i względnie dobrze poznanym procesem jest działanie hormonów steroidowych na genom. Efekty fizjologiczne pojawiają się wówczas w przedziale czasu określonym na godziny i dni. W przeciwieństwie do tak wolnego oddziaływania, hormony steroidowe mogą również wywierać szybkie efekty. Są to zmiany zachodzące w pobudzeniu komórek nerwowych. Czas ich pojawienia ocenia się w sekundach i minutach. Schemat działania neurosteroidów przedstawia rycina 2.

IV-1. Oddziaływanie pośrednie powolne

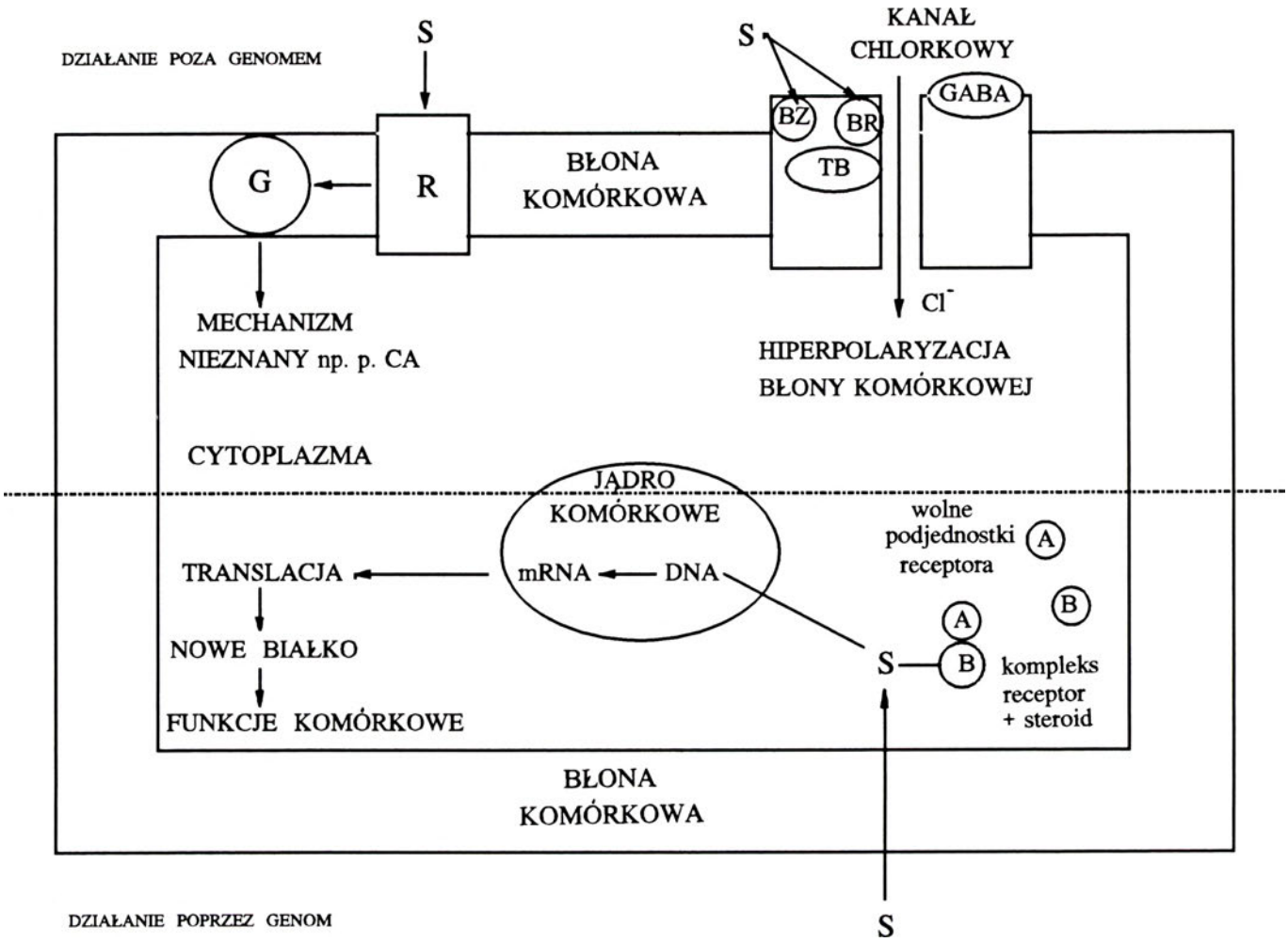
W klasycznej hipotezie działania hormonów steroidowych (pochodzących z gonad, nadnerczy, a także grupy hormonów zaliczanych do neurosteroidów), przenikają one przez błonę plazmatyczną i wiążą się z cystosolowymi a następnie jądrowymi receptorami komórek docelowych. Wewnątrzkomórkowe receptory steroidowe są białkami rozpuszczalnymi o małej specyficzności, które mogą wiązać steroidy, hormony tarczycy, metabolity witaminy D, retinoidy oraz zapewne inne, dotychczas nie określone bliżej ligandy. Wiązanie hormon — receptor ułatwia interakcję zaktywowanego hormonem kompleksu receptora z cząsteczkami DNA, zmieniając transkrypcję genu. W ten sposób receptory steroidowe działają jako czynniki zależne od ligandu, które modulują proces transkrypcji. Wiele z neuronalnych oddziaływań steroidów można określić jako pozytywną lub negatywną regulację ekspresji genu, a dotyczy to genów receptorów neurotransmiterów, neuropeptydów, białek G lub enzymów biorących udział w metabolizmie komórek nerwowych [1].

IV-2. Oddziaływanie bezpośrednie — szybkie

Szybkość zmian jakie zachodzą w aktywności neuronalnej wywołanej steroidami, wydaje się wykluczać mechanizm działania przez genom. Wiele tzw. szybkich efektów powstaje kiedy np. zablokowana jest możliwość połączenia z wewnątrzkomórkowymi receptorami steroidowymi, lub kiedy w materiale badawczym (np. w preparatach mózgowia) występuje mała liczba jąder komórkowych, a także przy zastosowaniu inhibitorów syntezy białka, co prowadzi do zahamowania syntezy odpowiednich enzymów biorących udział m.in. w tworzeniu i metabolizmie steroidów. Wówczas działanie neurosteroidów w mózgowiu dotyczy ich bezpośredniego wpływu na receptory znajdujące się w błonach. Zgodnie z tą ewentualnością potwierdzono wpływ neurosteroidów na dwa receptory błonowe: białka G oraz receptory GABA. Jako przykład posłużyć może pregnenolon i jego zredukowane pochodne, które wykazują działanie agonistów nasilając efekt kwasu γ-aminomasłowego poprzez wiązanie się z receptorem GABA w tzw. miejscu barbiturowym. Mechanizm tego działania polega na otwieraniu kanałów chlorkowych receptorów GABA-A. Należy podkreślić, że wolny pregnenolon i jego siarczan mają przeciwstawne działanie na receptor GABA-A. Znany jest fakt, że neurosteroidy, z uwagi na ich zdolność modulowania receptorów GABA, używane są od dłuższego czasu jako związki pomocnicze w anestezji [1,3-5,20-22].

Prace nad określeniem rodzajów oddziaływań i metabolizmem neurosteroidów i neuroaktywnych steroidów w ustroju ssaków prowadzone są z dużą intensywnością bowiem szereg zagadnień związanych z kont-

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Schemat oddziaływania steroidów na komórkę.
S — steroid, R — receptor białka, G — białko G, AC — cyklaza adenylowa, BZ — miejsce wiązania benzodiazepin, BR — miejsce wiązania barbituranów, TB — miejsce wiązania t-butylobicyklofosfotionatu

rolą hormonalną procesów zachodzących w OUN pozostaje nadal niewyjaśnionych.

Dalsze badania będą prawdopodobnie miały na celu szczegółową ocenę dotyczącą rodzaju steroidu, jednego lub obu, uczestniczących w regulacji procesów neuronalnych. Problem ten wydaje się mieć duże znaczenie zarówno poznawcze jak i kliniczne.

Artykuł otrzymano 31 maja 1994 r.
Zaakceptowano do druku 8 listopada 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Orchinik M, McEwen B (1993) *Neurotransmissions IX* **1**: 1-6
2. Ramirez DV, Dlusen DE, KeFC (1990) W: Steroids and neuronal activity, Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 153): 125-144
3. Paul SM, Purdy RH (1992) *FASEB* J **6**: 2311-2322
4. Baulieu EE, Robel P (1990) *J Steroid Biochem Molec Biol* **37** (3): 395-403
5. Akwa Y i wsp. (1991) *J Steroid Biochem Molec Biol* **40**: 71-81
6. Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjovall J and Baulieu EE (1981) *Proc Natn Acad Sci USA* **78**: 4704-4707
7. Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjovall J, Vihko R, Baulieu EE and Robel P (1983) *Brain Res* **270**: 119-125
8. Jo DH, Ait Abdallah M, Young J, Baulieu EE and Robel P (1989) *Steroids* **54**: 187-297
9. Le Goascogne C, Robel P, Gouezau M, Sananes N, Baulieu EE and Waterman M (1987) *Science* **237**: 1212-1215
10. Le Goascogne C, Robel P, Gouezau M, Defaye G, Chambaz E, Waterman MR and Baulieu EE (1989) *J Neuroendocr* **1**: 153-156
11. Akwa Y, Schumacher M, Jung-Testas I, Baulieu EE (1193) *C R Acad Sci Paris* **316**: 410-414
12. Oftebro H, Stormer EC and Pedersen JI (1979) *J Biol Chem* **154**: 431-4334
13. Mellon SH, Deschepper CF (1993) *Brain Res* **629**: 283-292
14. Jung-Testas I, Alliot F, Pessac B, Robel P and Baulieu EE (1989) *C R Acad Sci Paris* **308**: 165-170
15. Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P (1989) *Endocrinology* **125**, 2083-2091
16. Karavolas HJ, Hodges D, Normand N and O'Brien D (1988) *Steroids* **51**: 527-541
17. Adams J, Garcia M and Rochefort H (1981) *Cancer Res* **41**: 4720-4726
18. Pahuja SL and Hochberg RB (1989) *J Biol Chem* **264**: 3216-3222
19. Martyn P, Smith DL and Adams JB (1988) *Molec Cell Endocr* **60**: 7-13
20. Majewska MD and Schwartz RD (1987) *Brain Res* **404**: 355-360
21. Puia G at al (1990) *Neuron* **4**: 759-765
22. Dubrowski B, Filipini P, Gijsbers K and Bier mingham MK (1990) w: *Steroids and Neuronal Activity*: Wiley, Chichester 240-260

http://rcin.org.pl

Prenylacja białek

Prenylation of proteins

EWA ŚWIEŻEWSKA*

Spis reści:

I. Wstęp
II. Krótka historia prenylacji
III. Bliżej o prenylacji
III-1. Struktura grup prenylowych modyfikujących białka
III-2. Typy prenylowanych białek
IV. Nieco o enzymach
IV-1. FPTaza
IV-2. Właściwości GGPTazy I
IV-3. GGPTaza II
V. Inhibitory prenylotransferaz białkowych
V-1. Inhibitory peptydomimetyczne
V-2. Analogi FPP
V-3. Inne inhibitory
V-4. Znaczenie inhibicji prenylacji białek Ras
VI. Wpływ prenylacji białek na procesy biologiczne i biochemiczne
VII. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. The short history of prenylation
III. Closer to prenylation
IV. A few words about the enzymes
IV-1. FTPase
IV-2. GGTPase I
IV-3. GGTPase II
V. Inhibitors of protein prenyltransferases
V-1. Peptidomimetic inhibitors
V-2. Analogs of FPP
V-3. Another inhibitors
V-4. The significance of Ras prenylation
VI. The influence of protein prenylation on biological and biochemical processes
VII. Final remarques

Wykaz stosowanych skrótów: FPP — difosforan farnezylu, GGPP — difosforan geranylogeranylu, FPTaza — farnezylotransferaza białkowa, GGPTaza — geranylogeranylotransferaza białkowa.

I. Wstęp

Większość białek biosyntetyzowanych w komórce podlega różnorakim chemicznym modyfikacjom wpływającym na ich konformację i aktywność biologiczną. Istnieje bardzo wiele modyfikacji polegających na kowalencyjnym wiązaniu grup modyfikujących do polipeptydu/białka: fosforylacja, przyłączanie ubikwityny, glikozylacja, metylacja i hydroksylacja, wreszcie przyłączanie grup o charakterze lipidowym. Ocenia się, że ok. 5-10% białek komórkowych modyfikowanych jest poprzez wiązanie lipidów. Związanie cząsteczki lipidu z białkiem w drastyczny sposób zmienia jego właściwości hydrofobowe ułatwiając oddziaływanie z błonami. Tabela I przedstawia przykłady lipoprotein dzieląc je ze względu na strukturę lipidów modyfikujących białka. Warto zwrócić uwagę na fakt równoczesnego modyfikowania białek przez różne lipidy (np. białka Ras). Prenylacja białek — występowanie kowalencyjnie związanych z białkami cząsteczek lipidów o strukturze izoprenoidowej jest zjawiskiem zauważonym stosunkowo niedawno choć, jak spróbuję czytelników przekonać, interesującym i ważnym. Zaawansowanie badań i zainteresowanie prenylacją jest spore — praktycznie każdy z numerów czasopism biochemicznych czy genetycznych drukuje artykuł dotyczący tej dziedziny. Ukazało się także sporo prac przeglądowych. Przedstawiona poniżej próba przeglądu literatury ograniczona jest oczywiście możliwościami i zainteresowaniami autora, zawiera głównie opis biochemii procesu prenylacji.

Tabela 1

Rodzaje lipidowych modyfikacji białek

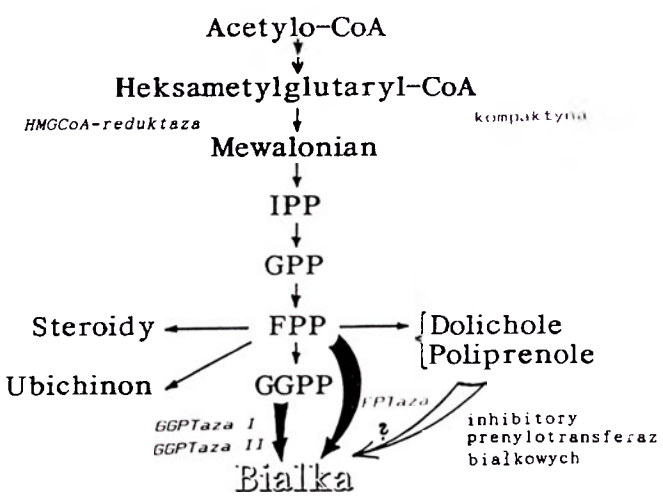
Modyfikacja	Funkcja komórkowa	Przykłady
palmitylacja	przekazywanie sygnałów	rodopsyna, białka Ras
	enzymy	galaktozylotransferaza
	białka strukturalne	fibronektyna
mirystylacja	przekazywanie sygnałów	białka G (podjednostka γ)
	enzymy	cAMP zal. kinaza białkowa
GPI-związane białka	enzymy	alkaliczna fosfataza
	adhezja komórkowa	LFA-3 (limfocyty)
prenylacja	przekazywanie sygnałów	białka G (γ podjednostka)
		białka Ras
	podziały komórkowe	lamina B, prelamina A

* Dr, Zakład Biochemii Lipidów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

http://rcin.org.pl

II. Krótka historia prenylacji

Pierwsze informacje mówiące o możliwości modyfikowania białek przez izoprenoidy pochodzą z końca lat 70 z badań nad strukturą czynników doboru płciowego u grzybów (*fungal mating factor*) [1]. Zidentyfikowano wtedy po raz pierwszy farnezyl (Far) — 15-to węglową grupę związaną z cysteiną peptydu wiązaniem tioeterowym. Modyfikacja ta była stechiometryczna i stabilna. Sugerowało to, że jest ona istotna dla komórki, choć określenie fizjologicznej roli prenylacji było trudne i pozostaje niejasne. Prowadzone w tym samym czasie badania nad organizmami ssaków wykazały, że i w tym przypadku pochodne kwasu mewalononowego mogły pełnić istotną rolę: stwierdzono hamowanie wzrostu komórek i zmiany ich morfologii [2, 3] pod wpływem kompaktyny (*compactin*) — inhibitora HMG-CoA reduktazy, kluczowego enzymu szlaku biosyntezy izoprenoidów (por. Ryc. 1). Efekt ten był odwracalny, tzn. dodatek kwasu mewalonowego (produktu HMG-CoA reduktazy) przywracał normalny wzrost i morfologię komórek. Dodawanie cholesterolu nie znosiło efektu inhibicji, co sugeruje, że aktywnym związkiem był produkt pochodzący z innej niż sterolowa gałęzi szlaku mewalonowego lub metabolit pośredni biosyntezy cholesterolu. Przełom w poszukiwaniach tego związku przyniosły eksperymenty ze znakowanym trytem kwasem mewalonowym: radioaktywne produkty metabolizmu mewalonianu znaleziono nie tylko we frakcji lipidowej, ale również białkowej [4]. Elektroforeza potwierdziła powstawanie znakowanych białek. Stosowanie techniki znakowania białek poprzez inkubację tkanek, komórek i frakcji podkomórkowych z trytowanym mewalonianem pozwoliło w następnych latach na ustalenie struktury chemicznej grupy modyfikującej i na bieżąco przynosi informacje o coraz to nowych grupach modyfikowych białek. Obecnie przyjmuje się, że ok. 2% białek komórkowych ulega prenylacji [5]. Prenylowane białka występują we wszystkich organizmach eukariotycznych, tj. u drożdży [6], ssaków [7] i roślin [8]. Mniej jest natomiast danych o prenylacji białek u prokariontów. Znajdowano je jak dotychczas jedynie w mykoplazma [9] i archebakteria [5].



Rys. 1. Uproszczony schemat biosyntezy lipidów szlaku mewalonowego. Kursywą oznaczono wybrane enzymy. Zaznaczono inhibitory opisywane w rozdz. V.

III. Bliżej o prenylacji

Oczyszczenie znakowanych trytem pochodzącym z mewalonianu białek i ich chemiczna oraz enzymatyczna hydroliza umożliwiły bliższą charakterystykę chemiczną wiązania lipid-białko. Jest ono wrażliwe na działanie niklu Raney'a [10], hydrazyny [11], jodometanu [12], alkaliów [13] — co odpowiada właściwościom wiązania tioeterowego. Chemoliza wiązania C-S powoduje uwolnienie izoprenoidów w formie węglowodorów (Ni i hydrazyna) lub alkoholi (CH_3J i KOH) co umożliwia badanie struktury grupy prenylowej. Wśród produktów uzyskiwanych po trawieniu proteolitycznym znajdywano prenylowaną cysteinę [14], potwierdziło to przekonanie o występowaniu wiązania typu Cys-S-Prenyl. Postuluje się dodatkowo możliwość wiązania grup prenylowych wiązaniem estrowym poprzez fosforan (por. niżej) [8, 13], lecz wyniki te są jak dotąd słabo udokumentowane.

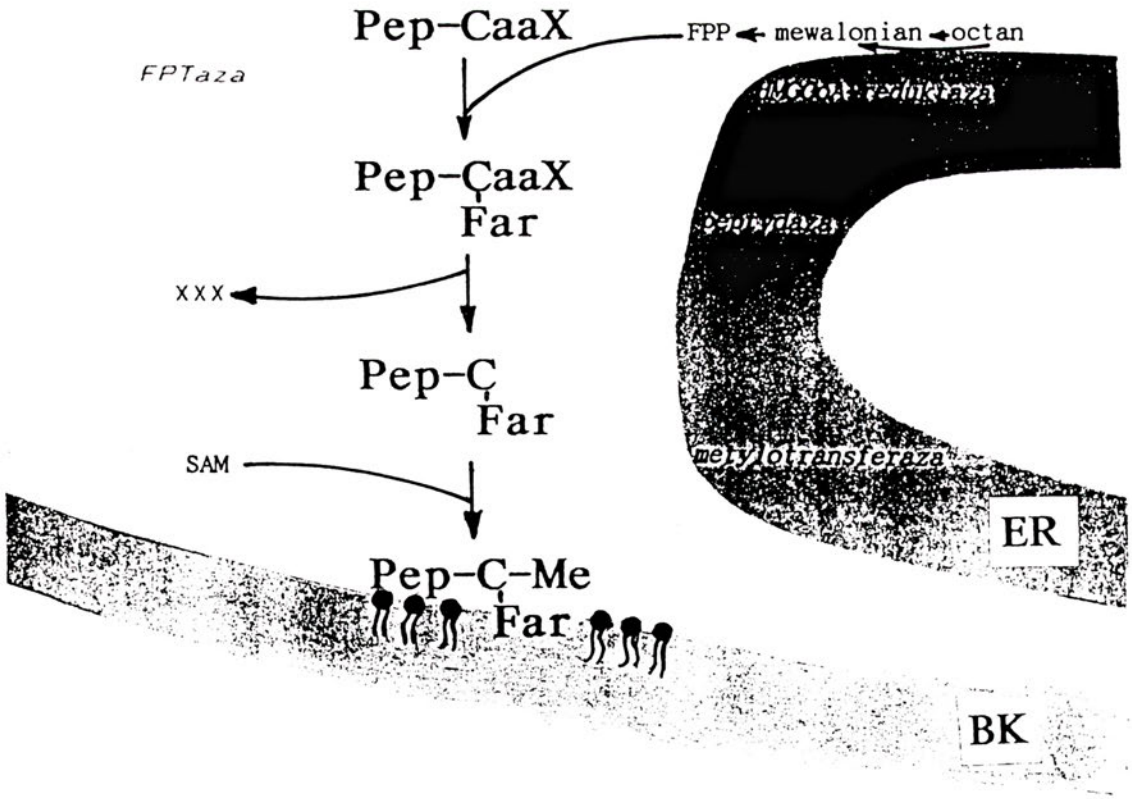
III-1. Struktura grup prenylowych modyfikujących białka

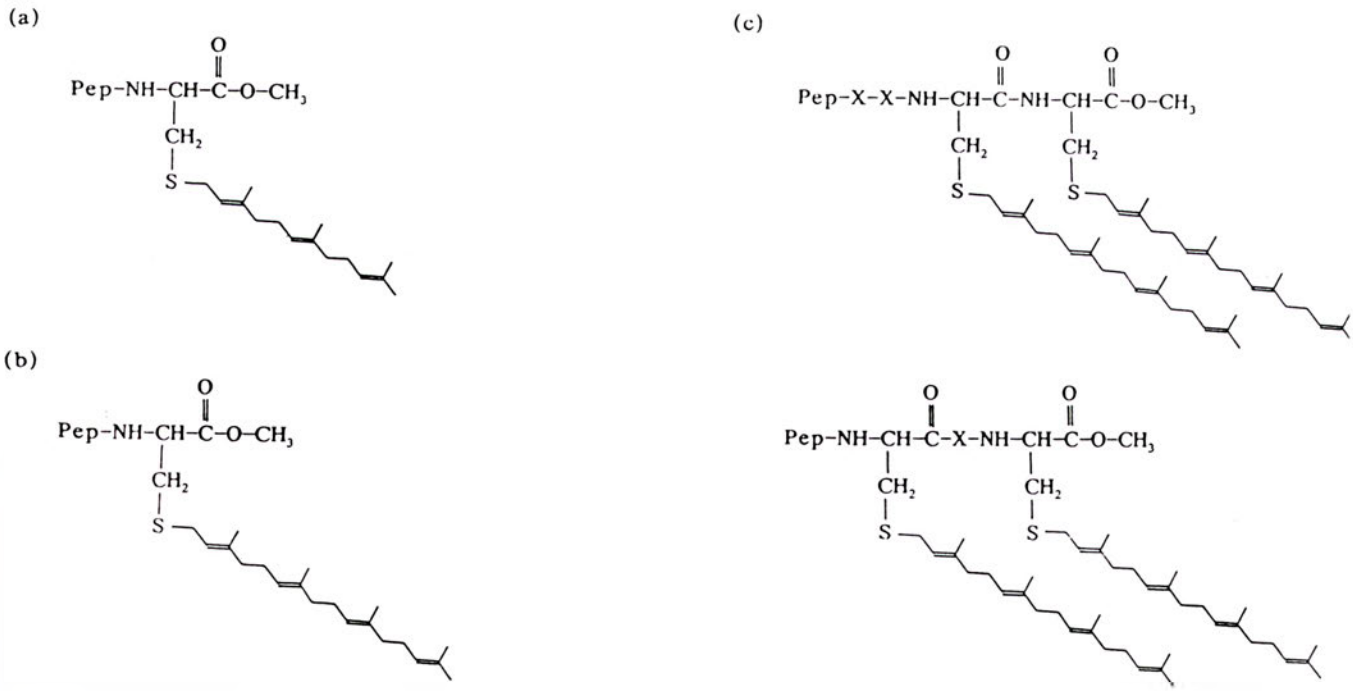
Jak wspomniano pierwszym poznanym izoprenoidem modyfikującym białka był farnezyl (C_{15}), a właściwie hydroksyfarnezyl [1] pochodna farnezolu — prekursora wspólnego dla wszystkich lipidów izoprenoidowych w komórce, tj. cholesterolu, dolicholu i ubichinonu. Dalsze badania pokazały, że nie jest to lipid ani jedyny, ani dominujący w tej roli. Okazało się, że geranylogeranyl (GG C_{20}) jest grupą najczęściej modyfikującą białka, występuje 5-10 razy częściej niż farnezyl [15]. Występowanie farnezylu i geranylogeranylu kowalencyjnie związanych z białkami jest powszechnie akceptowane i dobrze udokumentowane badaniami strukturalnymi (spektrometria masowa) części lipidowej [10,16]. Istnieją także doniesienia o występowaniu dłuższych izoprenoidowych grup modyfikujących białka, dolichyl (C_{95}) [7, 13] u ssaków czy prenyl-12 i fityl u roślin [8], mówi się również o występowaniu fosforanów tych związków. Sugeruje to możliwość przyłączania dolichylofosforanu do peptydu innym, niż powszechnie przyjętym wiązaniem tioeterowym. Doniesienia te oparte są na chromatograficznej identyfikacji produktów znakowania i wymagają dalszych badań.

III-2. Rodzaje prenylowanych białek

Poznane dotychczas prenylowane białka można podzielić na 4 klasy ze względu na wielkość cząsteczek: 66-72kDa, 53-55kDa, 41-46 kDa i 21-28kDa. Badania struktury pierwszorzędowej prenylowanych białek wykazały występowanie dwu rodzajów charakterys-

http://rcin.org.pl





Rys. 2. Przebieg procesu farnezylacji białek w komórce. Do peptydu z sekwencją CXXX przełączana jest grupa farnezylowa (Far), następnie po odszczepieniu trzech końcowych aminokwasów (XXX) przyłączana jest grupa metylowa. Kursywą zaznaczono enzymy biorące udział w reakcyjach. SAM — S-adanozylometionina, ER — retikulum endoplazmatyczne, BK — błona komórkowa.
W dolnej części rysunku przedstawiono struktury prenylowanych peptydów — produktów odpowiednio (a)FPTazy, (b)GGPTazy I, (c)GGPTazy II.

tycznych sekwencji aminokwasów na C-końcu cząsteczki: I-CXXX i II-XCXC lub XXCC. Pierwszy typ -CXXX: cysteina „C" jest prenylowana, ostatni w sekwencji aminokwas „X_3" — decyduje o rodzaju podstawionego prenylu, tj. alanina, seryna, cysteina, metionina, glutamina (w tych przypadkach przyłączany jest rodnik farnezylowy) lub leucyna albo fenyloalanina (białko jest geranylogeranylowane). Drugi rodzaj prenylowanych sekwencji to -XCXC i -XXCC. Mogą one być podstawione jedynie resztami geranylogeranylu. Poszukiwania enzymów katalizujących przeniesienie grup prenylowych i difosforanu poliprenylu (FPP lub GGPP) na łańcuch peptydowy zwanych ogólnie prenylotransferazami białkowymi (por. *cis*-prenylo-

http://rcin.org.pl

transferaza — enzym syntetyzujący łańcuch izoprenoidowy poprzez kolejne addycje pięciowęglowej jednostki izoprenoidowej) pozwoliły na zidentyfikowanie trzech enzymów cytosolowych [17-19]

farnezylotransferaza (FPTaza) dla sekwencji -CXXX
geranylogeranylotransferaza I (GGPTaza I) -CXXX
geranylogeranylotransferaza II (GGPTaza II) -XCXC i -XXCC.

Powstały prenylopeptyd (Ryc. 2), produkt działania FPTazy i GGPTazy I poddawany jest działaniu dwu kolejnych enzymów mikrosomalnych peptydazy i transmetylazy. Peptydaza odcina trzy końcowe aminokwasy z sekwencji -C(Prenyl)XXX [20]. Odblokowana w ten sposób grupa karboksylowa cysteiny jest metylowana [21]. Prenylopeptydy będące produktami GPTazy II prenylowane są prawdopodobnie na obu cysteinach [22], nie podlegają działaniu peptydazy. Peptydy z sekwencją -XC(GG)XC(GG) są karboksymetylowane [28, 31]; nie wyjaśniono jeszcze czy reakcja ta zachodzi dla peptydów -XXCC. Przebieg procesu prenylacji pokazany jest schematycznie na rysunku 2. Warto wspomnieć w tym miejscu o nieco bardziej złożonym przebiegu biosyntezy prelaminy A u ssaków. Jako białko zawierające charakterystyczną sekwencję CXXX (CSIM) jest farnezylowane, trzy końcowe aminokwasy są odcinane, a po metylacji usuwanych jest kolejnych 15 aminokwasów [23]. Wydaje się, że prenylacja i dalsze etapy biosyntezy prelaminy A przebiegają w jądrze komórkowym. Przykłady prenylowanych białek podane są w tabeli 2.

IV. Nieco o enzymach

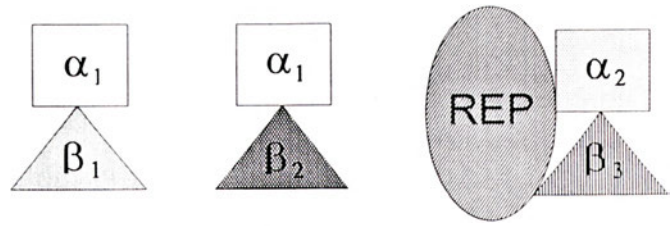
Oczyszczono i scharakteryzowano enzymy prenylujące białka z wielu organizmów. Trzy poznane dotąd prenylotransferazy wykazują wiele podobieństw strukturalnych (Ryc. 3).

Tabela 2

Przykłady białek modyfikowanych przez prenylotransferazy [67].

Sekwencja aminokwasów	Enzym	Przykład białka
Pep-CXXA	FPTaza	a-faktor (*S. cerevisiae*)
Pep-CXXS		Ras2, H-Ras (człowiek)
Pep-CXXC		Ras1 (*S. cerevisiae*)
Pep-CXXM		prelamina A, lamina B (kurczę)
Pep-CXXQ	GGPTaza I	Rap2 (człowiek)
Pep-CXXL		RhoA (wół)
Pep-CXXF		G25K (wół)
Pep-CAC	GGPTaza II	Rab3A (człowiek)
Pep-GGCC		Rab1B (szczur)
Pep-SNCC		Ypt1 (*S. cerevisiae*)

W tabeli stosowano literowe kody aminokwasów, tzn.: A = alanina, C = cysteina, F = fenyloalanina, G = glicyna, L = leucyna, M = metionina, N = asparagina, Q = glutamina, S = seryna; X = oznacza dowolny aminokwas alifatyczny



FPTaza GGPTaza I GGPTaza II

Ryc. 3. Prenylotransferazy białkowe.
Heterodimeryczne cząsteczki FPTazy i GGPTazy I zbudowane są z identycznych podjednostek typu α i podobnych podjednostek typu β. Heterotrimeryczna cząsteczka GGPTazy II poza podobnymi podjednostkami typu α i β zawiera dodatkowo podjednostkę REP (Rab *escort protein*) (opracowano wg [68]).

IV-1. FPTaza

Enzym przenoszący farnezyl z FPP na peptyd zakończony na C-końcu sekwencją -CXXX (X_3 = A, S, C, M lub G) jest heterodimerem [19]. Podjednostka α jest produktem genu RAM2 (*S. cerevisiae*); masa cząsteczkowa podjednostki α wynosi u szczura 49kDa, u drożdży -34 kDa. Podjednostka β jest produktem genu RAM1 (*S. cerevisiae*), o masie cząsteczkowej odpowiednio 46kDa u szczura i 43kDa u drożdży. Obie podjednostki są niezbędne do pełnej aktywności biologicznej [24]. Z badań kinetyki reakcji prenylacji wiadomo, że w pierwszym etapie reakcji podjednostka α wiąże FPP [25]. Ten początkowy etap nie wymaga obecności jonów dwuwartościowych [24]. Następnie podjednostka β enzymu wiąże peptyd (tylko w obecności jonów Zn^{2+}). Wydaje się, że sekwencja CXXX jest wystarczającym sygnałem do jego rozpoznania. Ostatni etap — przeniesienie fernezylu na peptyd zależne jest od jonów Mg^{2+} [24]. Badania oczyszczonego enzymu z mózgu szczura wykazały, że powinowactwo GGPP (czyli substratu GGPTazy) do FPTazy jest takie samo jak FPP, jednak geranylogeranyl nie jest przenoszony na białko przez FPTazę [24].

IV-2. Właściwości GGPTazy I

GGPTaza I — enzym przenoszący geranylogeranyl z GGPP na peptydy z sekwencją CXXX (X = L lub Q) wykazuje wiele podobieństw do FPTazy; jego właściwości są słabiej poznane ze względu na trudności w oczyszczaniu. Jest również heterodimerem, masa cząsteczkowa podjednostki α wynosi 48kDa u szczura i 38kDa u drożdży, dla podjednostki β znaleziono odpowiednio 40 kDa u szczura i 41kDa u drożdży. Podjednostki α FPTazy i GGPTazy są identyczne — dowodzą tego eksperymenty genetyczne (szczepy drożdży zmutowane w genie RAM2 były pozbawione aktywności FPTazy, a aktywność GGPTazy była obniżona o 67%) [26]) i immunologiczne [27] (przeciwciała poliklonalne przygotowane przeciw podjednostce α FPTazy z mózgu szczura powodowały immunoprecypitację obydwu aktywności enzymatycz-

http://rcin.org.pl

nych, tzn. FPTazy i GGPTazy). Podobnie jak poprzednio omawiana FPTaza, GGPTaza I jest wiążącym cynk metaloenzymem, do pełnej aktywności niezbędne są jony Zn^{2+} i Mg^{2+} [28]. GGPTaza preferuje GGPP, choć tworzenie kompleksu z FPP przebiega z wydajnością 25% w stosunku do GGPP [29]. Identyczność podjednostek α obu transferaz i możliwość inhibicji kompetycyjnej stwarza ciekawy problem regulacyjny w komórce. FPP jest kluczowym związkiem szlaku mewalonowego, począwszy od FPP rozdzielają się drogi biosyntezy lipidów chlesterolu, ubichinonu i dolicholu, a także farnezylowanych białek. Przyjmuje się, że stężenie FPP jest w komórce wyższe niż GGPP. Wydawałoby się wobec tego, że geranylogeranylowane białka nie mogą być wydajnie syntetyzowane. Równocześnie wiadomo, że geranylogeranylowanych białek jest w komórkach więcej niż farnezylowanych [30]. Postuluje się wobec tego, że wiązanie z różnymi podjednostkami β wpływa na specyficzność wiązania podjednostki α z difosforanami izoprenoidów [24], chociaż wytłumaczenie istniejących w komórce zależności nie jest możliwe na obecnym etapie zaawansowania badań.

IV-3. GGPTaza II (inaczej RabGGPTaza)

Enzym ten przyłącza geranylogeranyl do peptydów zawierających sekwencję -XCXC lub -XXCC na C-końcu cząsteczki [22]. W przeciwieństwie do poprzednich transferaz GGPTaza II jest heterotrimerem. Cząsteczka jej składa się z komponenty A i diameru αβ przypominającego podjednostki α i β GGPTazy I [31]. Substrat białkowy (jak dotąd białka Rab) rozpoznawany jest przez komponentę A obecnie nazywaną REP (Rab *escort protein*) łącząc się najprawdopodobniej z wewnętrzną sekwencją Rab [26] i modyfikowany przez komponent αβ [32] (α 60kDa, β 38kDa, REP 95kDa). Wszystkie trzy podjednostki potrzebne są do pełnej aktywności enzymu [33]. Sekwencja aminokwasów REP przypomina sekwencje białka kodowanego przez gen, którego defekt powoduje u ludzi choroideraemię (degradację siatkówki) oraz do GDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*, białka regulacyjnego dla małych białek wiążących GTP) [34]. Podobieństwo GDI i REP wydaje się uzasadnione ich funkcjami w komórce. GDI pozwala białkom Rab uwolnić się z błon do cytozolu, umożliwia cykliczne funkcjonowanie Rab w transporcie wewnątrzkomórkowym. Wobec tego obydwa białka GDI i REP muszą wykazywać duże powinowactwo do Rab. Trudno natomiast w tej chwili znaleźć uzasadnienie bliskiego związku REP i choroideremii. Rzeczywiście, limfoblasty choroideremiczne pozbawione są aktywności GTPazy II; wydaje się jednak zaskakujące, że defekt REP prowadzi do degradacji jedynie siatkówki; geranylogeranylowane Rab są istotne dla sekrecji i egzocytozy we wszystkich komórkach. Przypuszcza się, że w pozostałych tkankach (nie w siatkówce) powstaje białko REP-2, które może zastępować REP w geranylogeranylacji większości Rab.

V. Inhibitory prenylotransferaz białkowych

Poszukiwania inhibitorów enzymów prenylujących białka wydawały się szczególnie ważne. Z czysto poznawczych względów wygodnie jest posługiwać się inhibitorem badanego enzymu — pozwala to na pełniejszą charakterystykę strukturalną i funkcjonalną białka.

Zgromadzono już sporo informacji dotyczących inhibitorów prenylotransferaz (przeglądowe prace [35, 36]). Opisane poniżej podzielono na grupy zależnie od mechanizmu działania inhibitora.

V-1. Inhibitory peptydomimetyczne

Poszukiwania inhibitorów FPTazy rozwijały się w kilku kierunkach — proste stosunkowo wydawało się użycie syntetycznych peptydów oparte na obserwacjach, że czteroaminokwasowa sekwencja CXXX jest rozpoznawana i prenylowana przez enzym [24]. Kolejne modyfikacje CXXX dały w efekcie wiele tetrapeptydów działających jako inhibitory kompetycyjne, FPTazy, najsilniejszy z nich CVFM ($IC_{50} < 0{,}1\mu M$) nie jest farnezylowany [37]. Dalsze eksperymenty pozwoliły zsyntetyzować związki peptydomimetyczne — analogi tetrapeptydów z podstawnikami aromatycznymi lub inaczej modyfikowanymi aminokwasami alifatycznymi (X_1X_2). Związki te w przeciwieństwie do prenylowanych CXXX są odporne na działanie proteaz, lepiej wnikają do komórek, nie ulegają prenylacji a jedynie wiążą enzym [38, 39]. *In vitro* IC_{50} są rzędu 1nM, *in vivo* stężenia rzędu 1 μM przywracały normalny wzrost transformowanych nowotworowo komórek. Równocześnie nie zaobserwowano wpływu na inne enzymy szlaku mewalonowego np. HMG-CoA reduktazę, a także na poziom innych metabolitów tego szlaku w komórce takich jak skwalen i cholesterol. Inhibitory te nie są jednak absolutnie selektywne w stosunku do Ras co udowodniły doświadczenia z [^{3}H]mewalonianem — inhibicja FPTazy prowadziła do hamowania prenylacji białek Ras [39], choć również laminy prenylowane były w mniejszym stopniu. Różnice we wrażliwości farnezylacji różnych białek na inhibicję FPTazy tłumaczy się większym powinowactwem sekwencji CXXX lamin niż Ras do FPTazy — wyższe stężenia inhibitora potrzebne są do inhibowania farnezylacji lamin niż Ras [39].

Badania w tym kierunku rozwijają się bardzo intensywnie, obecnie z dużą nadzieją mówi się o wynikach uzyskanych w *S. cerevisiae*: geranylogeranylacja Ras przez GGPTazę I, obserwowana gdy FPTaza była funkcjonalnie nieaktywna, pozwoliła na normalny wzrost komórek [40]. Modyfikacja Ras przez geranylogeraniol zamiast fernazol jest mało wydajna, ale wystarcza do podtrzymania aktywności biologicznej

http://rcin.org.pl

normalnych Ras w przeciwieństwie do onkogennych Ras. Badania *in vitro* również potwierdzają brak specyficzności FPTazy i GGPTazy I (por. IV-2). Potwierdza to możliwość zastępczej geranylogeranylacji Ras, która umożliwia wzrost komórek w obecności inhibitora FPTazy.

Opisano też naturalne inhibitory z tej samej grupy: pentapeptydowe analogi Ras tzw. penticinnamius (*Streptomyces*, IC_{50} 0.1-1 μM) [41], nie były dotąd testowane *in vivo*.

V-2. Analogi FPP

Inhibitory drugiego typu są analogami drugiego substratu FPTazy tj. FPP. Testowano niehydrolizowalne związki kwas α-hydroksyfarnezylofosfoniowy i jego pochodne [42] — hamowały one obróbkę Ras *in vivo* przy stężeniu 1 μM. Inhibitorami z tej samej grupy okazały się związki naturalne [43] produkowane przez szczepy *Streptomyces* — antybiotyk manumycyna i pochodne (IC_{50} 5 μM). Antybiotyk ten wykazuje dużą specyficzność w stosunku do FPTazy (50-krotnie wyższe stężenia są potrzebne, by inhibować GGPTazę I), chociaż jak dotąd nie udowodniono inhibicji farnezylacji Ras w komórkach zwierzęcych, stwierdzono tylko zmniejszenie rozmiaru Ras-zależnych guzów u myszy. *Chaetomela acutisela* wytwarza kwasy katomelowy (chaetomellic) i saragosowy (zaragozic) [42], które *in vitro* są silnymi inhibitorami FPTazy (IC_{50} 10-60 nM), są również wysoce selektywne w stosunku do GGPTazy (100 ×). Jednak ich polarność utrudnia przenikanie przez błonę. Istnieją również związki hamujące prenylację białek poprzez zmniejszenie puli endogennych FPP i GGPP — kompaktyna i mewinolina — specyficzne inhibitory HMGCoA reduktazy, kluczowego enzymu w biosyntezie izoprenoidów [44]. Jednak używanie ich w terapii nowotworów wydaje się mniej celowe ze względu na równoczesne, niekorzystne dla komórki obniżenie poziomu wszystkich lipidów izoprenoidowych takich jak steroidy, ubichinony i dolichole. Warto też wspomnieć o limonenie (występującym w skórce pomarańczy). Wcześniej opisywane zapobiegawcze i lecznicze działanie przeciwrakowe (indukowanego chemicznie raka sutka, płuc i żołądka) [45] tego związku znalazło potwierdzenie w badaniach na transformowanych liniach komórkowych [46]. Limonen selektywnie inhibuje prenylację Ras nie wpływając na prenylację lamin. Jest *in vivo* intensywnie metabolizowany a jego metabolity są też inhibitorami FPTazy prawdopodobnie dzięki kompetycji z FPP.

V-3. Inne inhibitory

Opisano związki pochodzenia naturalnego, hamujące prenylację białek, o niezbadanym dotąd mechanizmie działania tj. glitoksyny [47] (IC_{50} 1 μM). Należą one do grupy toksyn epitiodiketopiperazynowych, wykazujących szerokie spektrum działania, wpływających na wzrost grzybów, bakterii i wirusów. Syntetyczny inhibitor, farnezylamina, hamuje farnezylację i geranylogeranylację a także wzrost transformowanych nowotworowo komórek [48]; wykazano pewną specyficzność inhibitora w stosunku do prenylacji Ras.

V-4. Znaczenie inhibicji prenylacji białek Ras

Stwierdzenie, że białka Ras i wiele innych spośród rosnącej liczebnie superrodziny małych białek wiążących GTP są prenylowane zasugerowało możliwość wykorzystania efektu inhibicji prenylacji w chemioterapii nowotworów.

Kontrola wzrostu i różnicowania komórek wymaga współdziałania zespołu wielu czynników wewnątrzkomórkowych. W odpowiedzi na wiązanie zewnątrzkomórkowych czynników wzrostu do receptorów na powierzchni komórki uruchamiane jest działanie białek Ras, które funkcjonują jako „molekularny przełącznik" oscylując między formą aktywną (Ras-GTP) i nieaktywną (Ras-GDP) poprzez wiązanie i hydrolizę GTP [49]. Punktowa mutacja, która zmniejsza aktywność GTPazową Ras powoduje zablokowanie Ras w formie aktywnej [50]. Efektem tego jest nie podlegająca regulacji stymulacja wzrostu komórek, która jak się sądzi wpływa na rozwój nowotworów złośliwych. Stwierdzono występowanie mutacji w Ras w ok. 50% nowotworów okrężnicy i ok. 90% nowotworów trzuski. Równocześnie dla aktywności białek Ras niezbędna jest lokalizacja błonowa. Białka Ras nie posiadają domeny transmembranowej można więc sądzić, że farnezylacja jest odpowiedzialna za ich asocjację z wewnętrzną stroną błony cytoplazmatycznej [51].

Myśląc o hamowaniu farnezylacji białek Ras nie należy zapominać o konieczności zapewnienia selektywności potencjalnego inhibitpora FPTazy w stosunku do GGPTazy I i II, również o tym, że poza Ras farnezylowane przez FPTazę są mn. laminy, białka RhoB, kinaza rodopsynowa, podjednostka γ gamma transducyny, i in.

VI. Wpływ prenylacji białek na procesy biologiczne i biochemiczne

Badania nad biologiczną rolą prenylacji prowadzone są w wielu laboratoriach. Powszechnie zaakceptowany w literaturze jest pogląd, że rolą prenylacji (podobnie jak innych modyfikacji poprzez wiązanie lipidów) jest ułatwienie wiązania białek z błonami biologicznymi (artykuły przeglądowe [18, 19]). Wydaje się, że palmitylowane i mirystylowane białka mają „lipidowe kotwice" lepiej wpasowujące się w acylowe łańcuchy fosfolipidów [52] niż izoprenoidy o cząsteczkach dłuższych, bardziej rozgałęzionych. Równocześnie ściśle określona lokalizacja subkomórkowa prenylowanych białek w błonie komórkowej, retikulum endoplazmatycznym, błonach aparatu Golgiego, jąd-

http://rcin.org.pl

rowych a nawet w cytozolu sugeruje możliwość występowania bardziej złożonych oddziaływań białko-białko z białkami błonowymi i cytolozowymi [53, 54]. Badania mające na celu wyjaśnienie natury tych oddziaływań prowadzono w różnych układach biologicznych najbardziej zaawansowane są w przypadku białek Ras. Stwierdza się, że ich farnezylacja wpływa na wiązanie z błoną, ale nie wystarcza do ścisłej asocjacji [55]. Interpretację wyników utrudnia w tym modelu fakt, że cząsteczki białek Ras posiadają dodatkowo wiążące je z błonami wewnętrzną sekwencję poli-lizyny (K-Ras) lub związane z cysteiną powyżej sekwencji CXXX grupę palmitylową (Ha-Ras i N-Ras). Usunięcie w drodze mutacji któregoś z tych elementów jedynie osłabia wiązanie z błoną. Podobnie dla geranylogeranylowanych białek Rap1B — po frakcjonowaniu komórek znaleziono białka Rap zarówno we frakcji błon jak i w cytozolu [56]. Białko G25K, o którym wiadomo, że jest geranylogeranylowane, po ekspresji w białaczkowych komórkach mysich jest znajdowane pomimo prenylacji głównie w cytozolu; stosowanie mewinoliny, tzn. hamowanie biosyntezy geranylogeranylu zwiększa pulę cytozolową tego białka prawdopodobnie dzięki osłabionej asocjacji z błoną komórkową [57]. Białka Rab (rodzina małych białek wiążących GTP) geranylogeranylowane w sekwencji XCXC — mimo, że prenylowane, w komórkach mózgu szczura występują zarówno we frakcji błon jak i w cytozolu [58]. Niekiedy proporcja prenylowanych białek znajdowanych w cytozolu do obecnych w błonach zależy od warunków zewnętrznych np. 60% białek szoku cieplnego Ydj1 (*S. cerevisiae*) jest związane z błonami retikulum endoplazmatycznego w temperaturze 3°C, a tylko 20% w temp. 23°C [59]. Skoro w tych przypadkach prenylacja jest koniecznym, ale nie dostatecznym warunkiem lokalizacji błonowej białka sugeruje się istnienie dodatkowego białka regulatorowego [60], które mogłoby pomagać w „ekstrakcji" prenylowanego białka z błony. Tu zastanawia podobieństwo białka REP (podjednostki GGPTazy II por. IV-3) do GDI pełniącego taką właśnie funkcję ułatwiania cyrkulowania białek Rab w komórkach. Rozważa się także możliwość dodatkowych modyfikacji chemicznych różnych dla cytozolowych i związanych z błoną białek Rab. Możnaby na przykład brać pod uwagę niezwykle atrakcyjną ewentualność deprenylacji prenylowanych białek. Wiązanie tioeterowe między cysteiną a grupą prenylową jest trwałe w warunkach fizjologicznych. Nie udało się stwierdzić odszczepienia farnezylu z cząsteczek farnezylowanych białek Ras [56]. Jednak równocześnie opisano enzymy katalizujące utlenianie tioeterów [61], których działanie mogłoby pozwolić na regenerację wolnej grupy sulfuhydrylowej w C-końcowej cysteinie. Jak wspomniano wcześniej (III) prenylacji tego typu białek towarzyszy karboksymetylacja cysteiny. Nie ma jak dotąd jednoznacznych dowodów na odwracalność reakcji metylacji w warunkach fizjologicznych. W niektórych pracach nie obserwuje się produktów przemiany grupy metylowej, ale opisano też niespecyficzne [62] i specyficzne [63] karboksypeptydazy mogące trawić wiązanie C-końcowego estru metylowego. Również laminy były układem eksperymentalnym do badania biologicznej roli prenylacji. Równocześnie występowanie CXXX i sekwencji zasadowej jako sygnału lokalizacji błonowej i komplikuje sytuację. Udowodniono jednak, że farnezylacja cysteiny w sekwencji CXXX nie jest dostatecznym warunkiem lokalizacji białka w błonie jądrowej. Prelamina zmodyfikowana w CXXX, a więc nieprenylowana, po ekspresji zmutowanego genu jest importowana do jądra komórkowego, ale pozostaje niezasocjowana z błoną; mutacje w łańcuchu peptydowym z zachowaniem niezmienionej sekwencji CXXX dawały produkty białkowe również nie asocjujące z błoną [64]. Kolejny obiekt — czynnik doboru płciowego grzybów (*fungal mating factor*) był chronologicznie pierwszym układem stosowanym do badań strukturalno-funkcjonalnych [65]. Pokazano wtedy, że prenylacja była ważna dla jego funkcji. Zmiany typu rodnika izoprenoidowego na grupy o innej długości łańcucha (C_{20}, C_{10} czy C_5) zmieniały tylko poziom aktywności biologicznej. Tak drastyczna modyfikacja jak zmiana grupy farnezylowej na metylową, benzylową czy C_{16} alkilową ciągle jeszcze pozwoliła zachować częściową aktywność a-faktora u *S. cerevisiae*, podczas gdy a-faktor w ogóle nie modyfikowany nie był z komórek wydzielany i nie wykazywał aktywności biologicznej [35].

VII. Uwagi końcowe

Modyfikacja białek poprzez prenylację zwiększa znaczenie hydrofobowość ich cząsteczek, a tym samym powinowactwo do błon biologicznych. Równocześnie istnieją przesłanki by sądzić, że nie tylko prosta asocjacja lipidów jest odpowiedzialna za wiązanie prenylowanych białek z błonami. Jak wspomniano wcześniej (VI) być może istotne są również oddziaływania białko-białko, a więc proponuje się istnienie białkowych receptorów na powierzchni błon, które oddziaływują z łańcuchem izoprenoidowym [66]. Istnieje coraz więcej dowodów świadczących o istnieniu takich receptorów, Stwierdzono np. że cyklaza adenylanowa jest stymulowana przez Ras2 (*S. cerevisiae*); farnezylowany Ras2 wykazuje 100-krotnie wyższe powinowactwo do cyklazy niż niefarnezylowany [52, 54] — efekt ten obserwowano również wówczas, gdy cyklaza była solubilizowana, co wskazuje, że oddziaływanie Ras2-błona nie jest decydujące dla tej reakcji.

Badania nad fizjologiczną rolą prenylowanych białek przynoszą ciekawe informacje, które być może uda się wykorzystać w terapii chorób nowotworowych. Stąd duże zainteresowanie tym kierunkiem, współpraca biochemików, genetyków i biologów molekularnych. Biochemia lipidów określanych dotychczas jako „metabolity wtórne" jest podstawowym narzędziem

http://rcin.org.pl

w badaniach prenylowanych białek. Wydaje się również, że długołańcuchowe poliprenole i dolichole odnajdują swoje istotne, długo poszukiwane, miejsce w najważniejszych dla komórek procesach fizjologicznych.

Podziękowania
Dziękuję Profesorowi Tadeuszowi Chojnackiemu za dyskusję i wskazówki, Pani Józefinie Hertel i Panu Andrzejowi Talarczykowi za pomoc w przygotowaniu rysunków.

Praca finansowana w ramach Grantu KBN Nr 6P20302404

Artykuł otrzymano 7 października 1994 r.
Zaakceptowano do druku 12 grudnia 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Kamiya Y, Sakurai A, Tamura S, Takahashi N (1978) *Biochem Biophys Res Commun* **83**: 1077-1083
2. Kaneko I, Hazama-Shimada Y, Endo A (1978) *Eur J Biochem* **87**: 313-321
3. Maltese WA, Sheridan KM (1987) *J Cell Physiol* **133**: 471-481
4. Schmidt RA, Schneider CJ, Glomset JA (1984) *J Biol Chem* **259**: 10175-10180
5. Epstein WW, Lever D, Leining LM, Bruenger E, Rilling HC (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9668-9670
6. Schafer WR, Trueblood CE, Yang C-C, Mayer MP, Rosenberg S, Poulter CD, Kim S-H, Rine J (1990) *Science* **249**: 1133-1139
7. Bruenger E, Rilling HC (1986) *Biochem Biophys Res Commun* **139**: 209-214
8. Świeżewska E, Thelin A, Dallner G, Andersson B, Ernster L (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 161-166
9. Nystrom S, Wislander A (1992) *Biochem Biophys Acta* **1107**: 39-43
10. Farnsworth CC, Gelb MH, Glomset JA (1990) *Science* **247**: 320-322
11. Leining LM, Epstein WW, Rilling HC (1994) *Arch Biochem Biophys* **311**: 199-204
12. Maltese WA, Erdman RA (1989) *J Biol Chem* **264**: 18168-18172
13. Thelin A, Low P, Chojnacki T, Dallner G (1991) *Eur J Bioch* **195**: 755-761
14. Epstein WW, Lever DC, Rilling HC (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7352-7354
15. Farrell FX, Yamamoto K, Lapetina EG (1993) *Biochem J* **289**: 349-355
16. Rilling HC, Breunger E, Epstein WW, Crain PF (1990) *Science* **247**: 318-320
17. Schafer WR, Rine J (1992) *Annu Rev Genet* **30**: 209-23722
18. Clarke S (1992) *Annu Rev Bioch* **61**: 355-386
19. Omer CA, Gibbs JB (1994) *Mol Microbiol* **11**: 219-225
20. Ashby MN, King DS, Rine J (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4613-4617
21. Hrycyna C, Sapperstein S, Clarke S, Michaelis S (1991) *EMBO J* **10**: 1699-1709
22. Farnsworth CC, Kawata M, Yoshida Y, Takai Y, Gelb MH, Glomset JA (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6196-6200
23. Sinensky M, Fantle K, Trujillo M, McLain T, Kupfer A, Dalton M (1994) *J Cell Sci* **107**: 61-67
24. Reiss Y, Brown MS, Goldstein JL (1992) *J Biol Chem* **267**: 6403-6408
25. Casey PJ (1992) *J Lipid Res* **33**: 1732-1740
26. Moores SL, Schaber MD, Mosser SD, Rands E, O'Hara MB, Garsky VM, Marshall MS, Pompliano DL, Gibbs JB (1991) *J Biol Chem* **266**: 14603-14610
27. Seabra MC, Reiss Y, Casey PJ, Brown MS, Goldstein JL (1991) *Cell* **65**: 429-434
28. Moomaw JF, Casey PJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 17438-17443
29. Yokoyama K, Gelb M (1993) *J Biol Chem* **268**: 4055-4060
30. Gibbs JB (1991) *Cell* **65**: 1-4
31. Armstrong SA, Seabra MC, Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS (1993) *J Biol Chem* **268**: 12221-12229
32. Seabra MC, Brown MS, Slaughter CA, Sudhof TC, Goldstein JL (1992) *Cell* **70**: 1049-1057
33. Jiang Y, Rossi G, Ferro-Novick S (1993) *Nature* (Lond) **366**: 84-86
34. Armstrong J (1993) *Current Biol* **3**: 33-35
35. Tamanoi F (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 349-353
36. Gibbs JB, Oliff A, Kohl NE (1994) *Cell* **77**: 175-178
37. Goldstein JL, Brown MS, Stradley SJ, Reiss Y, Gierasch (1991) *J Biol Chem* **266**: 15575-15578
38. Kohl NE, Mosser SD, de Solms J, Giuliani EA, Pompliano DL, Graham SL, Smith RL, Scolnick EM, Oliff A, Gibbs JB (1993) *Science* **268**: 1934-1936
39. James GL, Goldstein JL, Brown MS, Rawson TE, Somers TC, McDowell RS, Crowley CW, Lucas BK, Lewinson AD, Masters JC, Jr (1993) *Science* **268**: 1937-1942
40. Trueblood CE, Ohya Y, Rine J (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 4260-4275
41. Omura S, van der Pyl D, Inokoshi J, Takashima H (1993) *J Antibiot* **46**: 222-228
42. Gibbs JB, et al., (1993) *J Biol Chem* **268**: 7617-7620
43. Hara M, Akasaka K, Akinaga S, Okabe M, Nakano H, Gomez R, Wood D, Uh M, Tamanoi R (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2281-2285
44. Lowy DR, Willumsen BM (1993) *Ann Rev Biochem* **62**: 851-891
45. Elegbede JA, Elson CE, Qureshi A, Tanner MA, Gould MN (1984) *Carcinogenesis* **5**: 661-664
46. Crowell PL, Chang RR, Ren Z, Elson CE, Gould MN (1991) *J Biol Chem* **266**: 17679-17685
47. Van der Pyl D, Omura S, Takashima H (1992) *J Antibiotics* **45**: 1802-1805
48. Kothapalli R, Guthrie N, Chambers AF, Carroll K (1993) *Lipids* **28**: 969-973
49. Barbacid M (1987) *Ann Rev Biochem* **56**: 779-827
50. Boguski MS, McCormick F (1993) *Nature* (Lond) **366**: 643-654
51. Marsters JC, Jr, McDowell RS, Reynolds ME, Somers TC, Goldstein JL, Brown MS, James GL (1994) *Current Biol* **4**: 8-9
52. Kuroda Y, Suzuki N, Kataoka T (1993) *Science* **259**: 683-686
53. Goldstein JL, Brown MS (1990) *Nature* (Lond) **343**: 425-430
54. Marshall CJ (1993) *Science* **259**: 1865-1866
55. Hancock JF, Cadwallader K, Marshall CJ (1991) *EMBO J* **10**: 641-646
56. Fisher TH, Gatling MN, Lacal J-C, White GC II (1990) *J Biol Chem* **265**: 19405-19408
57. Maltese WA, Sheridan KM (1990) *J Biol Chem* **265**: 17883-17890
58. Burstein E, Macara IG (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 4807-4811
59. Caplan AJ, Tsai J, Casey P, Douglas MG (1992) *J Biol Chem* **267**: 18890-18895
60. Araki S, Kikuchi A, Hata Y, Isomura M, Takai Y (1990) *J Biol Chem* **265**: 13007-13015
61. Cashman JR, Olsen LD, Bornheim LM (1990) *Chem Res Toxicol* **3**: 344-349
62. Rossi G, Jiang Y, Newman AP, Ferro-Novick S (1991) *Nature* (Lond) **351**: 158-161
63. Tan EW, Rando RR (1992) *Biochemistry* **31**: 5572-5575
64. Holtz D, Tanaka RA, Hartwig J, McKeon F (1989) *Cell* **59**: 969-977
65. Fujino M, et al (1980) *Naturwissenschaften* **67**: 405-408
66. Hancock JF, Cadwallader K, Paterson HF, Marshall J (1991) *EMBO J* **10**: 4033-4038
67. Cox AD, Der CJ (1992) *Current Opinion in Cell Biol* **4**: 1009-1016
68. Brown MS, Goldstein JL (1993 *Nature* (Lond) **336**: 14-15

http://rcin.org.pl

Konformacje cytochromu *c* i jego oddziaływania z oksydazą cytochromową

Cytochrome *c* conformations and its interactions with cytochrome *c* oxidase

ARTUR OSYCZKA[1],
BOHDAN TURYNA[2]

Spis treści:

I. Wprowadzenie
II. Cytochrom *c*
- II-1. Synteza i transport apocytochromu *c* do mitochondrionu
- II-2. Natywna struktura cytochromu *c*
- II-3. Konformacja ferro- i ferricytochromu *c*
- II-4. Konformacja cytochromu *c* zależna od pH

III. Oddziaływania cytochromu *c* z oksydazą cytochromową
- III-1. Struktura i funkcja oksydazy cytochromowej
- III-2. Zmiany konformacyjne kompleksu cytochrom *c* — oksydaza
- III-3. Hipotezy opisujące prawdopodobne oddziaływania cytochromu *c* z oksydazą cytochromową

IV. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. Cytochrome *c*
- II-1. Biosynthesis and import of apocytochrome *c* into mitochondrion
- II-2. Native structure of cytochrome *c*
- II-3. Conformation of ferro- and ferricytochrome *c*
- II-4. pH dependent transitions of cytochrome *c*

III. Cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase interactions
- III-1. Structure and function of cytochrome *c* oxidase
- III-2. Conformational changes upon formation of cytochrome *c* — cytochrome *c* oxidase complex
- III-3. Hypotheses of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase interactions

IV. Concluding remarks

I. Wprowadzenie

Mitochondrialny cytochrom *c* jest rozpuszczalną w wodzie hemoproteiną o masie cząsteczkowej około 12 kDa i potencjale oksydacyjno-redukcyjnym +260 mV. Jej cząsteczka składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o długości 103—113 aminokwasów i grupy hemowej, związanej z nim kowalencyjnie poprzez wiązania tioeterowe między resztami winylowymi hemu a grupami -SH łańcuchów bocznych cystein (Cys14 i Cys 17). Cytochrom *c* jest białkiem silnie zasadowym o wartości pI około 10. Za dodatni ładunek cząsteczki odpowiedzialne są przede wszystkim reszty lizynowe oraz dodatkowo reszty argininowe i histydynowe. Specyficzny rozkład ładunków na powierzchni cytochromu *c* ma kluczowe znaczenie w procesach elektrostatycznych interakcji pomiędzy białkowymi kompleksami mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Podstawową funkcją biologiczną cytochromu *c* jest przekazywanie elektronu z kompleksu III, reduktazy cytochromowej (cytochromy *b* i c_1), na kompleks IV tj. oksydazę cytochromową (cytochromy *a* i a_3) [1]. Wykazano również, że cytochrom *c* może oddziaływać z oksydazą tiolową [2], cytochromem b_5 [2, 3-5] w komórkach zwierzęcych oraz peroksydazą cytochromową [2, 6-9] i cytochromem b_2 [2] w komórkach drożdży (Ryc. 1).

Cytochrom *c* izolowano z komórek i tkanek różnego pochodzenia opisując konformację, własności fizyko-chemiczne, a także strukturę nukleotydową jego genu. Zainteresowania budził również sposób transportu apocytochromu *c* z cytoplazmy do mitochondrionu oraz mechanizmy oddziaływań cytochromu *c* z jego fizjologicznymi partnerami (w szczególności z oksydazą cytochromową).

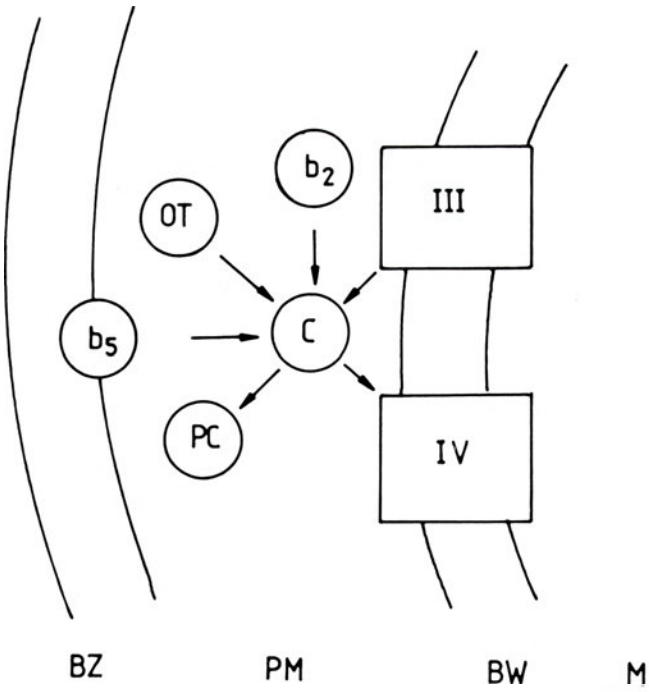
Oksydaza cytochromu *c* jest jednym z kompleksów enzymatycznych (kompleks IV) mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Katalizuje reakcję utleniania ferrocytochromu *c* do ferricytochromu *c*, z jednoczesną czteroelektronową redukcją cząsteczki tlenu do wody. Procesom tym towarzyszy transport protonów z mitochondrialnej matriks do przestrzeni międzybłonowej, co w konsekwencji przyczynia się do powstania gradientu protonowego wykorzystywanego przez kompleks ATP-azy do syntezy ATP.

Oddziaływania cytochromu *c* z kompleksem IV łańcucha oddechowego są od wielu lat przedmiotem intensywnych badań mających na celu:

— opis kinetyki utleniania cytochromu *c* przez oksydazę,

[1] Mgr, Zakład Biofizyki, [2] dr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej UJ, 31-120 Kraków, al. Mickiewicza 3

http://rcin.org.pl



Ryc. 1. Fizjologiczni partnerzy cytochromu *c* w mitochondrialnym transporcie elektronów (wg [2]). Strzałki wskazują kierunek przepływu elektronów. BZ — błona zewnętrzna; BW — błona wewnętrzna; PM — przestrzeń międzybłonowa; M — matriks; c — cytochrom *c*; III — reduktaza cytochromu *c*; IV — oksydaza cytochromu *c*; PC — peroksydaza cytochromu *c*; b_5 — cytochrom b_5; OT — oksydaza tiolowa; b_2 — cytochrom b_2.

— wyjaśnienie mechanizmu wiązania cytochromu *c* przez oksydazę i towarzyszących temu zmian konformacyjnych tworzonego kompleksu,
— wyjaśnienie mechanizmu sprzężenia transportu elektronu przez oksydazę z procesem pompowania protonów w poprzek błony mitochondrionu.

Przedmiotem niniejszego opracowania będzie opis struktury cytochromu *c* ze szczególnym uwzględnieniem jego stanów konformacyjnych. Przestawione zostaną również proponowane hipotezy oddziaływań cytochromu *c* z kompleksem IV, na podstawie których próbuje się tłumaczyć mechanizmy molekularne leżące u podstaw procesu przekazywania elektronu między tymi białkami.

II. Cytochrom *c*

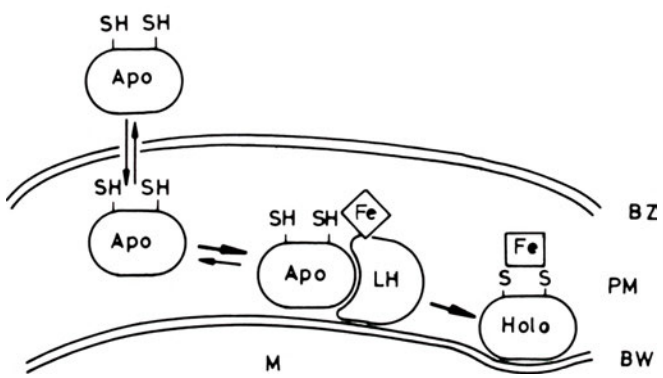
II-1. Synteza i transport apocytochromu *c* do mitochondrionu

Apocytochrom *c* jest kodowany przez genom jądrowy i syntetyzowany na wolnych rybosomach cytoplazmatycznych. Produktem translacji jest polipeptyd, który nie podlega żadnym potranslacyjnym modyfikacjom z wyjątkiem metylacji, i to u niektórych tylko organizmów [10]. Transport apocytochromu *c* do przestrzeni międzybłonowej różni się swoim mechanizmem od transportu innych białek mitochondrialnych. W odróżnieniu od większości prekursorowych białek, transportowanych z cytoplazmy do mitochondrionu, apocytochrom *c* nie zawiera tzw. sekwencji sygnałowej [11, 12], która na ogół jest konieczna do swoistego związania z białkiem receptorowym na powierzchni błony organelli docelowej. Przypuszcza się, że funkcję sekwencji sygnałowej pełnią niektóre aminokwasy wchodzące w skład pełnej sekwencji apocytochromu *c* [13]. Wykazano, że istotną rolę w transporcie tego białka przez zewnętrzną błonę mitochondrialną odgrywają sekwencje: od 1 do 58 aminokwasu (w szczególności Lys5, Lys7 i Lys8) i od 66 do 90 aminokwasu [13].

Transport apocytochromu *c* do przestrzeni błonowej mitochondrionu nie zależy ani od ATP, ani też od potencjału błonowego [11, 12, 14]. Istotne zaś są oddziaływania elektrostatyczne między cząsteczką cytochromu *c* a ujemnie naładowaną warstwą lipidową zewnętrznej błony mitochondrialnej [15-18].

Tworzenie holocytochromu *c* zachodzi w przestrzeni międzybłonowej mitochondrionu i polega na powstawaniu kowalencyjnych wiązań pomiędzy cysteinami apocytochromu *c* a grupami winylowymi zredukowanego hemu [19]. Reakcję katalizuje enzym liaza hemowa cytochromu *c* [EC4.4.1.17].

Kwestią dyskusyjną pozostaje nadal stopień powiązania ze sobą etapów: transportu apocytochromu *c* przez błonę i tworzenia holocytochromu *c* w przestrzeni międzybłonowej mitochondrionu. Jedni autorzy sugerują, że przemieszczanie apocytochromu *c* przez zewnętrzną błonę mitochondrionu jest ściśle uzależnione od wiązania hemu zachodzącego po jej wewnętrznej stronie [12, 20]. Odmienny pogląd zakłada względną niezależność obu procesów [21, 22]. W tym ujęciu transport apocytochromu *c* przez błonę byłby etapem całkowicie odwracalnym (tzn. mogącym zachodzić w obu kierunkach), po którym następowałoby uwięzienie apocytochromu *c* w przestrzeni międzybłonowej poprzez nieodwracalne przyłączenie hemu i utworzenie natywnej konformacji białka [22] (Ryc. 2). Hipotezę tę popierają wyniki wskazujące, że sam proces transportu apocytochromu *c* nie zależy od obecności liazy hemowej oraz czynników redukujących hem [21]. Co więcej, obecność w apocytochromie



Ryc. 2. Hipotetyczny mechanizm transportu apocytochromu *c* do mitochondrionu (wg [22]). BZ, BW, PM, M — oznaczenia jak na rycinie 1. Apo — apocytochrom *c*; LH — liaza hemowa; Holo — holocytochrom *c*.

http://rcin.org.pl

c cystein kowalencyjnych wiążących hem, nie jest warunkiem koniecznym do transportu tego białka przez błonę [21].

II-2. Natywna struktura cytochromu *c*

Natywna struktura cytochromu *c* jest rezultatem specyficznego zwijania się łańcucha polipeptydowego (apocytochromu *c*) wokół rdzenia hemowego. Proces ten przebiega stopniowo i opisywany jest następującą sekwencją zdarzeń [1].

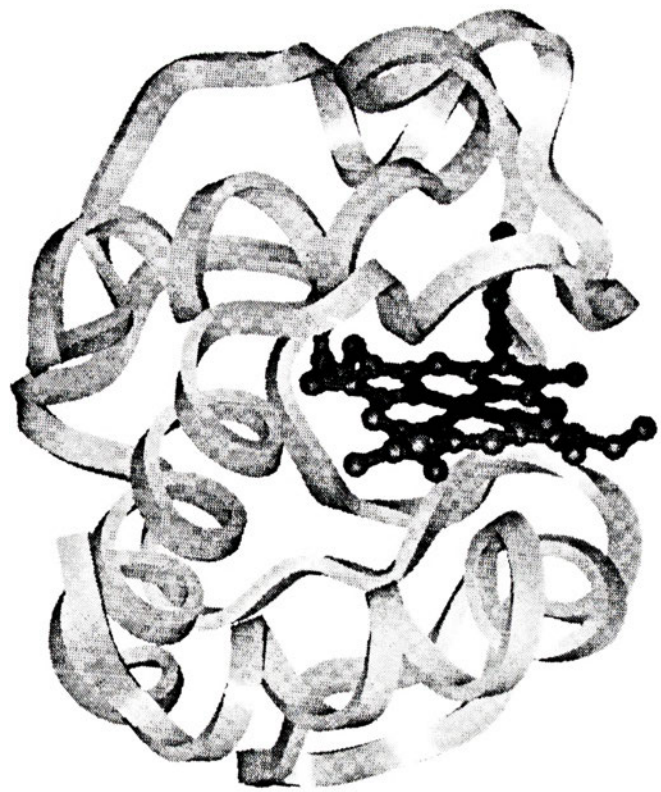
W fazie początkowej tworzą się struktury α-helikalne w regionach N i C końcowym oraz w pobliżu reszt aminokwasowych 50 i 60, przy czym polarne grupy reszt aminokwasowych układają się po jednej stronie każdego heliksu, podczas gdy grupy hydrofobowe — po stronie przeciwnej. Ustawienie Cys14 i Cys17 we właściwej orientacji zapewnia możliwość kowalencyjnego połączenia łańcucha białkowego z hemem.

W kolejnym etapie następuje tworzenie sieci wiązań wodorowych wokół reszt propionowych hemu, w które zaaganżowane są reszty aminokwasowe: Tyr46, Tyr48, Trp59, Asp52 oraz Thr49.

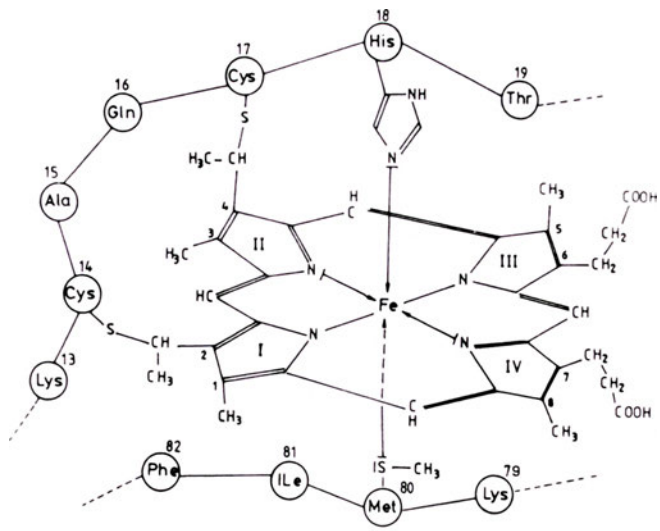
Łańcuch białkowy układający się po jednej stronie rdzenia hemowego ostateczną strukturę uzyskuje dzięki odpowiedniemu upakowaniu hydrofobowych grup Pro30, Leu32, Leu35. Po przeciwnej stronie rdzenia hemowego łańcuch formuje się przy udziale hydrofobowych grup Leu64, Leu68 oraz Tyr67. Obecność reszt glicynowych i prolinowych w łańcuchu białkowym umożliwia takie jego zagięcia wokół rdzenia hemowego, że cała cząsteczka uzyskuje formę globularną o średnicy 3.4 nm (Ryc. 3).

W efekcie hem umiejscowiony jest w szczelinie długości 2.1 nm (Ryc. 4) pomiędzy prawym bokiem cząsteczki (reszty 1-46) a lewym (reszty 47-91), podczas gdy reszty 92—104 zawracają w kierunku prawego boku cząsteczki ponad resztami 1-46. Pierścień pirolowy II i III oraz krawędź między nimi są wyeksponowane na powierzchnię, natomiast grupy propionowe leżą wewnątrz szczeliny hemowej i pozostają oddzielone od środowiska zewnętrznego [23]. Hem jest kowalencyjnie związany poprzez mostki tioeterowe z resztą Cys14 w pozycji 2 pierścienia pirolowego I i resztą Cys17 w pozycji 4 pierścienia pirolowego II. Atom żelaza grupy hemowej wiąże się z czterema atomami azotu układu porfirynowego. Tworzy też dwa dodatkowe wiązania (każde po jednej stronie płaszczyzny hemu) określane jako piąta i szósta pozycja koordynacyjna żelaza. Pozycje te zajęte są odpowiednio przez atom azotu His18 znajdującej się po prawej stronie hemu oraz atom siarki Met80 występującej po lewej stronie hemu [1, 23].

Przypuszcza się, że wiązanie żelaza (poprzez Met80 i His18) dodatkowo stabilizuje strukturę białka, nie mając zasadniczego wpływu na proces zwijania się łańcucha wokół hemu. Wskazuje na to możliwość powstania kompleksu łańcucha białkowego z porfiryną (różniącego się od cytochromu jedynie brakiem żelaza) o konformacji bardzo zbliżonej do cytochromu *c* [1].



Ryc. 3. Schemat struktury przestrzennej cytochromu *c* z serca tuńczyka (*Thunnus alalunga*). Rysunek wykonany w IBM UJ na podstawie danych Brookhaven Protein Data Bank za pomocą pakietu Biosym Insight II wersja 2.3. na komputerze Iris Indigo 2.*



Ryc. 4. Struktura kieszeni hemowej cytochromu *c*.

* Komputer z oprogramowaniem sfinansowany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w ramach Programu BIMOL.

http://rcin.org.pl

II-3. Konformacja ferro- i ferricytochromu *c*

Cytochrom *c* może występować w dwóch stanach: utlenionym (tzw. ferricytochrom), oraz zredukowanym (tzw. ferrocytochrom), różniących się stopniem utlenienia żelaza. Ferrocytochrom charakteryzuje widmo absorpcyjne z pasmem α w zakresie 550—558 nm, β w zakresie 521—527 nm oraz γ (zwanym też pasmem Soreta) w zakresie 415—423 nm. Przejściu w stan utleniony towarzyszy zanik pasm α i β, na miejscu których pojawia się pojedyncze pasmo z maksimum absorpcji przy 530 nm. Ferricytochrom wykazuje ponadto dodatkowe pasmo absorpcyjne z maksimum przy 695 nm, związane z obecnością nienaruszonego wiązania między Met80 a żelazem w hemie. Obecność pasma 695 nm może stanowić wskaźnik natywnej struktury białka, ponieważ każda zmiana konformacyjna cytochromu, której towarzyszy przerwanie wiązania Met80-Fe powoduje zanik omawianego pasma [1].

Różnice konformacyjne pomiędzy zredukowanym a utlenionym cytochromem *c* są konieczne dla stabilizacji jednostkowego ładunku dodatniego, jaki pojawia się podczas utleniania żelaza hemowego [23].

Dotychczas opracowano dwie hipotezy próbujące tłumaczyć procesy zmian konformacyjnych zachodzących przy utlenianiu cytochromu *c*.

Według pierwszej z nich [23-25] dodatni ładunek żelaza w stanie utlenionym byłby częściowo zdelokalizowany na Met80 powodując osłabienie wiązań wodorowych między Met80 a Tyr67. Reorganizacja przestrzenna grup powiązanych z Tyr67 siecią wiązań wodorowych prowadziłaby do zmiany położenia Asn52, Tyr48 oraz Thr49 leżących w pobliżu grup propionowych hemu. Efektem takich zmian byłoby większe (o ok. 0.016 nm) wyeksponowanie hemu na zewnątrz szczeliny hemowej oraz przesunięcie w stronę żelaza (o ok. 0.1 nm) cząsteczek wody spułapkowanych przez białko. Oba efekty działałyby w proponowanym modelu jako czynniki stabilizujące strukturę ferricytochromu.

Alternatywna hipoteza [23, 26] zakłada możliwość stabilizacji dodatniego ładunku żelaza w stanie utlenionym poprzez elektrostatyczne oddziaływanie z resztą kwasu propionowego przy IV pierścieniu pirolowym. Obserwowane zmiany konformacyjne białka zachodziłyby w regionie najbliżej sąsiadującym z tą grupą (w szczególności Arg38 oraz Asn52).

Obecnie przypuszcza się, że stabilizacja ładunku hemu w stanie utlenionym jest procesem obejmującym więcej niż jeden pojedynczy mechanizm. Wskazywać na to może fakt, że w procesie tym zaangażowane są również reszty aminokwasowe bardziej odległe od hemu (Phe10, Val11, Tyr97, Ala101) [23], grupy powiązane siecią wiązań wodorowych wokół Trp59 i Gly41 [27, 28] a także aminokwasy łańcucha białkowego w pozycjach od 50 do 60 [29] oraz od 60 do 71 [30].

II-4. Konformacja cytochromu *c* zależna od pH

Wyodrębniono pięć, zależnych od pH środowiska, stanów konformacyjnych ferricytochromu, w których różni się on szeregiem właściwości fizykochemicznych [1, 23]:

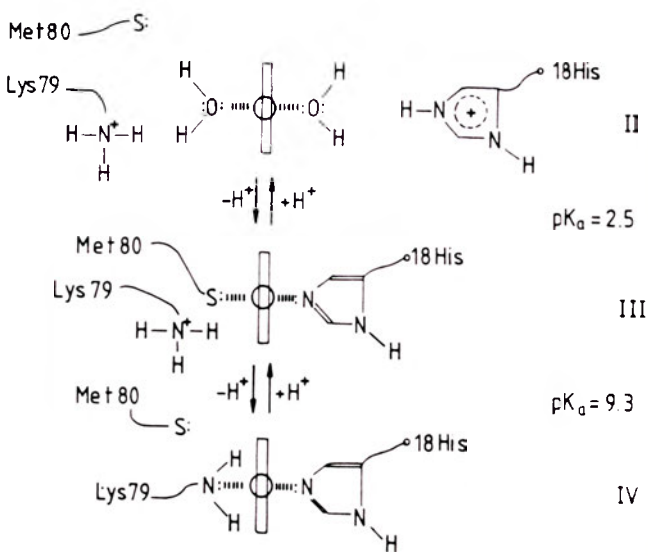
$$\underset{\text{pk}}{\text{I}} \longrightarrow \underset{0.42}{\text{II}} \longrightarrow \underset{2.50}{\text{III}} \longrightarrow \underset{9.35}{\text{IV}} \longrightarrow \underset{12.76}{\text{V}}$$

Stan III w powyższym ujęciu odpowiada natywnej, fizjologicznie aktywnej, globularnej konformacji cytochromu, w której żelazo jest ligandem wiązanym przez Met80 i His18 łańcucha białkowego (Ryc. 5).

Przy niskim pH środowiska ferricytochrom przechodzi w formę częściowo rozwiniętą (stan II), czemu towarzyszy jonizacja His18, a w konsekwencji Met80 i His18 zostają od żelaza odłączone i zastąpione cząsteczkami wody (Ryc. 5). Powrót do konformacji natywnej (stan III), związany z odbudową wiązań między żelazem a Met80 i His18, jest możliwy przy ponownym podwyższeniu pH. Przy ekstremalnie niskich wartościach pH cytochrom *c* ulega denaturacji (stan I), przy czym podwyższenie pH może odwracać ten proces. W środowisku o wzrastającym pH ustala się stan równowagi pomiędzy formą cytochromu w stanie III a formą cytochromu w stanie IV [31].

W stanie konformacyjnym IV białko zachowuje nadal strukturę globularną, lecz żelazo jest koordynowane przez inny niż Met80, aminokwas (Ryc. 5). Najprawdopodobniej jest nim Lys79 [1, 32], chociaż Lys72 i Lys73 oraz Tyr67 również brane są pod uwagę [1]. Cytochrom *c* w tej konformacji zachowuje stan utleniony nawet w obecności typowych czynników redukujących (takich jak żelazocjanek i askorbinian), ulegając redukcji dopiero po dodaniu silnych reduktorów (np ditioninu).

Opisano trzy, zależne od pH, stany konformacyjne zredukowanej formy cytochromu *c* [1, 23]. Struktura



Ryc. 5. Schemat wymiany cząsteczek koordynujących żelazo hemowe w II, III i IV stanie konformacyjnym ferricytochromu *c* (wg [1]).

http://rcin.org.pl

natywna zwinięta ferrocytochromu z His18 i Met80 wiążącymi koordynacyjnie żelazo hemowe, jest bardzo stabilna i pozostaje nienaruszona w szerokim zakresie pH (między 4 a 12). Struktura cząsteczki ferrocytochromu w środowisku o pH poniżej 4 oraz powyżej 12 zostaje zaburzona. W tych warunkach łańcuch białkowy rozwija się i cytochrom może ulegać spontanicznemu samoutlenieniu [1, 23].

III. Oddziaływania cytochromu *c* z oksydazą

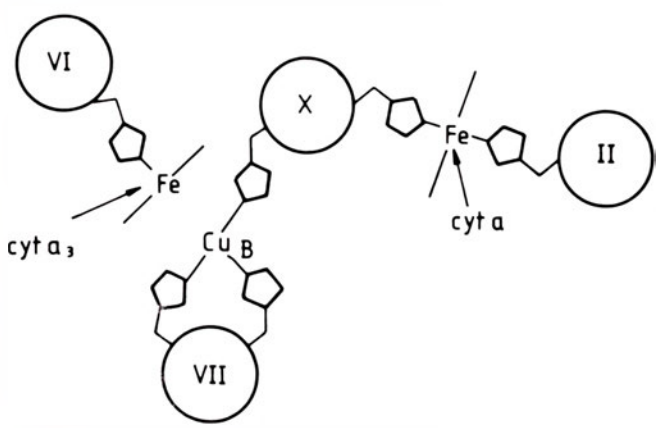
III-1. Struktura i funkcja oksydazy cytochromowej

Mitochondrialna oksydaza zbudowana jest z 13 różnych podjednostek polipeptydowych, przy czym katalityczne właściwści przypisywane są trzem najcięższym podjednostkom (I-III), kodowanym przez mitochondrialny DNA. W dwóch z nich występują cztery redoksowe centra metaliczne, z którym centrum Cu_A znajduje się w podjednostce II, zaś pozostałe (cytochromy *a* oraz a_3, centrum Cu_B) w podjednostce I [33, 34].

Jakkolwiek centrum Cu_A było opisywane w literaturze jako miejsce wiązania pojedynczego jonu miedzi (z udziałem Cys196, Cys200 oraz jednej lub dwóch histydyn) [35], pojawia się coraz więcej danych wskazujących, że jest to centrum bimetaliczne (Cu^{+2}-Cu^{+1}), w którym jeden niesparowany elektron jest zdelokalizowany między dwoma jądrami jonów miedzi [36, 37]. Położenie hemu *a*, hemu a_3 i centrum Cu_B w podjednostce I oksydazy jest determinowane rozmieszczeniem sześciu konserwatywnych histydyn, obecnych w czterech spośród dwunastu transbłonowych domen budujących tę podjednostkę [33, 38] (Ryc. 6).

Hem a_3 wraz z Cu_B tworzą bimetaliczne centrum odpowiedzialne za wiązanie tlenu i jego redukcję do wody, podczas gdy hem *a* i Cu_A są zaangażowane w proces przyjmowania elektronu od ferrocytochromu *c*.

Pomimo, że wykazano znaczącą rolę centrum Cu_A w procesie transportu elektronu, kontrowersyjne pozostaje zagadnienie, które centrum redoks w oksydazie (hem *a*, Cu_A, czy też oba) działa jako pierwotny akceptor elektronu, przekazywanego przez cytochrom *c*. Najnowsze badania zdają się wskazywać na to, że funkcję taką pełni właśnie centrum Cu_A [39-41], chociaż nie wyklucza się możliwości, że centrum Cu_A reguluje jedynie transport elektronu przekazywanego z cytochromu *c* bezpośrednio na hem *a* [42].



Ryc. 6. Struktura rozmieszczenia centrów metalicznych w podjednostce I oksydazy cytochromu *c* (wg [33]). II, VI, VII, X — transbłonowe domeny z konserwatywnymi resztkami histydynowymi.

Niewyjaśniona pozostaje również rola jonów cynku i magnezu, których obecność została stwierdzona w niektórych formach oksydazy (np. wołowej). Wyklucza się raczej bezpośredni udział tych jonów w reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych [36], sugerując bardziej funkcję strukturalną [43, 44].

III-2. Zmiany konformacyjne kompleksu cytochrom *c*-oksydaza

Specyficzny rozkład ładunków na powierzchni cytochromu *c* ma kluczowe znaczenie w procesie jego interakcji z oksydazą cytochromową [2, 45, 4-6]. W oddziaływania te, o charakterze elektrostatycznym, zaangażowane są dodatnie reszty lizynowe cytochromu *c* oraz ujemne reszty kwasów glutaminowego (Glu129, Glu198) i asparaginowego (Asp131) z podjednostki II oksydazy [47].

Wykorzystując chemicznie modyfikowane monopochodne cytochromu *c*, szczegółowo opisano udział poszczególnych reszt lizynowych w wiązaniu cytochromu *c* z oksydazą. Najbardziej istotną rolę przypisano lizynom 8, 13, 27, 72 znajdującym się w bliskim sąsiedztwie szczeliny hemowej [35, 45, 46, 48-50]. Rola pozostałych lizyn, jakkolwiek mniej znacząca, nie została całkowicie wykluczona. W świetle bowiem najnowszych opinii cytochrom *c* reagując z oksydazą może przyjmować więcej niż jedną dozwoloną orientację przestrzenną [51].

Oksydaza cytochromowa wiążąc cytochrom *c* indukuje w nim szereg zmian konformacyjnych. Polegają one przede wszystkim na: osłabieniu wiązania Met80-Fe, tworzeniu się mostków solnych pomiędzy Lys13 a Glu90 i Arg13 a Gly84, zerwaniu wiązania wodorowego między Tyr67 a Met80, reorganizacji sieci wiązań wodorowych w sąsiedztwie grup propionowych hemu, reorientacji cząsteczki wody wewnętrznej położonej między Tyr67 a grupą propionową hemu. Obserwowanym efektem tych zmian jest otwarcie szczeliny hemowej co, jak przypuszcza się, znacząco ułatwia proces przekazywania elektronu na oksydazę [52].

Badając zmiany strukturalne zachodzące w kompleksie oksydazy pod wpływem wiązania cytochromu *c* wykazano, że obejmują one zarówno domenę wiążącą cytochrom *c* (hem *a*, Cu_A), jak i domenę redukującą tlen (hem a_3, Cu_B), co wskazuje na wzajemne konformacyjne oddziaływania obu domen enzymu [52]. Uważa się przy tym, że zmiany te wykazują odmienny charakter od zmian jakim podlega cytochrom *c* [51-

http://rcin.org.pl

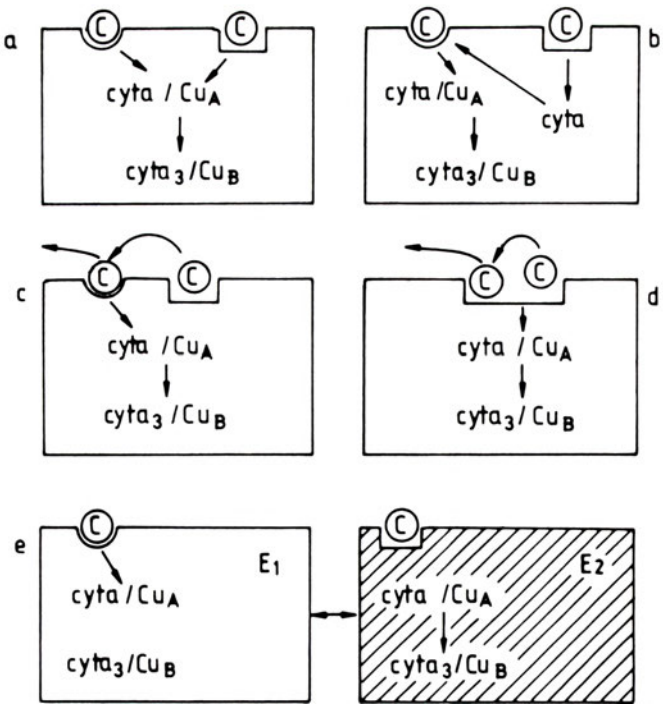
53]. Przede wszystkim nie zaobserwowano żadnych zasadniczych zmian w konformacji szkieletów porfirynowych, natomiast jedynymi zauważalnymi efektami były lokalne zmiany w sąsiedztwie grup winylowych i formylowych hemu *a* i a_3 [52]. Opisywane ograniczenia w ruchliwości grup formylowych hemu *a* pozwalają przypuszczać, że w trakcie wiązania cytochromu *c* następuje zacieśnianie się kieszeni białkowej miejsca wiążącego cytochrom *c* [54]. Wykazano także, że zredukowany cytochrom *a* może przyjmować dwa odmienne stany konformacyjne, przy czym przejście z jednego stanu w drugi (w warunkach doświadczalnych) jest uzależnione od skoordynowania żelaza cytochromu a_3 egzogennym ligandem (np. CO, CN) [55]. Fakt ten zdaje się wskazywać na zachodzenie allosterycznych oddziaływań pomiędzy cytochromem *a* i a_3.

III-3. Hipotezy opisujące prawdopodobne oddziaływania cytochromu *c* z oksydazą cytochromową

Badając oddziaływania cytochromu *c* z oksydazą w warunkach niskiej siły jonowej wykazano, że krzywa kinetyki reakcji utleniania cytochromu *c* przez oksydazę w warunkach różnych stężeń cytochromu *c* ma przebieg niehiperboliczny [56]. W celu wyjaśnienia tego zjawiska wysunięto kilka hipotez opisujących wiązanie cytochromu *c* z kompleksem IV [57-66]; ich modele rysunkowe przedstawiono na rycinie 7. Jedne z hipotez zakładają obecność w oksydazie dwóch osobnych miejsc wiążących cytochrom *c*, inne zakładają jedno miejsce wiążące, występujące w co najmniej dwóch stanach konformacyjnych.

Hipotezy zaproponowane przez Ferguson-Miller i wsp. [57] (Ryc. 7a), Brooksa i Nicholls a [58] (Ryc. 7b) oraz Specka i wsp. [60] (Ryc. 7c) zakładają obecność w oksydazie dwóch miejsc wiążących cytochrom *c*, o różnym powinowactwie wobec substratu: tzw. miejsca o wysokim i niskim powinowactwie. Dwie pierwsze hipotezy [57, 58] przyjmują, że oba miejsca biorą udział w procesie transportu elektronu. Hipoteza kontrolowanego wiązania [60] (ang. *controlled binding model*) wyróżnia miejsce katalityczne i regulacyjne, przy czym przyłączenie cząsteczki cytochromu *c* do miejsca regulacyjnego osłabia wiązanie cytochromu *c* w miejscu katalitycznym.

Hipoteza Specka została ostatnio poszerzona przez Reimanna i wsp. [65], którzy założyli, że oba rejony wiązania cytochromu *c* mogą przyłączać zarówno ferri-, jak i ferrocytochrom *c*, przy czym katalityczne miejsce wiązania wyróżnia wyższy stopień powinowactwa do obu form tego białka. Potwierdzeniem tego założenia jest zjawisko kompetycyjnej inhibicji utleniania ferrocytochromu *c* przez ferricytochrom. Przyłączenie cząsteczki ferrocytochromu *c* w miejscu regulacyjnym obniża bowiem powinowac-



Ryc. 7. Oddziaływania cytochromu *c* z oksydazą cytochromową (wg [56]): a — wg Ferguson-Miller; b — wg Brooksa i Nicholls a; c — wg Specka; d — wg Wilmsa; e — wg Brzezińskiego i Malmströma.

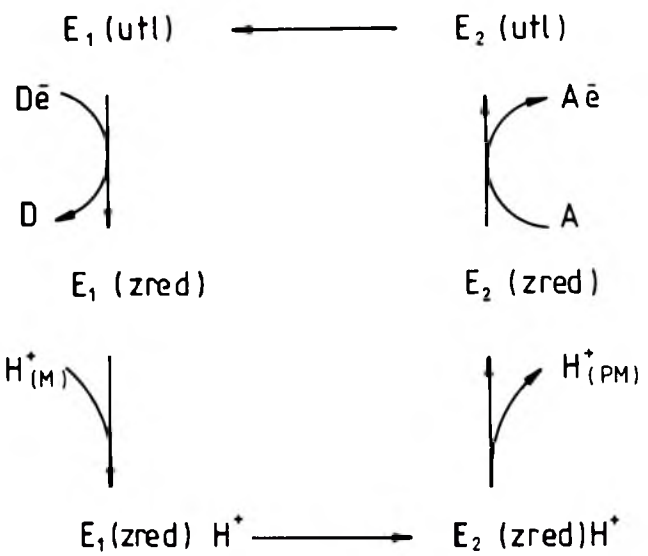
two miejsca katalitycznego do wiązania zredukowanego cytochromu *c* podczas gdy utleniona forma cytochromu *c* w wysokich stężeniach jest w stanie współzawodniczyć ze zredukowanym cytochromem *c* o miejsce wiążące w rejonie regulacyjnym, co tłumaczyło by zjawisko niekompetycyjnej inhibicji przez ferricytochrom *c* podczas przebiegu reakcji w centrum katalitycznym.

Spośród hipotez zakładających obecność jednego miejsca wiążącego cytochrom *c*, na rycinie 7 zilustrowano poglądy: Wilmsa i wsp. [59] (Ryc. 7d), Garbera i wsp. oraz Brzezińskiego i Malmströma [33, 36] (Ryc. 7e). Według Wilmsa i wsp. [59] oksydaza cytochromowa może jednocześnie przyłączać w jednym miejscu wiążącym dwie cząsteczki cytochromu *c*, między którymi następowałoby wzajemne oddziaływanie o charakterze elektrostatycznym. Według Garbera i wsp. [64] (ang. *hypsteresis mechanism*) warunkiem koniecznym do przyjęcia elektronu przez oksydazę jest jej przejście w formę aktywną, co następuje bezpośrednio po związaniu ferrocytochromu *c*. Ponieważ powrót oksydazy do formy wyjściowej (nieaktywnej) zachodzi relatywnie powoli, może w obecności cytochromu w wysokich stężeniach zostać związana przez aktywną formę enzymu kolejna cząsteczka cytochromu, zanim nastąpi wspomniany wyżej powrót do formy wyjściowej. Założenie to może tłumaczyć odstępstwa od kinetyki Michaelisa-Menten, obserwowane w przypadkach wysokich stężeń cytochromu *c* w środowisku reakcyjnym.

W świetle przedstawionych powyżej hipotez najbar-

http://rcin.org.pl

dziej przekonywająca wydaje się hipoteza Malmströma i wsp. [33, 63], według której wiązanie cytochromu *c* przez oksydazę jest ściśle sprzężone z procesem transportu w poprzek błony mitochondrionu. Warunkiem takiego sprzężenia jest możliwość przyjmowania przez oksydazę dwóch stanów konformacyjnych E1 (ang. *input state*) i E2 (ang. *output state*) różniących się stopniem powinowactwa do substratu. Przejęcie elektronu od cytochromu *c* zachodzi jedynie w stanie E1, a przekazanie go na tlen jedynie w stanie E2. Z kolei przejście konformacyjne oksydazy ze stanu E1 w E2 następuje jedynie wówczas, gdy zarówno hem *a* jak i Cu_A są zredukowane i przejście to jest sprzężone z procesem translokacji protonów wynikającej z protonowania zredukowanej formy E1 i deprotonowania formy E2 (Ryc. 8).



Ryc. 8. Schemat sprzężenia transportu elektronów z pompą protonową w oksydazie cytochromowej (wg [33]). D — donor elektronu (cytochrom *c*); A — akceptor elektronu (tlen); $H^+_{(M)}$ — protony w matriks; $H^+_{(PM)}$ — protony w przestrzeni międzybłonowej; E_1, E_2 — stany konformacyjne oksydazy cytochromowej.

IV. Uwagi końcowe

W artykule przedstawiono najważniejsze aspekty dotyczące konformacji cytochromu *c* i jego oddziaływań z oksydazą cytochromową. Pominięto natomiast zagadnienie szczegółowego opisu budowy oksydazy oraz mechanizmu wiązania i redukcji tlenu, zachodzących w domenie obejmującej hem a_3 i Cu_B. Katalityczna funkcja oksydazy, jak również wpływ czynników regulujących aktywność tego enzymu, zostały opisane w wielu publikacjach, w tym także na łamach „Postępów Biochemii" [67].

W niniejszej pracy omówione zostały hipotezy próbujące opisać wiązanie cytochromu *c* z kompleksem IV. Podkreślić przy tym należy, że żadna z nich nie jest jednoznacznie akceptowana. Podobnie, jak nie jest w pełni wyjaśniony mechanizm molekularnego transportu elektronów pomiędzy tymi białkami, a także towarzyszące zmiany konformacyjne całego kompleksu. Z pewnością wiadomo, że cytochrom łącząc się z oksydazą może przyjmować więcej niż jedną dozwoloną orientację przestrzenną umożliwiającą przekazanie elektronu, a także iż utworzenie kompleksu cytochromu *c* z oksydazą indukuje zmiany strukturalne w cząsteczce samej oksydazy.

W pracach opublikowanych w ostatnich latach [33, 34, 38, 43, 47, 68, 69] próbowano tłumaczyć, w jaki sposób przy udziale oksydazy cytochromowej pompowane są protony z matriks do przestrzeni międzybłonowej mitochondrionu. Pomimo, że opisano kinetykę i naturę chemiczną związków pośrednich w reakcji redukcji tlenu katalizowanej przez oksydazę cytochromową, molekularny mechanizm translokacji protonów, zachodzący przy udziale tego enzymu, nie jest w pełni zrozumiały. Przypuszczać należy, że dalsze badania zmierzać będą w kierunku wyjaśnienia mechanizmu sprzężenia transportu elektronów i translokacji protonów zachodzących w cząsteczce oksydazy. Sprzężenie takie może mieć charakter bezpośredni, jeśli centra redoksowe są bezpośrednio zaangażowane w proces wiązania i translokacji protonów. Pośrednie sprzężenie miałoby natomiast miejsce wówczas, gdyby istniały osobne domeny wiążące proton i elektron, a między tymi domenami następowałaby wymiana energii poprzez zmiany konformacyjne [33].

Dokładniejsze poznanie omawianych procesów powinno przyczynić się do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw powstawania ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej.

Artykuł otrzymano 8 lipca 1994 r.
Zaakceptowano do druku 18 listopada 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Dickerson RE, Timkovich R (1975) W: Boyer PD (red) The Enzymes. Academic Press, New York, str 397-547
2. Pettigrew GW, Moore GR (1987) W: Rich A (red) Cytochromes c Biological Aspects. Springer Verlag, Berlin, New York, str 29-111
3. Mauk MR, Barker PD, Mauk AG (1991) *Biochemistry* **30**: 9873-9881
4. Bagby S, Barker PD, Guo LH, Hill HAO (1990) *Biochemistry* **29**: 3213-3219
5. Eltis LD, Herbert RG, Barker PD, Mauk AG, Northrup SH (1991) *Biochemistry* **30**: 3663-3674
6. Moench SJ, Chroni S, Lou BS, Erman JE, Satterlee JD (1992) *Biochemistry* **31**: 3661-3670
7. Hildebrandt P, English AM, Smulewich G (1992) *Biochemistry* **31**: 2384-2392
8. Stemp EDA, Hoffman BM (1993) *Biochemistry* **32**: 10848-10865
9. Corin AF, Hake RA, McLendon G, Hazzard JT, Tollin G (1993) *Biochemistry* **32**: 2756-2762
10. Pettigrew GW, Moore GR (1987) W: Rich A (red) Cytochromes c Biological Aspects. Springer Verlag, Berlin, New York, str 231-266
11. Gonzales DH, Neupert W (1990) *J Bioenerg Biomembr* **22**: 753-768
12. Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W (1989) *Biochim Biophys Acta* **988**: 1-45
13. Sprinkle JRS, Haukvoort TBM, Koshy TI, Miller DD, Margoliash E (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5729-5733

http://rcin.org.pl

14. Pfanner N, Hartl FU, Neupert W (1988) *Eur J Biochem* **175**: 205-212
15. Rietveld A, Jordi W, de Kruijff B (1985) *J Biol Chem* **261**: 3846-3856
16. Pilon M, Jordi W, de Kruijff B, Demel RA (1987) *Biochim Biophys Acta* **902**: 207-216
17. Jordi W, de Kruijff B, Marsh D (1989) *Biochemistry* **28**: 8998-9005
18. Demel RA, Jordi W, Lambrechts H, van Damme H, Hovius R, de Kruijff B (1989) *J Biol Chem* **264**: 3988-3997
19. Nicholson DW, Neupert W (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4340-4344
20. Hartl FU, Neupert W (1990) *Science* **247**: 930-938
21. Hakvoort TBM, Sprinkle JE, Margoliash E (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4996-5000
22. Dumont ME, Cardillo TS, Hayes MK, Sherman F (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 5487-5496
23. Moore GR, Pettigrew GW (1990) W: Rich A (red) Cytochromes c Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects. Springer Verlag, Berlin, New York, str 161-227
24. Takano T, Dickerson RE (1981) *J Mol Biol* **153**: 79-94
25. Takano T, Dickerson RE (1981) *J Mol Biol* **153**: 95-115
26. Moore GR (1983) *FEBS Lett* **161**: 171-175
27. Turner DL, Williams RJP (1993) *Eur J Biochem* **211**: 555-562
28. Santos H, Turner DL (1992) *Eur J Biochem* **206**: 721-728
29. Feng Y, Roder H, Englander SW (1990) *Biochemistry* **29**: 3494-3504
30. Gao Y, Boyd J, Pielak GJ, Williams RJP (1991) *Biochemistry* **30**: 1928-1934
31. Greenwood C, Palmer G (1965) *J Biol Chem* **240**: 3660-3663
32. Ferrer JC, Guillemette JG, Bogumil R, Inglis SC, Smith M, Mauk AG (1993) *J AM Chem Soc* **115**: 7507-7508
33. Malmström BG (1993) *Acc Chem Res* **26**: 332-338
34. Wilson MT, Bickar D (1991) *J Bioenerg Biomembr* **23**: 755-771
35. Pan LP, Hibdon S, Liu RQ, Durham B, Millett F (1993) *Biochemistry* **32**: 8492-8498
36. Steffens GCM, Soulimane T, Wolff G, Buse G (1993) *Eur J Biochem* **213**: 1149-1157
37. Kroneck PMH, Antholine WE, Kastrau DHW, Buse G, Steffens GCM, Zumft WG (1990) *FEBS Lett* **268**: 274-276
38. Saraste M (1990) *Quart Rev Biophys* **23**: 331-366
39. Hill BC (1991) *J Biol Chem* **266**: 2219-2226
40. Oliveberg M, Malmström BG (1991) *Biochemistry* **30**: 7053-7057
41. Hill BC (1994) *J Biol Chem* **269**: 2419-2425
42. Pan LP, Hazzard JT, Lin J, Tollin G, Chan SI (1991) *J Am Chem Soc* **113**: 5908-5910
43. Malmström BG (1990) *Arch Biochem Biophys* **280**: 233-241
44. Pan LP, Li Z, Larsen R, Chan SI (1991) *J Biol Chem* **266**: 1367-1370
45. Ferguson-Miller S, Brautigan DL, Margoliash E (1978) *J Biol Chem* **253**: 149-159
46. Smith MB, Stonehuerner J, Ahmed AJ, Staudenmayer N, Millett F (1980) *Biochim Biophys Acta* **592**: 303-313
47. Capaldi RA (1990) *Annu Rev Biochem* **59**: 569-596
48. Staudenmayer N, Smith MB, Smith HT, Spies FK, Millet F (1976) *Biochemistry* **15**: 3198-3205
49. Rieder R, Bosshard R (1980) *J Biol Chem* **255**: 4732-4739
50. Kornblatt JA, Theodorakis J, Hui Bon Hoa G, Margoliash E (1992) *Biochem Cell Biol* **70**: 539-547
51. Hazzard JT, Rong S, Tollin G (1991) *Biochemistry* **30**: 213-222
52. Hildebrandt P, Vanhecke F, Buse G, Soulimane T, Mauk AG (1993) *Biochemistry* **32**: 10912-10922
53. Lynch SR, Sherman D, Copeland RA (1991) *J Biol Chem* **267**: 298-302
54. Hildebrandt P, Heimburg T, Marsh D, Powell GL (1990) *Biochemistry* **29**: 1661-1668
55. Sherman D, Kotake S, Ishibe N, Copeland RA (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4265-4269
56. Cooper ChE (1990) *Biochim Biophys Acta* **1017**: 187-203
57. Ferguson-Miller S, Brautigan DL, Margoliash E (1976) *J Biol Chem* **251**: 1104-1115
58. Brooks SPJ, Nicholls P (1982) *Biochim Biophys Acta* **680**: 33-43
59. Wilms J, Veerman ECI, Konig BW, Dekker HL, Van Gelder BF (1981) *Biochim Biophys Acta* **635**: 13-24
60. Speck SH, Dye D, Margoliash E (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 347-351
61. Nałęcz KA, Bolli R, Ludwig B, Azzi A (1985) *Biochim Biophys Acta* **808**: 259-272
62. Antalis TM, Palmer G (1982) *J Biol Chem* **257**: 6194-6206
63. Brzeziński P, Thornstrom PE, Malmström BG (1986) *FEBS Lett* **194**: 1-5
64. Garber EAE, Margoliash E (1990) *Biochim Biophys Acta* **1015**: 279-287
65. Reimann A, Rohm KH, Kadenbach B (1993) *J Bioenerg Biomembr* **25**: 393-399
66. Bosshard HR (1984) *Post Biochem* **30**: 225-230
67. Machoy Z (1984) *Post Biochem* **30**: 231-250
68. Malmström BG (1992) *Acta Physiol Scand* **146**: 209-211
69. Trumpower BL, Gennis RB (1994) *Annu Rev Biochem* **63**: 675-716

Podręcznik laboratoryjny

Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk opracował podręcznik laboratoryjny pt. „Inżynieria Genetyczna i Biologia Molekularna. Metody", w którym zawarto na 170 stronach 67 metod sprawdzonych i stosowanych w IBB PAN. Wydawcą książki jest „TECHGEN" spółka z o.o. ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, tel./fax 658-47-89, u którego można zamawiać i nabywać podręcznik.

http://rcin.org.pl

Rola cyklu inozytolowego w przekazywaniu informacji w jądrze

The role of inositol cycle in signal transduction in cell nucleus

MAGDALENA WIKTOREK[1],
ALEKSANDRA ROJEK[2],
MAŁGORZATA CZARNY[3],
JOLANTA BARAŃSKA[4]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Cykl inozytolowy w jądrze
III. Enzymy cyklu inozytolowego. Fosfoinozytydaza C
IV. Trisfosfoinozytol i Ca^{2+} w jądrze
V. Diacyloglicerol i kinaza białkowa C w jądrze

Contents:

I. Introduction
II. Inositol cycle in nucleus
III. Inositol cycle enzymes. Phosphoinositidase C
IV. Trisphosphoinositol and Ca^{2+} in nucleus
V. Diacyliglicerol and protein kinase C in nucleus

Wykaz stosowanych skrótów: $[Ca^{2+}]_c$ — cytosolowe stężenie jonów Ca^{2+}; $[Ca^{2+}]_n$ — jądrowe stężenie jonów Ca^{2+}; DAG — diacyloglicerol; DBHQ — 2,5-di-tertbutylohydrochinon; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; IGF-1 — insulinopodobny czynnik wzrostu; $InsP_2$ — inozytolobisfosforan; $InsP_3$ — inozytolotrisfosforan; $InsP_4$ — inozytolotetrakisfosforan; PA — kwas fosfatydowy; PDGF — płytkowopochodny czynnik wzrostu; PIC — fosfoinozytadaza C; PKC — kinaza białkowa C; PI — fosfatydyloinozytol; PIP — fosfatydyloinozytolo(4)monofosforan; PIP_2 — fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; PI-3K — 3-kinaza fosfatydyloinozytolu;

I. Wstęp

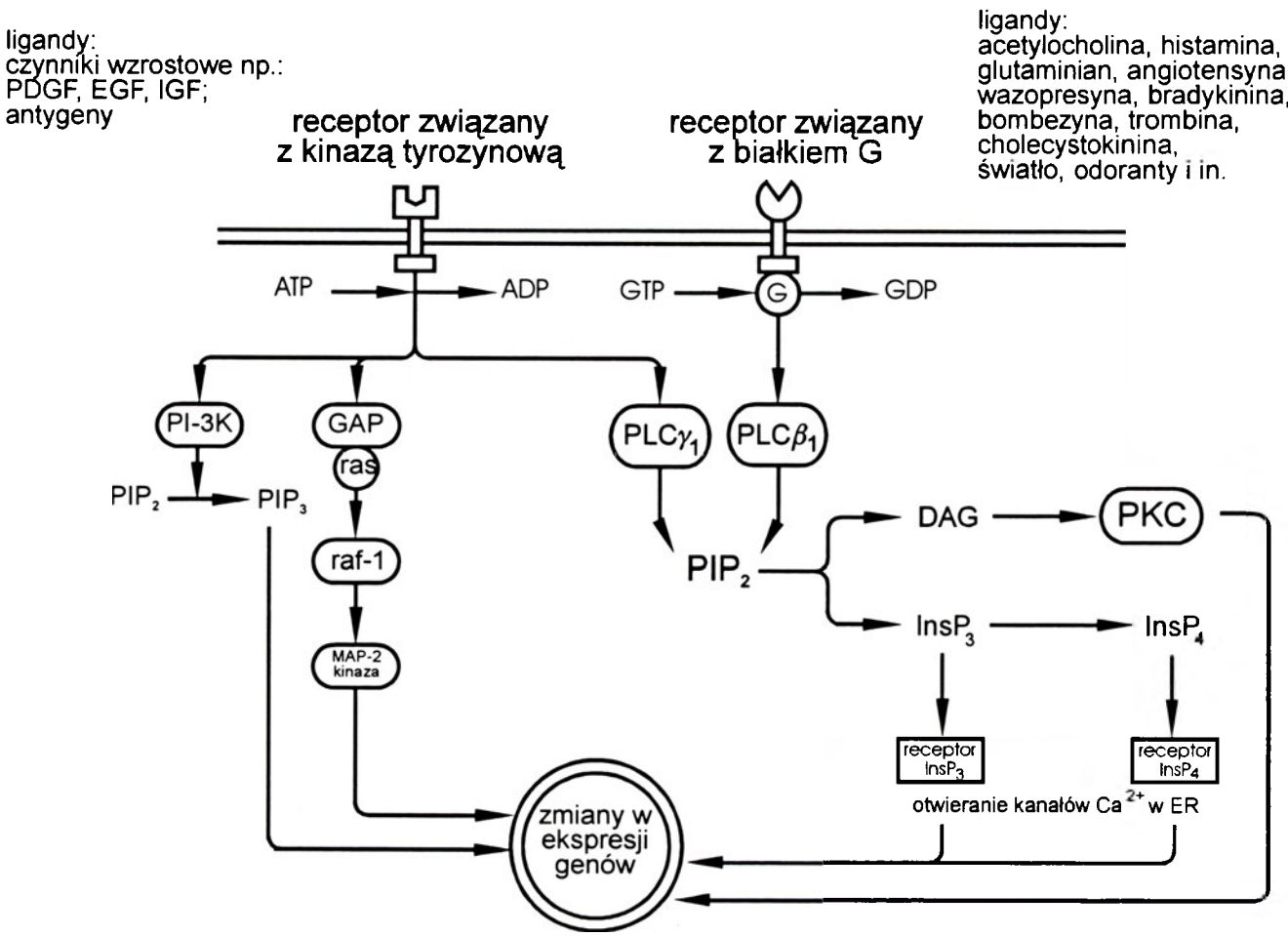
Jądro komórkowe jest strukturą bardzo złożoną i dynamiczną. Jest otoczone przez dwie błony tworzące otoczkę jądrową. Dwuwarstwa lipidowa błony wewnętrznej pozostaje w ścisłym kontakcie z blaszką jądrową, warstwą zbudowaną z białek, głównie lamin typu A, B i C [1]. Zewnętrzna błona jądrowa jest ciągła z retikulum endoplazmatycznym, przez co pomiędzy błoną zewnętrzną i wewnętrzną powstaje przestrzeń okołojądrowa, ciągła ze światłem retikulum. Zewnętrzna i wewnętrzna błona otoczki jądrowej połączone są ze sobą białkowymi kompleksami porów jądrowych. Kompleksy porów jądrowych oprócz strukturalnej funkcji łączenia obu błon umożliwiają wymianę cząsteczek pomiędzy cytoplazmą i nukleoplazmą. Kompleks porów jądrowych zbudowany jest z kilkuset białek, które tworzą jeden główny kanał centralny oraz osiem symetrycznie otaczających go mniejszych kanałów peryferycznych. Te niewielkie wodne kanały (o średnicy około 9 nm) pozwalają na nieselektywny transport (bierną dyfuzję) jonów, metabolitów i innych małych molekuł. Duże cząsteczki, jak np. białka i RNA, są selektywnie i aktywnie transportowane przez główny kanał o średnicy około 26 nm. Wiadomo, że do aktywnego transportu potrzebna jest hydroliza ATP, jednak mechanizm przemieszczania się dużych cząsteczek z jądra i do jego wnętrza pozostaje nieznany. Być może jedno z białek kompleksu porowego, ATP-aza, o właściwościach dynamicznych podobnych do miozyny, mogłaby odgrywać tu kluczową rolę [2, 3].

Dzięki barierze, jaką stanowi otoczka, jądro komórek eukariotycznych jest strukturą która, pozostając w ścisłym kontakcie z resztą komórki, jest jednocześnie od niej odizolowana. Taka budowa jądra wprowadza kolejne poziomy, na których zachodzi regulacja odpowiedzi komórki.

Kluczową reakcją w procesach przekazywania informacji poprzez błonę cytoplazmatyczną do wnętrza komórki jest hydroliza fosfatydyloinozytolo(4,5)bis-fosforanu (PIP_2), prowadzona przy udziale fosfolipazy C specyficznie hydrolizującej fosfolipidy inozytolowe (PIC). W trakcie tej reakcji powstają dwa wtórne przekaźniki informacji: diacyloglicerol (DAG) — lipid pozostający w błonie plazmatycznej, aktywujący kinazę białkową C (PKC), oraz trisfosfoinozytol ($InsP_3$)

[1]Mgr, [2]studentka UW, [3]mgr, [4]doc. dr hab., Pracownia Lipidowych Przekaźników Sygnałów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

http://rcin.org.pl



Ryc. 1. Drogi przekazywania informacji w komórce od błony cytoplazmatycznej do jądra
Wiele agonistów (ligandów) wiąże się z receptorami błony cytoplazmatycznej, które poprzez białka G (G) aktywują fosfoinozytydazę C typu β_1 ($PIC\beta_1$). Enzym ten hydrolizuje fosfatydyloinozytolo (4, 5) bisfosforan(PIP_2) w wyniku czego powstają dwa wtórne przekaźniki informacji: trisfosfoinozytol ($InsP_3$) i diacyloglicerol (DAG). DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), natomiast $InsP_3$ i, powstający z niego, $InsP_4$ wiążą się z odpowiednimi receptorami znajdującymi się w błonie siateczki śródplazmatycznej (retikulum endoplazmatycznego — ER), powodując otwarcie kanałów receptorów i uwolnienie jonów wapnia z wnętrza tych struktur do cytoplazmy. Hydroliza PIP_2 może także następować w wyniku aktywacji fosfoinozytydazy C typu γ_1 ($PIC\gamma_1$). Fosfolipaza ta jest aktywowana przez kinazy tyrozynowe związane z innego typu receptorami błony komórkowej takimi jak receptory czynników wzrostu i antygenów. Receptory te aktywują również 3-kinazę fosfatydyloinozytolu (PI-3K), a także oddziałują z białkiem GAP inicjując kaskadę kinaz tyrozynowych i serynowo-treoninowych (ras, raf-1, kinaza MAP-2). Wszystkie opisane zdarzenia wpływają bezpośrednio lub pośrednio na ekspresję genów w jądrze.

— rozpuszczalny w cytosolu agonista receptora znajdującego się w siateczce śródplazmatycznej, uwalniający Ca^{2+} z wnętrza tej struktury. Oba wtórne przekaźniki informacji zapoczątkowują całą kaskadę reakcji przenosząc informację z błony cytoplazmatycznej poprzez cytoplazmę do jądra komórkowego. Ten szlak przekazywania informacji, zwany też cyklem inozytolowym, jest dość dokładnie zbadany, a jego elementy scharakteryzowane (Ryc. 1). Jest on uniwersalny, występuje we wszystkich komórkach i, jak wydawało się do niedawna, jest charakterystyczny dla takich struktur komórkowych, jak błona komórkowa i cytoplazma [4].

Badania ostatnich lat wykazały jednak, że także w jądrze komórkowym może istnieć podobny, jeśli nie taki sam, system przekazywania informacji. Wyniki tych badań sugerują, że cykl inozytolowy w jądrze jest prawdopodobnie aktywowany niezależnie od cytosolowego cyklu inozytolowego; mechanizm regulacji tych procesów pozostaje jednak stale nieznany.

II. Cykl inozytolowy w jądrze

Pierwsze doniesienia o występowaniu cyklu inozytolowego w jądrze pochodzą z początku lat 80-tych. W roku 1980, Baker i Chang [5] wykazali, że izolowane jądra komórek nerwowych bardzo aktywnie syntetyzują fosfolipidy inozytolowe. Cztery lata później Smith i Wells [6], używając w badaniach izolowanych jąder komórek wątroby szczura zaobserwowali, że po podaniu radioaktywnego [^{32}P]ATP radioaktywność pojawiła się w takich związkach jak fosfatydylofosforan (PIP), PIP_2 i kwas fosfatydowy (PA). Wynik ten pozwolił autorom na wysunięcie wniosku, że zarówno lipidy PI, PIP i DAG jak i odpowiednie kinazy je fosforylujące muszą być obecne w jądrze komórkowym (Ryc. 2). Podobnie Cocco i wsp. [7] badając syntezę fosfolipidów inozytolowych w jądrach komórek Frienda wykazali akumulację PIP_2 tworzonego w wyniku fosforylacji PIP. Autorzy wykluczyli możliwość zanieczyszczenia

http://rcin.org.pl

preparatu jąder fragmentami innych błon komórkowych, bowiem homogenaty otrzymane z całych komórek Frienda nie wykazywały żadnych różnic we wzorze inkorporacji radioaktywności do fosfolipidów w komórkach zróżnicowanych i niezróżnicowanych; natomiast w izolowanych jądrach różnice takie były wyraźnie widoczne [7].

Rozwój metod i technik badawczych w latach 90-tych, a szczególnie opracowanie przez Divecha i wsp. [8] bardzo czułej, pikomolowej metody oznaczania jądrowych puli PI, PIP, PIP_2 i DAG umożliwił głębsze wniknięcie w mechanizmy przekazywania informacji w jądrze. Badacze ci wykazali, że w czasie stymulacji komórek Swiss 3T3 przez insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1) nie występowały zmiany poziomu PIP_2 i DAG w błonie cytoplazmatycznej, natomiast w jądrze do połowy zmniejszała się pula PIP/PIP_2 i jednocześnie podwajała pula DAG. Bombezyna zaś stymulowała rozpad PIP_2 w błonie cytoplazmatycznej, nie powodując żadnych zmian w ilości fosfolipidów inozylowych i DAG w jądrze. Dane te świadczyły, że cykle przemian fosfoinozytoli w jądrze i w błonie komórkowej są od siebie niezależne.

Ponadto należy dodać, że zmiany w poziomie fosfolipidów obserwowano po bardzo dokładnym oczyszczeniu jąder z wszelkich błon. Jądra komórkowe traktowano detergentami (Triton X-100 i dezoksycholan), co powodowało pozbawienie ich nie tylko błony jądrowej, lecz także wszelkich zanieczyszczeń fragmentami błony komórkowej i siateczki śródplazmatycznej. Brak błon sprawdzano stosując technikę mikroskopii elektronowej [8]. W tak przygotowanych preparatach z jąder komórek Swiss 3T3 pozostawała jedynie niewielka ilość lipidów związanych z nukleoplazmą [8]. Można było wnioskować, że to właśnie ich poziom zmienia się podczas stymulacji komórki. Dowodem potwierdzającym znaczenie matriks jądrowej w syntezie fosfolipidów inozytolowych był fakt, że jądra komórek wątroby szczura pozbawione w wyniku działania detergentów błony jądrowej nie wykazywały różnic w zakresie syntezy fosfolipidów inozytolowych (w tym PIP_2) w stosunku do jąder nie traktowanych detergentami [9]. Cocco i wsp. [10] dyskutując taką lokalizację fosfolipidów inozytolowych zwracają uwagę, że wiele białek jądrowych (np. lamina B, histony, DNA- i RNA-polimerazy, nukleoliny i nukleoplazminy, receptory hormonów sterydowych, czy czynniki transkrypcyjne, jak AP-1, AP-2, jun) posiada charakterystyczną sekwencję, która wykazuje wysokie powinowactwo do lipidów inozytolowych. Dzięki temu lipidy inozytolowe wewnętrznej błony jądrowej pozostają wewnątrz jądra związane z białkami pomimo działania na nie detergentów.

III. Enzymy cyklu inozytolowego. Fosfoinozytydaza C

Badania przedstawione w poprzednim rozdziale dotyczące zmian poziomu fosfatydyloinozytoli świadczyły pośrednio, że na terenie jądra komórkowego powinny znajdować się także enzymy syntetyzujące i hydrolizujące te lipidy. Zastosowanie technik immunochemicznych (*Western blotting*) oraz rozdział frakcji jądrowej na dwie subfrakcje, czyli matriks zewnętrzną i wewnętrzną umożliwił dość precyzyjną, jak się wydaje, lokalizację enzymów jądrowego cyklu inozytolowego [11]. PI-4-kinazę znaleziono w matriks zewnętrznej (kompleksy porów jądrowych i blaszka jądrowa), natomiast PI(4)-5-kinazę i DAG-kinazę oraz PIC głębiej w jądrze [11]. Usytuowanie enzymów cyklu inozytolowego w nukleoplazmie wydaje się obecnie mało prawdopodobne. Wiadomo, że enzymy te stają się aktywne po związaniu z błonami plazmatycznymi. Zatem jedyną logiczną lokalizacją enzymów i substratów cyklu inozytolowego wydaje się być wewnętrzna błona jądrowa połączona z blaszką jądrową [11, 12] (Ryc. 2) szczególnie, że coraz większe znaczenie przypisuje się tej warstwie w regulacji funkcji jądrowych [13].

W jądrach wielu komórek stwierdzono obecność fosfolipazy C specyficznie hydrolizującej fosfolipidy inozytolowe (fosfoinozytydaza C — PIC). Jak do tej pory, w jądrach znaleziono jedynie izoformę β_1 tej fosfolipazy [5, 10, 14] (Ryc. 2). Aktywność klasycznej (cytosolowej) $PIC\beta_1$ jest kontrolowana przez białka G typu α_q i α_{11} [15] i (podobnie jak wszystkie fosfolipazy C) przez jony Ca^{2+}. W jądrach komórkowych nie udało się wykazać obecności trójpodjednostkowych białek G, dlatego wydaje się, że mechanizm regulacji jądrowej $PIC\beta_1$ jest inny. Cocco i wsp. [10] sugerują, że aktywacja fosfolipazy w jądrze zachodzi w wyniku dojścia do tej organelli określonego cytosolowego sygnału, co wymaga dłuższego czasu (minuty), niż rozprzestrzenienie się sygnałów w obrębie błony cytoplazmatycznej (sekundy). Ponieważ jądrowa fosfoinozytydaza C jest aktywowana przez oddziaływania zewnątrzkomórkowych agonistów z receptorami błony komórkowej (w tym także z receptorami związanymi z kinazą tyrozynową) można przypuszczać, że uruchamianym sygnałem może być kaskada fosforylacji prowadzona przez cytosolowe kinazy tyrozynowe [10] (Ryc. 1). Kinazy te mogłyby działać na białka w błonie jądrowej, bądź być transportowane do wnętrza jądra i regulować fosfolipazę C typu β_1 (Ryc. 2). Niektórzy autorzy sugerują, że kinazami tymi mogą być małe białka wiążące GTP, których obecność w jądrze wykazano w wielu komórkach [16, 17]. Divecha i wsp. [12] sugerują, że innym cytosolowym sygnałem mógłby być wzrost poziomu wolnego wapnia, który następnie przedostawałby się do jądra (Ryc. 2). W takim przypadku czynnikiem regulującym jądrową $PIC\beta_1$ mógłby być wewnątrzjądrowy poziom Ca^{2+}. Asano i wsp. [18] wyizolowali i oczyścili z komórek AH7974 cztery enzymy o masach molowych 80-88 kDa i o aktywności PIC. Trzy z tych enzymów aktywnie hydrolizują

http://rcin.org.pl

PIP/PIP_2 w wysokich milimolarnych (10^{-2}) stężeniach Ca^{2+}. Co więcej jeden z tych enzymów reagował krzyżowo z przeciwciałami przeciwko szczurzej PIC δ_1, natomiast żaden z nich nie dawał reakcji z przeciwciałami przeciwko izoformom β_1, γ_1 i γ_2. Dane zdają się wskazywać, że być może są to PIC typu δ [18]. Jak się ogólnie przyjmuje fosfoinozytydazy typu δ są regulowane wyłącznie przez jony Ca^{2+} [15]; zmiany w wewnątrzjądrowym stężeniu tych jonów wpływałyby zatem na aktywację rozpadu fosfolipidów inozytolowych w jądrze.

Można przyjąć, że białka jądrowe, które mają domeny o wysokim powinowactwie do lipidów inozytolowych, są dzięki związaniu z tymi lipidami zakotwiczone w wewnętrznej błonie jądrowej [10]. Aktywacja jądrowej PIC a, co za tym idzie, hydroliza fosfolipidów inozytolowych, mogłaby w rezultacie prowadzić do regulacji aktywności tych białek. Wiadomo, że polimeraza DNA [19] i kalpaina [20] dopiero po związaniu z lipidami inozytolowymi są w pełni aktywne; aktywacja PIC w tym przypadku powodowałaby hamowanie ich aktywności. Należy dodać, że w komórkach regenerującej wątroby szczura udało się zaobserwować nie tylko wzrost aktywności PIC [21], ale także znaczny wzrost ekspresji mRNA $PIC\beta_1$ w czasie fazy S cyklu komórkowego [18, 21]. Wszystkie te dane stanowią bardzo realną przesłankę, że być może jądrowa PIC jest kluczowym enzymem w przekazywaniu informacji w jądrze i regulacji funkcji jądrowych w cyklu komórkowym.

IV. Trisfosfoinozytol i Ca^{2+} w jądrze

Hydroliza fosfolipidów inozytolowych prowadzi do powstania dwóch związków przenoszących informacje: DAG i $InsP_3$. Po aktywacji komórek dochodzi do wzrostu aktywności PIC w jądrze, należy więc sądzić, że wzrasta ilość jądrowego $InsP_3$. Niestety współczesne metody badawcze nie pozwalają na uchwycenie zmian poziomu $InsP_3$ w tej organelli. Podobnie trudno wyjaśnić funkcję tego związku w jądrze. Być może powstający $InsP_3$ jest jedynie prekursorem innych fosforanów inozytoli, które w jakiś sposób są potrzebne do aktywacji enzymów jądrowych [12]. Jak na razie jedynym w pełni udokumentowanym zjawiskiem jest regulacja aktywności α polimerazy DNA przez inozytolo(4,5)bisfosforan ($InsP_2$) [19] (Ryc. 2).

W cytoplazmie $InsP_3$ działa jako agonista receptorów siateczki śródplazmatycznej, przez które uwalniane są do cytosolu jony wapnia. Wewnątrz jądra nie znaleziono receptorów $InsP_3$ ($InsP_3R$) [10, 12]. Znaleziono je natomiast w zewnętrznej, ciągłej z retikulum, błonie jądrowej, skierowane w stronę cytosolową [12] (Ryc. 2). Otoczka jądrowa komórek wątroby szczura zawiera typ P pompy transportującej jony wapnia, która strukturalnie i funkcjonalnie jest identyczna z retikularnymi ATPazami wapniowymi [22] (Ryc. 2). Jej aktywność jest hamowana przez tapsigarginę i DBHQ, w taki sam sposób jak innych ATPaz w retikulum [22]. Wydaje się mało prawdopodobne, by pompa ta przechodziła przez obie błony jądrowe i magazynowała jony wapnia wewnątrz jądra. Badając pobieranie jonów Ca^{2+} do wnętrza jądra zaobserwowano, że tapsigargina i DBHQ w stężeniach, które całkowicie hamowały magazynowanie jonów Ca^{2+} w mikrosomach, w ogóle nie wpływały na ten proces [23, 24]. Prawdopodobnie oprócz ATPazy, która pompuje Ca^{2+} do przestrzeni okołojądrowej istnieje jakiś inny system magazynujący Ca^{2+} wewnątrz jądra. Z badań prowadzonych na izolowanych jądrach komórek wątroby szczura wynika, że pobieranie Ca^{2+} zależy od obecności ATP, natomiast w nieobecności ATP od tetrakisfosforanu inozytolu ($InsP_4$) [23, 24].

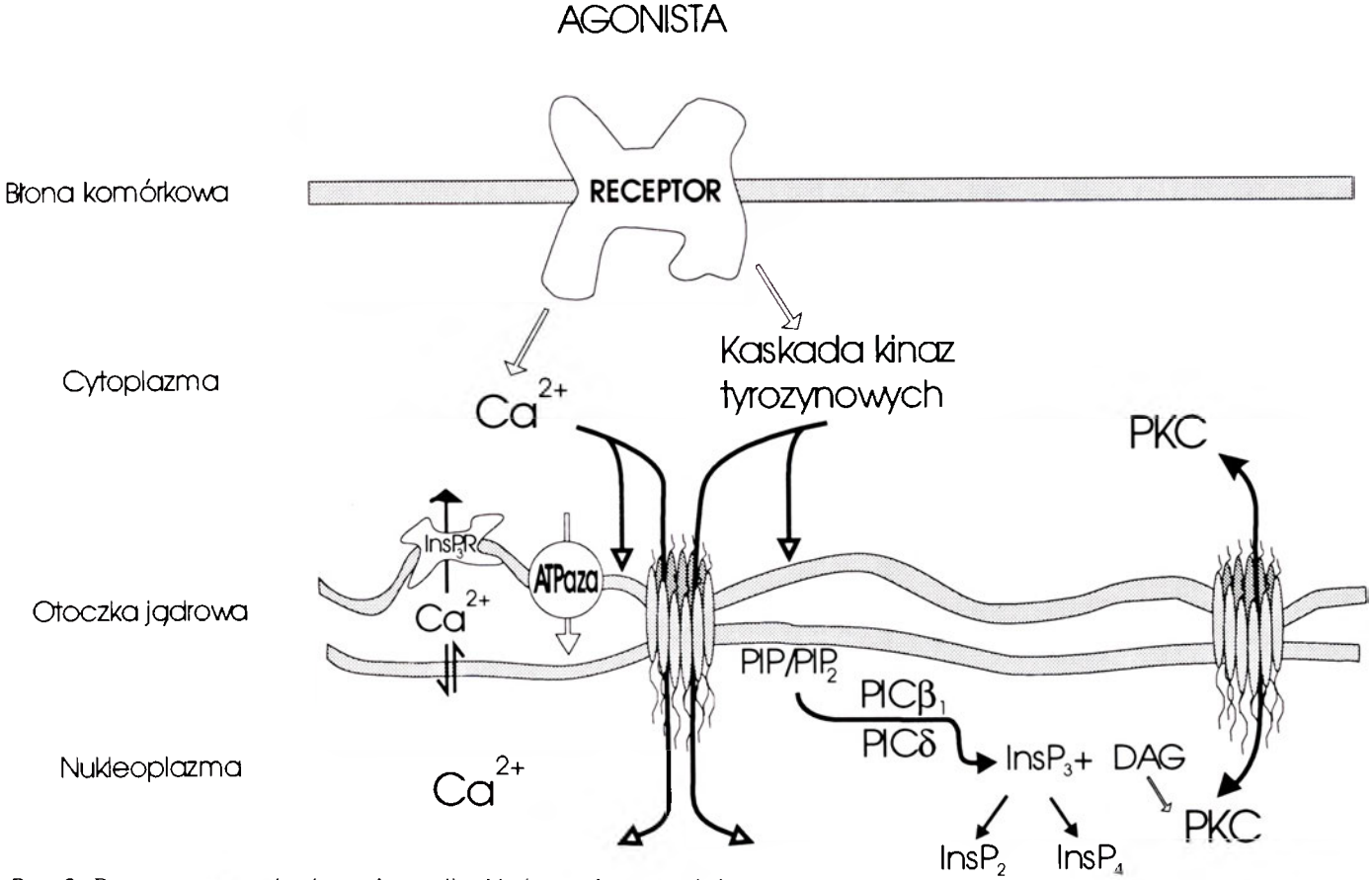
Jak wspomniano we wstępie transport małych cząsteczek i jonów pomiędzy cytoplazmą i nukleoplazmą zachodzi na drodze biernej dyfuzji przez małe kanały kompleksów porów jądrowych. Niestety taki system transportu nie tłumaczy zarówno wyników badań nad transportem jonów Ca^{2+} prowadzonych na izolowanych jądrach [23, 24], jak i wyników otrzymanych z doświadczeń na pojedynczych komórkach. Te ostatnie prowadzone przy użyciu mikroskopii konwencjonalnej i konfokalnej wykazały, że zarówno w stanie spoczynku, jak i po stymulacji obserwowano gradient stężeń jonów Ca^{2+} pomiędzy jądrem i cytoplazmą [25]. W zależności od typu komórek stężenie jonów wapniowych w jądrze ($[Ca^{2+}]_n$) może przewyższać stężenie jonów wapniowych w cytoplazmie ($[Ca^{2+}]_c$), być równe lub niższe [25, 26]. Co więcej, w czasie stymulacji komórek, zmiany $[Ca^{2+}]_n$ i $[Ca^{2+}]_c$ mogą przebiegać z różną intensywnością i niezależnie w czasie [25, 26]. Trudno jeszcze zaproponować model regulacji $[Ca^{2+}]_n$, który łączyłby wszystkie poznane dotąd fakty. Nicotera i wsp. [26] wysunęli hipotezę, że być może homeostaza wapniowa w jądrze jest kontrolowana dzięki selektywnym zmianom w przepuszczalności porów jądrowych w połączeniu z aktywnymi mechanizmami regulującymi jądrowe lub okołojądrowe pule wapniowe (Ryc. 2).

Wiadomo jednak, że różne związki działając na komórkę mogą powodować, często bardzo wybiórcze, zmiany $[Ca^{2+}]_n$, co w następstwie prowadzi do różnic w ekspresji genów [27] lub też innych zmian w genomie [28].

V. Diacyloglicerol i kinaza białkowa C w jądrze

Badając obecność kinazy białkowej C (PKC) w jądrach stwierdzono, że PKC może być enzymem konstytutywnym lub pojawiać się dopiero po stymulacji komórek różnymi mitogenami [10, 29]. Immunochemicznie wykazano, że w jądrze może istnieć wiele izoenzymów PKC oraz, że nie wszystkie w równym stopniu ulegają aktywacji [29, 30]. W fibroblastach

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Proponowane mechanizmy aktywacji cyklu inozytolowego w jądrze. Objaśnienia symboli w wykazie stosowanych skrótów.

(3T3 i IIC9) TPA oraz α-trombina powodują kilkukrotne podwyższenie aktywności jądrowej PKC α, natomiast nie zmieniają aktywności PKC ε i PKC ξ, które to enzymy są obecne w jądrach komórek spoczynkowych i stymulowanych mitogenami [29]. Wydaje się, że estry forbolu mogą ułatwiać translokację cytozolowej PKC do jądra, natomiast mechanizm działania innych mitogenów pozostaje nieznany [14, 31]. Po stymulacji komórek 3T3 przez IGF-I obserwowano wzrost aktywności jądrowej PKC i jej translokację do jądra (Ryc. 2). Należy pamiętać, że przemieszczanie PKC do jądra jest skorelowane czasowo z powstawaniem DAG z rozpadu jądrowych fosfatydyloinozytoli [9]. Mechanizm wchodzenia PKC do jądra po stymulacji komórek jest dość niejasny. Istnieje hipoteza, że niektóre izoformy PKC w sposób ciągły wchodzą i wychodzą z jądra. W momencie zadziałania agonisty i wzrostu poziomu jądrowego DAG następuje „zatrzymanie" PKC wewnątrz jądra [14]. Wydaje się, że PKC jest enzymem regulującym wiele funkcji jądrowych, gdyż substratami jej w jądrze są m.in. laminy A, B i C, topoizomeraza I, RNA-polimeraza II, histon H_1, białko poli(A) wiążące się z otoczką jądrową oraz receptor $InsP_3$ [10, 14]. W komórkach regenerującej wątroby szczura wzrost stężenia jądrowych DAG i pojawianie się PKC w jądrze jest ściśle skorelowane z fazą S cyklu komórkowego [21].

Artykuł otrzymano 10 grudnia 1994 r.
Zaakceptowano do druku 19 grudnia 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Dingwall C, Laskey R (1992) *Science* **258**: 942-947
2. Pante N, Aebi U (1993) *J Cell Biol* **122**: 977-984
3. Rout MP, Wente SR (1994) *TICB* **4**: 357-365
4. Barańska J (1992) W: Rozpad fosfolipidów z przekazywaniem informacji w komórce, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Warszawa
5. Baker RR, Chang H-Y (1980) *J Biochem* **188**: 153-161
6. Smith CD, Wells WW (1984) *J Biol Chem* **258**: 9368-9373
7. Cocco L, Gilmour RS, Ognibene A, Letcher AJ, Manzoli FA, Irvine F (1987) *Biochem J* **248**: 765-770
8. Divecha N, Banfic H, Irvine F (1991) *EMBO J* **10**: 3207-3214
9. Banfic H, Zizak M, Divecha N, Irvine RF (1993) *Biochem J* **290**: 633-636
10. Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS (1994) *Cellular Signaling* **6**: 481-485
11. Payrastre B, Nievers M, Boonstra J, Breton M, Verkleij AJ, Bergen PMP (1992) *J Biol Chem* **267**: 5078-5084
12. Divecha N, Banfic H, Irvine RF (1994) *Cell Calcium* **16**: 297-300

http://rcin.org.pl

13. Xing Y, Johnson CV, Dobner PR, Lawrence JB (1993) *Science* **259**: 1326-1330
14. Divicha N, Banfic H, Irvine F (1993) *Cell* **74**: 405-407
15. Rhee S-G, Choi KD (1992) *J Biol Chem* **267**: 12360-12396
16. Seydel U, Gerace L (1991) *J Biol Chem* **266**: 7602-7608
17. Rubins JB, Bendiit JO Dickey BF, Riedel N (1990) *Cell Biology* **87**: 7080-7084
18. Asano M, Tamiya-Koizumi K, Homma Y, Takenawa T, Nimura Y, Kojima K, Yoshida S (1994) *J Biol Chem* **269**: 12360-12366
19. Sylvia V, Curtin G, Norman J, Stec J, Busbee D (1988) *Cell* **54**: 651-658
20. Suzuki K, Saido TC, Hairi S (1992) *Ann NY Acad Sci* **674**: 218-227
21. Kuriki H, Tamiya-Koizumi K, Asano M, Yoshid S, Kojima K, Nimura Y (1992) *J Biochem* **111**: 283-286
22. Lanini L, Bachs S, Carafoli E (1992) *J Biol Chem* **267**: 11548-11552
23. Nicotera P, McConkey DJ, Jones DP, Orrenius S (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 453-457
24. Nicotera P, Orrenius S, Nilsson T, Berggen GP (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6858-6862
25. Himpens B, Smedt H, Cateels R (1994) *Cell Calcium* **16**: 239-246
26. Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S (1994) *Cell Calcium* **16**: 279-288
27. Bading H, Ginty DD, Greenberg ME (1993) *Science* **260**: 181-186
28. Nicotera P, Zhivotovsky B, Bellomo G, Orrenius S (1994) Ion signalling in apoptosi. In: Schimke RT, Minich E, (eds) Apoptosis, New York, Plenum Press, pp. 97-110
29. Leach KL, Raben DM (1993) *Biochem Soc Trans* **21**: 879-883
30. Leach KL, Ruff VA, Jarpe MB, Adams LD, Fabbro D, Raben DM (1992) *J Biol Chem* **267**: 21816-21822
31. Divecha N, Banfic H, Irvine F (1993) *Biochem Soc Trans* **21**: 877-878

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

zaprasza do udziału w Konkursie na najlepszy wykład akademicki w roku 1995

Regulamin nagrody

1. Intencją nagrody jest popularyzacja biochemii i biologii molekularnej oraz pozyskanie materiałów dydaktycznych.

2. Warunkiem wzięcia udziału w Konkursie jest przygotowanie wykładu na wybrany temat uwzględniający najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie oraz ilustrujących go materiałów w postaci maszynopisu, rysunków i kompletu przezroczy. Termin nadsyłania materiałów mija 30.04.1995 r.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizuje sesję, na której zostaną wygłoszone konkursowe wykłady. Maksymalny czas wystąpienia 2 × 45 minut. W 1995 roku sesja odbędzie się na początku czerwca. Nagroda Główna i wyróżnienia zostaną przyznane w dniu Konkursu.

Członkowie Zarządu Głównego tworzą Komisję Konkursową. Ocenią oni prezentację, wartość merytoryczną i dydaktyczną wykładów przyznając od 0 do 10 punktów. Komisja obraduje niejawnie, a protokół z obrad i inne materiały pozostają w dokumentacji Towarzystwa. Nagrodę uzyska osoba, która otrzyma największą liczbę punktów. Nazwisko zwycięzcy Konkursu zostanie podane do wiadomości Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w „Postępach Biochemii" oraz w „Listach".

Materiały konkursowe: maszynopis wykładu, rysunki, przezrocza i programy komputerowe stają się własnością Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i będą rozpowszechniane w placówkach naukowych i dydaktycznych jako wykłady autorskie nagrodzonych osób, rekomendowane przez Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wymagana jest pisemna zgoda na przekazanie materiałów na własność Towarzystwa. Towarzystwo zastrzega sobie prawo do zakupu materiałów nienagrodzonych.

Niniejsza wersja regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 5 listopada 1990 roku.

http://rcin.org.pl

SYMPOZJA

Fundacja na Rzecz Rozwoju Glikobiologii — GLYCO XII uprzejmie zawiadamia, że **zamierza przyznać kilka stypendiów dla polskich uczestników XIIIth Symposium on Glycoconjugates**, które odbędzie się w **Seattle, USA w dniach 20—26 sierpnia 1995 r.**

Wysokość stypendium wyniesie 1000 USD. Stypendia zostaną przyznane na podstawie konkursu.

Warunkiem przystąpienia do konkursu jest przedstawienie, przyjętego przez organizatorów zjazdu, komunikatu oraz złożenie oświadczenia o wysokości ewentualnych dotacji z innych źródeł. O stypendium może ubiegać się tylko jeden autor pracy.

Zgłoszenia należy przesyłać na adres Fundacji:

ul. Wilcza 14b m 20, 00-532 Warszawa, w terminie do 1 czerwca 1995 r. według daty stempla pocztowego.

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii" w 1995 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jast jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu wraz z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszystkich trzech odcinkach przekazu.

Prenumerata krajowa dla instytucji:
580 000 zł.

Prenumerata krajowa indywidualna:
280 000 zł, (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

Prenumerując „Postępy Biochemii" wspierasz swoje czasopismo!

http://rcin.org.pl

Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd P.T.Bioch. uprzejmie prosi wszystkich członków o wpłatę zaległych i bieżących składek członkowskich. Zachęcamy także do zaprenumerowania „Postępów Biochemii".

Acta Biochimica Polonica

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

Pokwitowanie dla wpłacającego

zł .....

słownie .....

.....

wpłacający .....

.....

.....

.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę

zł. .....

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł.....

słownie .....

.....

wpłacający .....

.....

.....

.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę

zł. .....

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł .....

słownie .....

.....

wpłacający .....

.....

.....

.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....
podpis przyjmującego

http://rcin.org.pl

Wskazówki dla autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii" publikuje prace przeglądowe omawiające bieżące 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 „Postępach Biochemii" mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, czcionką wielkości standardowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm z trzydziestoma wierszami na stronie i 60 znakami w wierszu (litery + odstęp), odstępy pomiędzy wyrazami powinny odpowiadać jednemu znakowi (nie równać do prawego marginesu).
W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji nr telefonu i ewentualnie fax, adresy prywatne autorów, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrót tytułu pracy (do 25 znaków).

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

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

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

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

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

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii"
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa

http://rcin.org.pl

Kolejny, XXXI, Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się w Warszawie w dniach 6–8 września 1995 r. Pierwsze zawiadomienie Członkowie otrzymali w listopadzie.

PROGRAM NAUKOWY ZJAZDU:

1. Rola błon w regulacji procesów komórkowych.
2. Mięśnie w normie i patologii.
3. Biologia komórki nowotworowej.
4. Geny i genomy.
5. Biochemia receptorów.
6. Procesy biotransformacji.
7. Regulacja hormonalna.
8. Nauczanie biochemii.

Zjazdowi towarzyszyć będą wystawy sprzętu laboratoryjnego, aparatury i odczynników. Przewiduje się umieszczenie ogłoszeń w materiałach zjazdowych.

Zainteresowanych uczestnikom w Zjeździe, a także osoby chcące zasięgnąć informacji w sprawie wystaw i ogłoszeń prosimy o kontakt z sekretarzem Oddziału Warszawskiego, pod następującym adresem:

Doc. dr hab. Katarzyna NAŁĘCZ,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul Pasteura 3, 02-093 Warszawa,
tel. 659-85-71 w. 303, fax 22-53-42.

Z przyjemnością informujemy, że — wzorem lat ubiegłych — biochemicy polskiego pochodzenia i Polacy pracujący w krajach byłego Związku Radzieckiego mogą ubiegać się o pokrycie kosztów uczestnictwa w Zjeździe i pobytu w Warszawie. Serdecznie zapraszamy i prosimy o powiadomienie o tej możliwości zainteresowanych kolegów. Zgłoszenia przyjmuje Pełnomocnik Zarządu do kontaktów z kolegami w krajach byłego ZSRR — profesor dr med. Marek Gniazdowski z Zakładu Chemii Ogólnej Akademii Medycznej (ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź, tel. 784-277) oraz Zarząd Główny P.T. Bioch. (ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa).

Kwartalnik „Postępy Biochemii" wydawany z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych

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

Obecny adres:

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Tel. bezpośredni 658 20 99
Tel. przez centralę 659 85 71 w. 352
Fax 22 53 42

Dyżury biura Zarządu odbywać się będą jak dotychczas
we wtorki w godz 12-18

http://rcin.org.pl

A P E L

Rektora i Senatu Akademii Medycznej w Warszawie oraz Stowarzyszenia Wychowanków Warszawskiej Medycyny i Farmacji

Rektor i Senat Akademii Medycznej w Warszawie oraz Stowarzyszenie Wychowanków Warszawskiej Medycyny i Farmacji zwracają się do wszystkich absolwentów, studentów i pracowników naszej Uczelni, do pacjentów klinik akademickich i ich rodzin, do firm prywatnych i państwowych, do wszystkich ludzi dobrej woli z prośbą o finansowe lub rzeczowe wsparcie budowy Biblioteki Akademii Medycznej w Warszawie.

Akademia Medyczna w Warszawie ma długie tradycje nauczania medycyny sięgające końca XVIII stulecia; ma także duże osiągnięcia na polu naukowym i dydaktycznym. Boryka się z wieloma problemami, ale jej naczelną i nienaruszalną zasadą jest utrzymywanie nauczania medycyny na wysokim, europejskim poziomie. W tych zmaganiach istnieje jeden problem, którego nie można rozwiązać w ramach Akademii. Problemem tym jest **bardzo zły stan Biblioteki. Biblioteka każdego uniwersytetu jest jego mózgiem**.

Od wczesnych lat pięćdziesiątych Biblioteka Akademii jest sublokatorem jednego z zakładów. Ciasne, ciemne, niedostosowane do pracy i nauki pomieszczenia biblioteczne w bezpośrednim sąsiedztwie przechowalni zwłok i sali sekcyjnej są przeładowane zbiorami. Zbiory Biblioteki powiększają się z roku na rok, m.in. dzięki pomocy Polonii rozsianej po świecie, w tym wychowanków naszej Alma Mater. **Warunki przechowywania książek i czasopism naukowych są nie tylko skandalicznie złe, ale wręcz zagrażają podstawowym wymogom bezpieczeństwa i ochrony przeciwpożarowej**. Brak miejsca w czytelniach ogranicza możliwości korzystania z nich wszystkim studentom i pracownikom Akademii.

Dramatyczna sytuacja lokalowa Biblioteki uniemożliwia dalsze powiększanie zbiorów oraz bardzo utrudnia korzystanie z nowoczesnego sprzętu audiowizualnego i komputerowego. Ośrodek audiowizualny i komputerowe bazy danych mieszczą się kątem w małej czytelni czasopism, gdzie użytkownicy przeszkadzają sobie wzajemnie.

Radykalnym i jedynym rozwiązaniem tej bardzo złej kondycji Biblioteki naszej Alma Mater jest budowa nowego budynku.

Dlatego odwołujemy się do sentymentu, życzliwości, ofiarności i poczucia więzi Wychowanków z Uczelnią, szczególnie do tych, którzy zostali rzuceni przez los do rozmaitych krajów świata. Apelujemy do całego społeczeństwa:

POMÓŻCIE — W MIARĘ SWOICH MOŻLIWOŚCI — W BUDOWIE GMACHU BIBLIOTEKI AKADEMII MEDYCZNEJ W WARSZAWIE

Liczyć się będzie każda złotówka i każdy dolar.

Wszyscy ofiarodawcy będą uhonorowani wpisem do księgi pamiątkowej. Szczególnie zasłużeni otrzymają dyplom honorowy **Bene Meritus**. Nazwiska wybitnych fundatorów zostaną umieszczone w hallu przyszłego gmachu Biblioteki świadcząc po wsze czasy o ich udziale w szlachetnym dziele budowy.

O postępie prac związanych z budową Biblioteki będziemy systematycznie informować wszystkich ofiarodawców.

Podajemy numer konta: **PBK SA VIII O/W-wie nr 370028-4271-139-113 „Biblioteka"**

Rektor, Senat i Stowarzyszenia Wychowanków
Warszawskiej Medycyny i Farmacji
02-032 Warszawa, ul. Filtrowa 30
Tel./Fax 628-22-37

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl