

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 46, NR 3, 2000

Rozpoznanie uszkodzeń DNA	193
Regulacja efektywności translacji	207
Syntetyczne wirusy	219
Transfer genów	227
Dendrymery	234
Sygnal wapniowy w mitochondriach	247
Aneksynopatie	253
Aktywacja plazminogenu i angiogeneza	261

Z okazji pięknego jubileuszu osiemdziesiątych piątych urodzin Pani Profesor ZOFII ZIELIŃSKIEJ

od roku 1960 stale czynnej we władzach i agendach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wieloletniego Prezesa Towarzystwa, od 1973 roku Naczelnego Redaktora Kwartalnika „Postępy Biochemii”, Członka Honorowego naszego Towarzystwa

mamy zaszczyt i przyjemność złożyć najserdeczniejsze życzenia zdrowia, pomyślności i dalszej aktywności zawodowej.

Pod wymagającym, lecz zawsze życzliwym okiem Pani Profesor, wielu z nas doskonało swe umiejętności pisania prac przeglądowych, korzystając z Jej wiedzy i doświadczenia. Jesteśmy pełni wdzięczności, uznania oraz podziwu dla dokonań, niespożytej energii i ujmującej osobowości Pani Profesor.

W imieniu czytelników i autorów prac publikowanych w „Postęпах Biochemii”, całej społeczności biochemicznej, Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Redakcji Kwartalnika „Postępy Biochemii”

Jolanta Barańska
Liliana Konarska
Grażyna Palamarczyk

Kwartalnik „Postępy Biochemii” wydawany z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych
Indeksowany w Medline i Agrolibrex

WYDAWCA

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

REDAKTOR NACZELNY

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

ZASTĘPCA

REDAKTORA NACZELNEGO

Executive Editor
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02

REDAKTORZY

Editors
IWONA FIJAŁKOWSKA
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
LILIANA KONARSKA
ANNA SZAKIEL
ADAM SZEWCZYK

BIURO REDAKCJI

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

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
JOANNA BANDOROWICZ-
PIKUŁA (Warszawa)
EWA BARTNIK (Warszawa)
CZESŁAW CIERNIEWSKI (Łódź)
MAGDALENA FIKUS (Warszawa)
MARIA KOZIOŁKIEWICZ (Łódź)
JACEK MALEJCZYK (Warszawa)
ANNA PRZYKORSKA (Warszawa)
JOANNA TRZCIŃSKA-
DANIELEWICZ (Warszawa)
BARBARA TUDEK (Warszawa)
LECH WOJTCZAK (Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

- Białka rozpoznające i wiążące się z uszkodzonym DNA; udział w mechanizmach naprawy DNA i kancerogenezie**
Proteins recognizing and binding damaged DNA; involvement in DNA repair and carcinogenesis
PIOTR WIDŁAK 198
- Rola struktury mRNA w inicjacji translacji u Eukaryota**
Role of mRNA structure in initiation of translation in Eukaryotes
KRZYSZTOF SOBCZAK, WŁODZIMIERZ KRZYŻOSIAK 207
- Perspektywy wykorzystania syntetycznych wirusów w terapii genowej**
Prospects of using synthetic viruses in gene therapy
ALEKSANDER SOCHANIK, STANISŁAW SZALA 219
- Wewnątrzkomórkowy transfer genów**
Intracellular genes transfer
ANNA POWOLNY, HANNA JAŃSKA 227
- Dendrymery – nie takie znowu normalne polimery**
Dendrimers – not so common polymers
DARIUSZ M. DOMAŃSKI, MIŁOSZ A. FABER 234
- Współzależność funkcjonalna mitochondriów oraz siateczki śródplazmatycznej a sygnał wapniowy**
Cross-talk between mitochondria and endoplasmic reticulum, and calcium signalling
MAGDALENA WAŚNIEWSKA 247
- Aneksynopatie – choroby związane z nieprawidłowym poziomem aneksyn w komórkach**
Anexinopathies – annexin-related diseases
JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA 253
- Rola urokinazowego układu aktywacji plazminogenu w angiogenezie**
Role of urokinase plasminogen activation system in angiogenesis
BEATA SMOLARZ, JANUSZ BŁASIAK, ANDRZEJ KULIG 261

Białka rozpoznające i wiążące się z uszkodzonym DNA; udział w mechanizmach naprawy DNA i kancerogenezie

Proteins recognising and binding damaged DNA; involvement in DNA repair and carcinogenesis

PIOTR WIDŁAK

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Enzymy, których substratem są zmodyfikowane zasady DNA
- III. Rozpoznanie uszkodzeń w mechanizmie naprawy przez wycinanie nukleotydów
- IV. Białka rozpoznające pęknięcia nici DNA
- V. Białka chromatyny mające powinowactwo do uszkodzonego DNA
- VI. Czynniki transkrypcyjne mające powinowactwo do uszkodzonego DNA
- VII. Rola białek rozpoznających uszkodzony DNA w procesach nowotworzenia

Wykaz stosowanych skrótów: AAAF — N-acetoksy-acetylamino-fluoren; BER — naprawa przez wycięcie zasady (ang. *base excision repair*); BPDE — diolepksyd benzo(a)pirenu; cis-DDP — cis-dwuchlorodwuamino-platyna; CPD — cyklobutanowy dimer pirymidynowy; DNA-PK — kinaza białkowa zależna od DNA; DSB — dwuniciowe pęknięcie DNA (ang. *double-strand break*); HMG — ang. *high mobility group*; NER — naprawa przez wycięcie nukleotydu (ang. *nucleotide excision repair*); NHEJ — naprawa przez rekombinację niehomologiczną (ang. *nonhomologous end-joining*); PARP — polimeraza poli(ADP)rybozy; 6-4PP, 6-4 fotoprodukt; SSB — jednoniciowe pęknięcie DNA (ang. *single-strand break*); XP — zespół skóry pergaminowej (ang. *xeroderma pigmentosum*); XRCC — grupa komplementacyjna naprawy uszkodzeń popromiennych (ang. *X-ray repair cross complementation*).

Contents:

- I. Introduction
- II. Enzymes specific for modified DNA bases
- III. Damage recognition in nucleotide excision repair
- IV. Proteins recognizing DNA strand breaks
- V. Chromatin proteins with an affinity for damaged DNA
- VI. Transcription factors with an affinity for damaged DNA
- VII. Damage recognition proteins and cancer

I. Wstęp

Szereg fizycznych i chemicznych czynników środowiskowych może modyfikować strukturę chemiczną materiału genetycznego. Czynniki takimi są promieniowanie elektromagnetyczne (UV i promieniowanie jonizujące) i związki chemiczne pochodzące ze środowiska „zewnętrznego” lub będące produktami metabolizmu. Efektem działania tych czynników są pęknięcia fosfodwuestrowego łańcucha kwasów nukleinowych lub chemiczne modyfikacje czterech podstawowych zasad, głównie ich oksydacja lub alkilacja (czy aryłacja). Takie modyfikacje struktury DNA nazywamy jego uszkodzeniami. W komórkach wszystkich organizmów wykryto obecność białek swoiście oddziałujących z uszkodzonym DNA. Mają one wyższe (często o kilka rzędów wielkości) powinowactwo do DNA zawierającego uszkodzenia niż do nieuszkodzonego DNA o takiej samej sekwencji. W terminologii angielskojęzycznej białka te nazywane są *Damaged DNA-Binding Prote-*

*Dr, Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii, Oddział w Gliwicach; Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice.

in (DDB-protein) lub *Damage Recognition Protein*. Część tych białek rozpoznaje zaburzenia struktury DNA związane z obecnością uszkodzenia (odcinki jednoniciowe, nietypowa geometria), inne mają powinowactwo do struktury chemicznej samego uszkodzenia. Wiadomo, że część białek rozpoznających uszkodzony DNA związana jest z mechanizmami naprawy DNA i warunkuje przebieg pierwszego etapu naprawy – detekcję uszkodzenia. Inne białka z tej

wiane są szerzej białka rozpoznające błędnie sparowane nukleotydy (np. związane z mechanizmem *mismatch repair*). W związku z rozległą literaturą przedmiotu autor stara się cytować jedynie nowsze prace oryginalne, a tam gdzie było to możliwe odsyła do innych prac przeglądowych. Opisywane białka zostały w sposób sumaryczny przedstawione w dwu tabelach. Tabela 1 zawiera białka biorące udział w naprawie DNA, a Tabela 2 – białka, które nie są bez-

Tabela 1

Ludzkie białka naprawcze rozpoznające uszkodzony DNA.

Białko (lub kompleks)	Funkcja	Rodzaj naprawy	Rozpoznawane uszkodzenie
MGMT	Metylotransferaza	Naprawa bezpośrednia	O ⁶ -metyloguanina
UDG	Glikozylaza	BER	Uracyl
MPG	Glikozylaza	BER	N ³ -metylopuryny N ⁷ -metylopuryny Hipoksantyna
hOGG1	Glikozylaza	BER	8-oksoguanina Formamidopirymidyna
hNTH1	Glikozylaza	BER	Glikol tyminy
APE	AP-endonukleaza	BER	Miejsca AP
PARP	Polimeraza poli(ADP)rybozy	BER	SSB, DSB
XPA – RPA	Rozpoznanie uszkodzenia	NER	CPD, 6-4PP; Addukty: <i>cis</i> -DDP
XPC – HR23B	Rozpoznanie uszkodzenia	NER	CPD, 6-4PP; addukty: <i>cis</i> -DDP i AAAF
UV-DDB (XPE)	Rozpoznanie uszkodzenia	NER	6-4PP
RAD50 – MRE1	Egzonukleaza	NHEJ, rekombinacja homologiczna	SSB, DSB
RAD52	Składnik rekombinosomu	Rekombinacja homologiczna	SSB, DSB
Ku70 – Ku86	Podjednostka DNA-PK	NHEJ	DSB
MSH2 – MSH6 MSH2 – MSH3	Rozpoznanie uszkodzenia	<i>Mismatch repair</i>	Źle sparowane zasady i pętle DNA

grupy zostały zidentyfikowane jako białka chromatyny lub czynniki transkrypcyjne, których powinowactwo do DNA ulega zmianie (często drastycznie) w obecności uszkodzeń. Aktywność białek wiążących się z uszkodzeniami decyduje o przebiegu procesów naprawy DNA i ma istotne znaczenie dla wrażliwości (czy oporności) komórki na działanie czynników mutagennych i kancerogennych.

Niniejszy przegląd dotyczy głównie tych białek wiążących się z uszkodzonym DNA, które zostały wykryte w komórkach ludzkich. W pracy nie oma-

pośrednio związane z mechanizmami naprawy DNA.

II. Enzymy, których substratem są zmodyfikowane zasady DNA

Szereg białek naprawczych mających powinowactwo do chemicznie zmodyfikowanego DNA wykazuje aktywność enzymatyczną. Białka takie mają powinowactwo do jednego typu uszkodzenia, ewentualnie do niewielkiej grupy związków o bardzo zbliżonej strukturze. W przypadku takich białek roz-

poznanie uszkodzenia DNA, którym zwykle jest zmodyfikowana zasada, polega na typowym oddziaływaniu enzymu z substratem. Umieszczenie zmodyfikowanej zasady w centrum katalitycznym białka poprzedzone jest jej „wyciągnięciem” poza helisę DNA (mechanizm ang. *flip-out*). Białka o powyższym charakterze związane są z mechanizmami naprawy bezpośredniej lub naprawy przez wycięcie zasady (BER, ang. *Base Excision Repair*).

Tabela 2

Nie związane z naprawą białka rozpoznające uszkodzony DNA.

Białko	Funkcja	Powinowactwo do uszkodzenia
HMG 1 HMG 2	Główne niehistonowe białka chromatyny (swoiste dla chromatyny aktywnej)	Addukty: <i>cis</i> -DDP, BPDE, AAAF; CPD, 6-4PP
SSRP1	Białko z rodziny „HMG-box”	Addukty: <i>cis</i> -DDP
histon H1	Histon wiążący się z DNA łącznikowym (swoisty dla chromatyny nieaktywnej)	Addukty: <i>cis</i> -DDP
hUBF	Czynnik transkrypcyjny	Addukty: <i>cis</i> -DDP
Sp1	Czynnik transkrypcyjny	Addukty: BPDE
YB-1	Czynnik transkrypcyjny	Miejsca AP
p53	Czynnik transkrypcyjny (udział w odpowiedzi komórki na stres, m.in. uszkodzenia DNA)	Pętle i pęknięcia nici DNA

Przykładem naprawy bezpośredniej jest naprawa O⁶-metyloguaniny. Naprawa zależna jest od pojedynczego białka, O⁶-metyloguanino-metylotransferazy (MGMT), i polega na przeniesieniu grupy metylowej z guaniny na resztę cysteinową enzymu [1]. Innym przykładem naprawy bezpośredniej jest fotoreaktywacja uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie UV, polegająca na rozszczepieniu dodatkowych wiązań pomiędzy sąsiednimi pierścieniami zasad. Reakcja katalizowana jest w obecności światła widzialnego przez fotolizy. Fotolizy swoiste dla uszkodzeń typu CPD lub 6-4PP wykryto w wielu grupach organizmów, nie znaleziono ich jednak u ssaków. W ciemności fotolizy mogą wiązać się z uszkodzeniami DNA indukowanymi przez promieniowanie UV (a również *cis*-DDP) i modulować usuwanie tych uszkodzeń w mechanizmie naprawy przez wycinanie [1, 2].

BER jest złożonym procesem naprawczym, którego pierwszym etapem jest usunięcie zmodyfikowanej zasady i utworzenie w DNA miejsca apurynowego bądź apirymidynowego (miejsce AP). Następnie nić zawierająca miejsce AP ulega przecięciu, krótki jej fragment (jeden do kilku nukleotydów) ulega wy-

cięciu a następnie uzupełnieniu. W usunięciu zmodyfikowanych zasad, czyli pierwszym etapie naprawy, biorą udział swoiste glikozylazy DNA. Katalizują one hydrolizę wiązania N-glikozydowego pomiędzy deoksyrybozą a puryną lub pirymidyną [3]. Różne modyfikacje zasad rozpoznawane są przez swoiste glikozylazy. W komórkach ludzkich wykryto glikozylazy DNA rozpoznające następujące modyfikacje zasad: metylopuryny (N³-metyloadeninę, N⁷ i N³-

metyloguaninę oraz hipoksantynę), 8-oksoguaninę (oraz formamidopirymidynę), glikol tyminy, uracylu, 5-formylouracylu i 5-hydroksymetylouracylu. Komórki ludzkie posiadają również glikozylazy usuwające błędnie sparowane zasady: adeninę sparowaną z guaniną i tyminę (będącą w tym miejscu produktem deaminacji metylocytozyny) sparowaną z guaniną. Ludzkie geny kodujące większość glikozylaz zostały sklonowane, a glikozylaza uracylu jest pierwszym ludzkim białkiem naprawczym o znanej strukturze krystalicznej [1, 4]. Miejsca apurynowe/apirymidynowe, będące efektem działania glikozylaz lub spontanicznej depurynacji, rozpoznawane są przez AP-endonukleazy. W komórkach ludzkich znaleziono AP-endonukleazę (białko HAP/APE) hydroliczącą wiązanie fosfodwuestrowe po stronie 5' miejsca AP. Niektóre glikozylazy (głównie bakteryjne) wykazują aktywność AP-liazy, i rozszczepiają nić DNA po stronie 3' miejsca AP. Fragment nici DNA zawierający miejsce AP usuwany jest i uzupełniany w złożonej reakcji wymagającej współdziałania szeregu innych białek (m. in. egzonukleaz, polimeraz i ligaz DNA) [1, 3-5].

III. Rozpoznanie uszkodzeń w mechanizmie naprawy przez wycinanie nukleotydów

Najbardziej uniwersalnym mechanizmem naprawy DNA, usuwającym uszkodzenia indukowane przez promieniowanie UV i wiele czynników chemicznych, jest naprawa przez wycięcie nukleotydu (NER, ang. *Nucleotide Excision Repair*). Kolejnymi etapami naprawy są: 1) rozpoznanie uszkodzenia; 2) rozluźnienie struktury chromatyny i rozplecenie helisy DNA; 3) wycięcie fragmentu nici DNA zawierającego uszkodzenie; 4) synteza i ligacja brakującego fragmentu nici DNA; 5) odtworzenie pierwotnej struktury chromatyny. Zdolność naprawy wielu różnych typów uszkodzeń DNA związana jest tu z wykorzystaniem do rozpoznania uszkodzenia białek nie mających funkcji enzymatycznych lecz mogących wiązać się z DNA o zaburzonej strukturze [1]. W komórkach bakteryjnych (*Escherichia coli*) w mechanizmie NER bierze udział 6 białek, z czego UvrA, UvrB i UvrC swoiste są wyłącznie dla tego procesu. Uszkodzenie DNA rozpoznawane jest przez kompleks (UvrA)₂UvrB. Dimer UvrA jest czynnikiem rozpoznającym zaburzenie struktury helisy DNA, natomiast białko UvrB katalizuje lokalne rozkręcenie helisy i wiąże się do uszkodzonej nici. Od związanego z DNA kompleksu oddysocjowuje dimer UvrA, natomiast wiąże się białko UvrC tworząc wraz z UvrB aktywną nukleazę [6].

Z mechanizmem NER w komórkach eukariotycznych związana jest aktywność około 30 peptydów nie wykazujących homologii z białkami bakteryjnymi (podobieństwo obu systemów wynika z konwergencji). Trzy spośród kilkunastu białek całkowicie niezbędnych w mechanizmie NER wykazują podwyższone powinowactwo dla uszkodzonego DNA; są to XPA, RPA i kompleks XPC-HR23B [7]. Białko XPA (i jego homolog Rad14 z komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) wykazuje niewielką homologię z białkiem UvrA bakterii. Białko to posiada motyw palca cynkowego (ang. *zinc-finger*) i ma podwyższone powinowactwo do DNA uszkodzonego przez promieniowanie UV (głównie do 6-4PP) i *cis*-DDP [8]. Białko RPA składa się z trzech peptydów o masach 14, 34 i 70 kDa, ma zdolność wiązania się z jednoniciowym DNA i bierze udział również w replikacji DNA (stąd angielska nazwa: *Replication Protein A*). Białko RPA, a ściślej podjednostka p34, ma zdolność oddziaływania z białkiem XPA. Kompleks XPA-RPA ma silniejsze powinowactwo do uszkodzonego DNA (również do CPD). Najprawdopodobniej w warunkach *in vivo* oba białka funkcjonują w kompleksie [9]. Białko XPC opisane zostało pier-

wotnie jako czynnik związany z naprawą genów nieaktywnych transkrypcyjnie. Białko to występuje w kompleksie z białkiem HR23B (białka homologiczne z komórek *S. cerevisiae* to odpowiednio Rad4 i Rad23). Kompleks XPC-HR23B wykazuje podwyższone powinowactwo do DNA uszkodzonego przez UV, *cis*-DDP i AAF [10]. Wszystkie trzy opisane powyżej białka wiążą się z jednoniciowym DNA, a ich powinowactwo do uszkodzonego DNA jest stosunkowo niewielkie (10-100 razy wyższe niż do nieuszkodzonego DNA). Wyniki prac opublikowanych w ostatnim czasie sugerują, że pierwotnym czynnikiem rozpoznającym uszkodzenia jest kompleks XPC-HR23B. Jego związanie z uszkodzonym DNA inicjuje utworzenie kompleksu zawierającego białka XPA, RPA i czynnik transkrypcyjny TFIIH (tzw.: ang. *preincision complex*). Funkcja tego kompleksu polega na lokalnym rozpleceniu helisy DNA (w skład czynnika TFIIH wchodzi helikazy XPB i XPD) i „weryfikacji” uszkodzenia. Następnie z kompleksu usuwane jest XPC-HR23B, a przyłączają się endonukleazy XPG i XPF-ERCC1. W przypadku naprawy nici transkrybowanej, niezależnej od białka XPC, rolę kompleksu XPC-HR23B mogłaby spełniać polimeraza II RNA zablokowana na uszkodzeniu (wraz z białkami CSA i CSB) [10, 11].

Czynnikiem decydującym o prawidłowym przebiegu naprawy jest precyzja rozpoznania uszkodzenia przy jednoczesnym zachowaniu maksymalnie dużego spektrum rozpoznawanych uszkodzeń. Sugeruje się, że jest to możliwe dzięki wykorzystaniu dwustopniowego mechanizmu rozpoznania. W pierwszym etapie białko XPC-HR23B (lub ewentualnie XPA-RPA) rozpoznawałoby zaburzenia dwuniciowej struktury DNA związane z obecnością uszkodzenia. Większość uszkodzeń DNA naprawianych na drodze NER indukuje lokalne rozkręcenie (ang. *unwinding*), zagięcie (ang. *bending*) lub denaturację (ang. *unpairing*) helisy, a uszkodzenia silniej zaburzające strukturę DNA naprawiane są szybciej. Na drugim etapie (weryfikacja) rozpoznawana byłaby chemiczna modyfikacja nukleotydu i określana byłaby nić zawierająca to uszkodzenie. Etap ten byłby zależny od aktywności helikaz XPB i XPD, których translokacja wzdłuż nici DNA blokowana jest przez chemicznie zmodyfikowane nukleotydy [11]. W związku z olbrzymimi rozmiarami genomu ludzkiego (~10⁹ par zasad) czynnikiem decydującym o efektywności naprawy jest szybkość wyszukiwania uszkodzeń. Można wymienić szereg czynników mogących mieć wpływ na wydajność wyszukiwania i rozpoznawania uszkodzeń. Są to: 1) Współdziałanie wielu oddziałujących ze sobą kompleksów

(opisane wcześniej XPA-RPA, XPC-HR23B, TFIIH). 2) Udział białek mających zdolność translokacji wzdłuż DNA i ulegających zablokowaniu na uszkodzeniu (polimerazy RNA i helikazy DNA). Funkcją takiego detektora uszkodzeń pełni prawdopodobnie kompleks Rad7-Rad16 z komórek *S. cerevisiae* [12]. 3) Udział dodatkowych białek rozpoznających specyficzne typy uszkodzeń DNA. Przykładem jest białko UV-DDB mające bardzo silne powinowactwo do DNA uszkodzonego przez promieniowanie UV (kilka tysięcy razy silniejsze powinowactwo do DNA zawierającego 6-4PP niż do nieuszkodzonego DNA). Białko to składa się z dwu peptydów o masach 127 i 48 kDa. Stwierdzono, że gen kodujący peptyd p48 zmutowany jest w 6 z 19 znanych przypadków syndromu *Xeroderma Pigmentosum* grupy E. Transkrypcja białka p48 i aktywność UV-DDB stymulowana jest czynnikami uszkadzającymi DNA i zależna jest od białka p53 [13]. Białko UV-DDB jedynie nieznacznie stymuluje naprawę nagiego DNA w reakcji *in vitro*, jest natomiast istotne dla naprawy *in vivo*. Może to sugerować jego udział w zmianach struktury chromatyny w miejscu zawierającym uszkodzenie [14]. 4) Indukowane uszkodzeniami zmiany w strukturze chromatyny. Rozluźnienie struktury lub dekompozycja nukleosomów poprzedzająca etap wycięcia uszkodzenia i następnie odtworzenie struktury chromatyny po etapie syntezy naprawczej są niezbędnymi etapami NER. Można jednak założyć, że niektóre zaburzenia struktury chromatyny wynikające z obecności uszkodzenia i poprzedzające proces naprawy mogą ułatwiać lokalizację uszkodzenia przez białka naprawcze [1, 15, 16].

IV. Białka rozpoznające pęknięcia nici DNA

Promieniowanie jonizujące i niektóre związki chemiczne (np. bleomycyna) indukują pęknięcia fosfodwustrowego rdzenia DNA. Jeśli obie nici DNA przerwane są w niewielkiej odległości mówimy o dwuniciowym pęknięciu DNA (DSB, ang. *double-strand break*), które jest najsilniej cytotoksycznym uszkodzeniem DNA powstającym w napromienianej komórce. Naprawa tego typu uszkodzeń bazuje na mechanizmach rekombinacji. W komórkach niższych eukariotów (drożdże) naprawa DSB odbywa się głównie na drodze rekombinacji homologicznej zależnej od białek z grupy epistatycznej Rad52. W komórkach kręgowców naprawa DSB odbywa się głównie na drodze rekombinacji niehomologicznej (tzw. NHEJ, ang. *Nonhomologous End-Joining*), chociaż mechanizmy rekombinacji

homologicznej są tu również istotne dla naprawy pęknięć [17].

Podobnie jak przy naprawie innych typów uszkodzeń DNA, pierwszym etapem naprawy DSB jest detekcja pęknięcia. Detektorami DSB w komórkach ludzkich są białka Rad52 i Ku70/Ku86. Oba typy białek wiążą się selektywnie z końcami DNA chroniąc je przed egz nukleazami i ułatwiając ich ponowne złączenie (tworząc kompleks białko-DNA). Detektorem DSB związanym z rekombinacją homologiczną jest białko Rad52 [18]. Białko to stymuluje również katalizowaną przez białko Rad51 wymianę nici DNA pomiędzy homologicznymi odcinkami chromosomów. Reakcja katalizowana przez Rad51 jest dodatkowo stymulowana przez białka RPA, Rad54 (helikaza DNA) i inne białka z rodziny Rad51 (w komórkach ludzkich są to białka XRCC2 i XRCC3) [19]. Detektorem DSB związanym z mechanizmem NHEJ jest białko Ku, składające się z dwu podjednostek o masach 70 i 86 kDa (kodowane przez geny *XRCC6* i *XRCC5*) [20]. Z wolnymi końcami DNA oddziałują N-końcowa i C-końcowa domena Ku70, lecz zdolność wiązania DNA posiada heterodimer składający się z obu podjednostek [21]. Heterodimer Ku70/Ku86 wraz z białkiem DNA-PK_{CS} (podjednostka katalityczna kodowana przez gen *XRCC7*) tworzy kinazę białkową zależną od DNA (DNA-PK). Kinaza aktywowana jest po przyłączeniu do DNA, a jej aktywność jest niezbędna dla przebiegu NHEJ (choć mechanizm molekularny jej działania nie jest do końca jasny) [22, 23]. Aktywność kinazy DNA-PK istotna jest również dla przekazywania sygnału łączącego rozpoznanie uszkodzeń DNA z regulacją cyklu komórkowego [24]. Wiadomo, że (przynajmniej w komórkach drożdży) białko Ku zlokalizowane jest głównie w telomerach i regionach subtelerowych chromosomów (wraz z białkami Sir). W komórkach poddanych działaniu czynników indukujących pęknięcia nici, białko Ku ulega przemieszczeniu do miejsc zawierających DSB [25]. Sugeruje się, że proporcjonalny udział NHEJ i rekombinacji homologicznej w naprawie DSB w komórkach ludzkich zależy od poziomu białek Rad52 i Ku70/Ku86. Poziom białka Rad52 zwiększa się w późnej fazie S i fazie G2 cyklu komórkowego, w tym też czasie wzrasta udział rekombinacji homologicznej w naprawie DSB. Wydaje się również prawdopodobne, że komórka mogłaby regulować powinowactwo obu białek do DNA, na przykład poprzez ich modyfikacje [18, 26].

Pęknięcia nici i wolne końce DNA rozpoznawane są również przez szereg białek mających aktywność katalityczną. Jednym z nich jest kompleks

Rad50-Mre11. Kompleks ten ma aktywność 3' do 5' egz nukleazy i jest zaangażowany w obu typach rekombinacyjnej naprawy DSB. W komórkach ludzkich składnikiem tego kompleksu jest również białko p95/NBS1, a w komórkach drożdży białko Xrs2 [27]. Sugeruje się, że kompleks ten może wiązać się z końcami DNA niezależnie od innych białek wykrywających DSB [20]. Innym enzymem wiążącym się z pęknięciami nici i końcami DNA (i aktywowanym przez takie oddziaływania) jest polimeraza poli ADP-rybozy (PARP). PARP jest enzymem, który w obecności NAD⁺ (donor ADP-rybozy) katalizuje syntezę długich (do 250 reszt) i rozgałęzionych łańcuchów poli ADP-rybozy na grupach karboksylowych białek. Aktywny enzym może działać automodyfikująco, lub modyfikować niektóre białka chromatyny (np. histon H1 i histon H2B). Automodyfikacja białka PARP powoduje jego oddysocjowanie od DNA, utratę aktywności enzymatycznej i usunięcie rozgałęzionego łańcucha poli ADP-rybozy (reakcja katalizowana przez swoistą liazę i glikohydrolazę) [28, 29]. Białko PARP związane jest z naprawą DNA w mechanizmie BER. Białko to jest prawdopodobnie detektorem jednoniciowych pęknięć DNA będących efektem działania swoistych glikozylaz i AP-endonukleaz. PARP tworzy kompleks z białkiem XRCC1, polimerazą b DNA i ligazą III DNA [30]. Sugeruje to jego udział w jednej z dwu wersji mechanizmu BER, tak zwanym *short-patch pathway* [3]. W tej chwili nie jest jasne znaczenie aktywności katalizacyjnej białka PARP dla naprawy DNA. Sugeruje się, że katalizowana przez PARP modyfikacja histonów może być czynnikiem ułatwiającym rearanżację chromatyny w trakcie naprawy DNA [31]. Stwierdzono, że białko PARP może tworzyć kompleksy z białkiem Ku, nie jest jednak znana funkcja takich kompleksów *in vivo* [32]. Aktywność enzymatyczna PARP może mieć również znaczenie dla przekazywania sygnału związanego z regulacją cyklu komórkowego. Stwierdzono, że aktywacja czynnika transkrypcyjnego p53 może być zależna od aktywności PARP [33].

V. Białka chromatyny mające powinowactwo do uszkodzonego DNA

Jednym z chemicznych czynników genotoksycznych powszechnie wykorzystywanych w terapii przeciwnowotworowej jest *cis*-dwuchlorodwuaminoplatyna (*cis*-DDP). Jego działanie cytotoksyczne związane jest ze zdolnością tworzenia w DNA wiązań sieciujących. Obecność takich uszkodzeń indukuje silne zaburzenia struktury DNA (rozkręcenie

i zagięcie helisy) rozpoznawane przez wiele białek jądrowych [34]. Stwierdzono, że białkami o najsilniejszym powinowactwie do DNA zawierającego uszkodzenia indukowane przez *cis*-DDP (a konkretnie wiązania między purynami sąsiadującymi w tej samej nici, tzw. ang. *1,2-intrastrand crosslink*) są białka HMG-1 i HMG-2 [35]. Białka HMG-1/2 są białkami chromatyny wiążącymi się z DNA łącznikowym pomiędzy nukleosomami (jedna ich cząsteczka występuje na 10-15 nukleosomów), głównie w obrębie chromatyny aktywnej (lub potencjalnie aktywnej) transkrypcyjnie. Mają one silne powinowactwo do DNA o zmienionej strukturze, między innymi do fragmentów zagiętych i rozkręconych, co wyjaśnia ich powinowactwo do uszkodzeń indukowanych przez *cis*-DDP. Ostatnio poznana została struktura krystaliczna takich kompleksów. Białka HMG-1/2 oddziałują poprzez swoją domenę wiążącą DNA (tzw. „HMG-box”) z mniejszym rowkiem helisy DNA, który w miejscu uszkodzenia jest dodatkowo zawężony [36]. Białka HMG-1/2 wykazują podwyższone powinowactwo również do innych rodzajów uszkodzeń wywołujących zaburzenia struktury DNA: wiązań sieciujących utworzonych przez chrom [37], fotoproduktów indukowanych przez promieniowanie UV [38] i adduktów indukowanych przez policykliczne węglowodory aromatyczne (BPDE i AAAF) [39]. Białka HMG-1/2 mają ok. 100-krotnie wyższe powinowactwo do DNA uszkodzonego przez *cis*-DDP, i ok. 10-krotnie wyższe powinowactwo do pozostałych uszkodzeń DNA, niż do nieuszkodzonego DNA.

W komórkach eukariotycznych obecne są również inne białka wiążące się z DNA mające domenę „HMG-box”. Szereg białek z tej rodziny wykazuje podwyższone powinowactwo do DNA uszkodzonego przez *cis*-DDP. W komórkach ludzkich należą do nich białka SSRP1 (ang. *structure specific recognition protein*) [40] i hUBF (ang. *human upstream binding factor*) [41]. Innym białkiem chromatyny wykazującym podwyższone powinowactwo do DNA uszkodzonego przez *cis*-DDP jest histon H1 [42]. Histon H1 jest głównym białkiem chromatyny wiążącym się z DNA łącznikowym pomiędzy nukleosomami. Białka HMG-1/2 i histon H1 mają preferencje do fragmentów DNA o podobnych cechach strukturalnych. Można więc przypuszczać, że mechanizm ich oddziaływania z uszkodzonym DNA jest podobny.

Istnieje szereg hipotetycznych modeli opisujących efekty biologiczne oddziaływań białek chromatyny z uszkodzonym DNA i ich znaczenie dla wrażliwości komórek na działanie czynników geno-

toksycznych. Jeden z takich modeli, tzw. *repair shielding model* zakłada, że białka chromatyny mogą współzawodniczyć z białkami naprawczymi w wiązaniu uszkodzonego DNA. Uszkodzony fragment DNA po związaniu białka HMG nie byłby rozpoznawany przez białka naprawcze, co powodowałoby opóźnienie lub uniemożliwienie jego naprawy [43]. Doświadczalnym wsparciem tego modelu jest fakt, że białka HMG-1 i hUBF hamują naprawę indukowanych przez *cis*-DDP uszkodzeń DNA w reakcji *in vitro* [44]. Inne białko z tej rodziny, Ixr 1, spowalnia naprawę takich uszkodzeń w komórkach drożdży, zaś szczep drożdży pozbawiony tego białka charakteryzuje się wyższą opornością na działanie *cis*-DDP [45]. Hipotetycznie, związanie białek HMG lub histonu H1 z uszkodzonym DNA mogłoby również ułatwić naprawę uszkodzenia. Białka te, wiążąc się z uszkodzonym fragmentem DNA, mogłyby indukować rearanżację struktury chromatyny i wymuszać przesunięcie uszkodzenia do DNA łącznikowego, który naprawiany jest szybciej i wydajniej niż DNA z rdzenia nukleosomu. Oddziaływania białek z rodziny HMG i innych białek chromatyny z uszkodzonym DNA mogłyby również modyfikować metabolizm komórki niezależnie od ich wpływu na procesy naprawy DNA. Obecność uszkodzeń DNA powodowałaby przesunięcie białek HMG do tych regionów chromatyny, w których zwykle nie są obecne. Efektem byłyby zmiany struktury chromatyny i derepresja nieaktywnych genów.

VI. Czynniki transkrypcyjne mające powinowactwo do uszkodzonego DNA

Czynniki transkrypcyjne są białkami oddziałującymi z sekwencjami regulatorowymi genów (najczęściej w obrębie promotorów lub „enhancerów”) i modulującymi przebieg transkrypcji. Czynniki transkrypcyjne rozpoznają i wiążą się z dużym powinowactwem do swoistych sekwencji nukleotydów. Obecność zmodyfikowanych nukleotydów w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny zwykle osłabia to powinowactwo [46]. Jednak w niektórych przypadkach obecność uszkodzeń DNA powoduje wiązanie czynników transkrypcyjnych do sekwencji nie będących normalnie przez nie rozpoznawanych. Czynniki Sp1 jest białkiem wiążącym się z blokami sekwencji GC obecnymi w promotorach wielu genów. Zaobserwowano, że obecność adduktów indukowanych przez BPDE (modyfikacje guaniny) zwiększa dziesięciokrotnie powinowactwo Sp1 do przypadkowych sekwencji DNA [47]. Czynniki YB-1 jest białkiem

wiążącym się z motywem CCAAT obecnym na przykład w promotorze genu *MDR1* (ang. *multidrug resistance*). Białko to wiąże się również nie swoiście do DNA zawierającego miejsca AP [48]. Czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny „HMG-box” jest białko hUBF, swoiste dla genów rRNA. Białko to wykazuje podwyższone powinowactwo do DNA zawierającego wiązania sieciujące indukowane przez *cis*-DDP [41].

Obecność uszkodzeń DNA może wpływać na procesy transkrypcji trzema drogami; poprzez: (i) osłabianie powinowactwa czynników transkrypcyjnych do swoistych miejsc wiązania [46], (ii) zmniejszenie puli dostępnego czynnika transkrypcyjnego poprzez jego związanie z losowymi sekwencjami uszkodzonego DNA [41], (iii) wiązanie czynnika transkrypcyjnego do uszkodzonej sekwencji w obrębie promotora genu, który normalnie nie jest regulowany przez to białko [47]. Wszystkie trzy mechanizmy mogą prowadzić do deregulacji ekspresji genów. Zmiany ekspresji genów związane z obecnością uszkodzonych nukleotydów mają charakter epigenetyczny. Jednak zmiana ekspresji genów kodujących czynniki regulatorowe może trwale zmienić stan równowagi całego układu współdziałających czynników (czynniki transkrypcyjne, kinazy białkowe, białka receptorowe), który zostanie przekazany po podziale do komórek potomnych. Jeśli takie zmiany obejmują ekspresję czynników regulujących przebieg cyklu komórkowego, kontrolujących przekazywanie sygnału czy stabilność genomu, to mogą mieć decydujące znaczenie dla rozwoju nowotworu [49].

VII. Rola białek rozpoznających uszkodzony DNA w procesach nowotworzenia

Procesy nowotworzenia związane są z obecnością w materiale genetycznym nie naprawionych uszkodzeń, toteż defekty genów kodujących białka naprawy są silnym czynnikiem zwiększającym ryzyko choroby nowotworowej [50]. Wśród znanych chorób nowotworowych uwarunkowanych genetycznie kilka związanych jest z defektami mechanizmów naprawy DNA, w tym również defektami białek rozpoznających uszkodzenia. Najlepiej poznaną chorobą tego typu jest zespół skóry pergaminowej (XP, *xeroderma pigmentosum*), którego objawami są między innymi olbrzymia wrażliwość na światło słoneczne i silnie zwiększone ryzyko różnych typów nowotworów skóry (u osób poniżej 20 roku życia jest ono 2000 razy wyższe niż w normalnej populacji). Rozpoznano kilka wersji zespołu XP związanych z defektami różnych genów warunkujących przebieg

NER; wśród nich takie, które związane są z mutacjami genów *XPA* i *XPC*. Mutacje genu *XPA* powodują całkowity brak naprawy, zaś w komórkach z mutacjami genu *XPC* naprawiane są wyłącznie nici transkrybowane genów aktywnych transkrypcyjnie. Wersją choroby o najłagodniejszym przebiegu jest XP-E; u części pacjentów z tą chorobą stwierdzono mutacje genu kodującego podjednostkę p48 białka UV-DDB. W komórkach XP-E wydajność NER zredukowana jest dwukrotnie [51]. Inną chorobą nowotworową o podłożu genetycznym jest wrodzony niepolipowaty rak jelita grubego (HNPCC, ang. *hereditary nonpolyposis colon cancer*) związany z defektami mechanizmu *mismatch repair*. Mechanizm ten pozwala na usunięcie z genomu błędów replikacji w postaci błędnie sparowanych zasad lub insercyjnych (czy delecyjnych) pętli DNA. Zaburzenia struktury DNA wynikające z takich błędów replikacji rozpoznawane są przez kompleksy białkowe MSH2-MSH6 lub MSH2-MSH3. Mutacje genu MSH2 są częste u osób z HNPCC (lub zdrowych osób z rodzinnym ryzykiem choroby) [52, 53]. Chorobą genetyczną charakteryzującą się między innymi nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące, niestabilnością chromosomów i podwyższonym ryzykiem nowotworów jest zespół łamliwości chromosomów Nijmegen (NBS, ang. *Nijmegen breakage syndrome*). Przyczyną tej choroby są mutacje genu *NBS1* kodującego białko p95, które wraz z Rad50 i Mre11 tworzy kompleks rozpoznający pęknięcia nici DNA [54].

Choroby genetyczne wymienione w poprzednim akapicie należą do bardzo rzadkich w populacji. Częstszym zjawiskiem wydaje się być zmiana ryzyka nowotworów uzależniona od polimorfizmu genów kodujących białka naprawcze. Przykładem dotyczącym białek rozpoznających uszkodzenia DNA jest zwiększone ryzyko nowotworów płuc związane z polimorfizmem genu *MGMT* [55]. Defekty niektórych białek naprawczych nie dają bezpośrednich efektów w postaci drastycznego wzrostu ryzyka choroby nowotworowej. Jest to związane z faktem, że część uszkodzeń DNA może być naprawianych przez więcej niż jeden system reperacyjny (w przypadku niesprawności jednego z nich uszkodzenie jest usuwane przez mechanizm komplementarny). Z drugiej strony, brak obserwacji dotyczących związków pomiędzy chorobami nowotworowymi a defektami szeregu białek naprawczych może wynikać z letalnych właściwości takich defektów. Chociaż w wielu przypadkach brak wykrytych związków pomiędzy obserwacjami klinicznymi a niesprawnością systemów naprawczych, w układach modelowych (linie komórkowe czy

zwierzęta transgeniczne) obserwuje się ściśle związki pomiędzy defektami białek naprawczych a wrażliwością komórek na czynniki genotoksyczne i ich niestabilnością genetyczną. Przykłady związane z białkami rozpoznającymi uszkodzenia to nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące komórek z mutacjami genów *XRCC5* i *XRCC6* (kodujących podjednostki białka Ku) [56], nadwrażliwość na czynniki alkilujące komórek z mutacjami genu *MGMT* [1] czy nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące i czynniki alkilujące komórek pozbawionych genu *PARP* [57].

Ponieważ replikacja uszkodzonego DNA może prowadzić do powstania mutacji, obecność uszkodzeń DNA jest szczególnie groźna dla dzielących się komórek. Organizmy dysponują mechanizmami pozwalającymi na jednoczesne zainicjowanie naprawy DNA i zablokowanie cyklu komórkowego do czasu kiedy uszkodzenia zostaną usunięte z genomu. Mechanizmy takie, nazywane punktami kontrolnymi (ang. *checkpoints*), integrują działanie czynników rozpoznających uszkodzenia i regulujących przebieg cyklu, a ich defekty silnie stymulują przebieg procesów nowotworzenia. W komórkach ssaków jednym z takich integratorów odpowiedzi na uszkodzenia DNA jest białko p53. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym w obecności uszkodzeń i stymulującym ekspresję genów bezpośrednio biorących udział w regulacji cyklu komórkowego (na przykład gen *WAF1/CIP1*, kodujący białko p21 będące inhibitorem kinaz zależnych od cyklin) [58]. Jednym z detektorów uszkodzeń DNA związanym z mechanizmami regulacji cyklu komórkowego jest wspomniane wcześniej białko DNA-PK, które po związaniu się z pęknięciami DNA fosforyluje i aktywuje białko p53 [24]. Stwierdzono również, że białko p53 (poprzez swoją domenę C-końcową) może wiązać się z DNA zawierającym pęknięcia nici [59] i pętle (ang. *insertion/deletion mismatches*) [60]. Sugeruje to, że białko p53 uczestniczy w mechanizmach regulacji cyklu komórkowego nie tylko jako element przekazujący sygnał, ale również jako czynnik rozpoznający uszkodzenia DNA.

Artykuł otrzymano 6 marca 2000 r.

Zaakceptowano do druku 15 maja 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Wood RD (1996) *Annu Rev Biochem* 65: 135-167
2. Thoma F (1999) *EMBO J* 18: 6585-6598
3. Wilson DM, Thompson LH (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12754-12757
4. Seeberg E, Eide L, Bjoras M (1995) *Trends Biochem Sci* 20: 391-397

5. Demple B, Harrison L (1994) *Annu Rev Biochem* **63**: 915-948
6. Petit C, Sancar A (1999) *Biochimie* **81**: 15-25
7. Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ (1999) *Genes Dev* **13**: 768-785
8. Cleaver JE, States JC (1997) *Biochem J* **328**: 1-12
9. He Z, Henricksen LA, Wold MS, Ingles CJ (1995) *Nature* **374**: 566-569
10. Sugawara K, Ng JMY, Masutani C, Iwai S, Spek PJ, Eker APM, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ (1998) *Mol Cell* **2**: 223-232
11. Wood RD (1999) *Biochimie* **81**: 39-44
12. Guzder SN, Sung P, Prakash L, Prakash S (1998) *J Biol Chem* **273**: 6292-6296
13. Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 424-428
14. Otrin VR, Kuraoka I, Nardo T, McLenigan M, Eker APM, Stefanini M, Levine AS, Wood RD (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 3182-3190
15. Moggs JG, Almouzni (1999) *Biochimie* **81**: 45-52
16. Meijer M, Smerdon MJ (1999) *Bioessays* **21**: 596-603
17. Widłak P (2000) *Post Hig Med Dośw* **54**: 133-148
18. Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999) *Nature* **398**: 728-731
19. Thacker J (1999) *Trends Genet* **15**: 166-168
20. Critchlow SE, Jackson SP (1998) *Trends Biochem Sci* **23**: 394-398
21. Wang J, Dong X, Myung K, Hendrickson EA, Reeves WH (1998) *J Biol Chem* **273**: 842-848
22. Lees-Miller SP (1996) *Biochem Cell Biol* **74**: 503-512
23. Lieber MR, Grawunder U, Wu X, Yaneva M (1997) *Curr Opin Gen Dev* **7**: 99-104
24. Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PWK (1998) *Nature* **394**: 700-704
25. Haber JE (1999) *Cell* **97**: 829-832
26. Hiom K (1999) *Curr Biol* **9**: R446-R448
27. Haber JE (1998) *Cell* **95**: 583-586
28. Boulikas T (1993) *Toxicol Lett* **67**: 129-150
29. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 405-411
30. Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 3563-3571
31. Althaus FR (1992) *J Cell Sci* **102**: 663-670
32. Galande S, Kohwi-Shigematsu T (1999) *J Biol Chem* **274**: 20521-20528
33. Wang X, Ohnishi K, Takahashi A, Ohnishi T (1998) *Oncogene* **17**: 2819-2825
34. Zlatanova J, Yaneva J, Leuba SH (1998) *FASEB J* **12**: 791-799
35. Pil PM, Lippard SJ (1992) *Science* **256**: 234-237
36. Ohndorf UM, Rould MA, He Q, Pabo CO, Lippard SJ (1999) *Nature* **399**: 708-712
37. Wang JF, Bashir M, Engelsberg BN, Witmer C, Rozmiarek H, Billings PC (1997) *Carcinogenesis* **18**: 371-375
38. Pasheva EA, Pashev IG, Favre A (1998) *J Biol Chem* **273**: 24730-24736
39. Łanuszewska J, Widłak P (2000) *Cancer Lett*, w druku
40. Bruhn SL, Pil PM, Essigmann JM, Housman DE, Lippard SJ (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2307-2311
41. Treiber DK, Zhai X, Jantzen HM, Essigmann JM (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5672-5676
42. Yaneva J, Leuba SH, van Holde K, Zlatanova J (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13448-13451
43. Zamble DB, Lippard SJ (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 435-439
44. Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10394-10398
45. McA'Nulty MM, Lippard SJ (1996) *Mutat Res* **362**: 75-86
46. Widłak P (1995) *Post Biochem* **41**: 195-200
47. MacLeod MC, Powell KL, Tran N (1995) *Carcinogenesis* **16**: 975-983
48. Hasegawa SL, Doetsch PW, Hamilton KK, Martin AM, Okenquist S.A., Lenz J, Boss JM (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 4915-4920
49. MacLeod MC (1996) *Mol Carcinogenesis* **15**: 241-250
50. Wei Q, Spitz MR (1997) *Cancer Metastasis Rev* **16**: 295-307
51. Chu G, Mayne L (1996) *Trends Genet* **12**: 187-192
52. Fishel R, Wilson T (1997) *Curr Opin Genet Dev* **7**: 105-113
53. Prolla TA (1998) *Curr Opin Cell Biol* **10**: 311-316
54. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, Hays L, Morgan WF, Petrini JHJ (1998) *Cell* **93**: 477-486
55. Rusin M, Samojedny A, Harris CC, Chraży M (1999) *Human Mut* **14**: 269-270
56. Jackson SP, Jeggo PA (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 412-415
57. De Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dietrich A, LeMeur M, Waltzinger C, Chambon P, De Murcia G (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7303-7307
58. Widłak P (1997) *Post Biochem* **43**: 85-90
59. Reed M, Woelker B, Wang P, Wang Y, Anderson ME, Tegtmeyer P (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9455-9459
60. Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J (1995) *Cell* **81**: 1013-1020

Rola struktury mRNA w inicjacji translacji u Eukaryota

Role of mRNA structure in initiation of translation in Eukaryotes

KRZYSZTOF SOBCZAK¹, WŁODZIMIERZ KRZYŻOSIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa eukariotycznego mRNA
- III. Mechanizm inicjacji translacji
- IV. Czynniki *trans* uczestniczące w inicjacji translacji
 - IV-1. Białka rodziny eIF-4
 - IV-2. Czynniki translacyjny eIF-2
- V. Czynniki *cis* uczestniczące w inicjacji translacji
 - V-1. Struktura m⁷G cap
 - V-2. Kontekst kodonu inicjującego
 - V-3. Efekt pozycji kodonu inicjującego
 - V-4. Stabilna struktura drugorzędowa w pobliżu kodonu inicjującego
 - V-5. Długość sekwencji 5'UTR
 - V-6. Długość ogona poliadenylowego
 - V-7. Białka represorowe wiążące się z mRNA
- VI. Mechanizmy pozwalające ominąć pierwszy kodon AUG
 - VI-1. Skanowanie przeciekowe
 - VI-2. Reinicjacja
 - VI-3. Wewnętrzna inicjacja translacji
- VII. Związek z chorobami człowieka

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of eukaryotic mRNA
- III. Mechanism of translation initiation
- IV. *Trans* factors in translation initiation
 - IV-1. eIF-4 family proteins
 - IV-2. eIF-2 translation factor
- V. *Cis* factors in translation initiation
 - V-1. The m⁷G cap structure
 - V-2. Context of initiation codon
 - V-3. Positional effect of initiation codon
 - V-4. Stable secondary structure around initiation codon
 - V-5. Length of 5'UTR
 - V-6. Length of poly-A tail
 - V-7. mRNA-binding repressor proteins
- VI. Mechanisms that allow to skip the first AUG codon
 - VI-1. Leaky scanning
 - VI-2. Reinitiation
 - VI-3. Internal initiation of translation
- VII. Relevance to human diseases

Wykaz stosowanych skrótów: CAT — acetylotransferaza chlo-ramfenikolu; eIF — inicjacyjne czynniki translacyjne Eukarion-
tów; ΔG — zmiana energii swobodnej; m⁷G — 7-metylo-guano-
zyna; ORF — otwarta ramka odczytu; PABP — białko wiążące
się do ogona poli-A; 3'UTR — region nie podlegający translacji
położony na końcu 3' mRNA; 5'UTR — region nie podlegający
translacji położony na końcu 5' mRNA.

I. Wstęp

Kontrola ekspresji genów eukariotycznych odby-
wa się na wielu poziomach: (i) aktywności tran-
skrypcyjnej, związanej ze specyficznymi sekwencjami
promotorowymi, wzmacniającymi czy wyci-
szającymi, (ii) metabolizmu powstającego tran-
skryptu na etapie składania mRNA, transportu z
jądra komórkowego do cytoplazmy i regulacji stabil-

ności, (iii) efektywności procesu translacji informa-
cji genetycznej i wreszcie (iv) potranslacyjnej mody-
fikacji powstającego produktu białkowego. Specy-
ficzna regulacja wszystkich wymienionych powyżej
etapów ekspresji sprawia, że w różnych komórkach
tego samego organizmu powstają zróżnicowane ja-
kościowo i ilościowo produkty określonego genu
(mRNA i białka). Z jednego genomu może powsta-
wać zatem wiele różnych transkryptomów i jeszcze
więcej proteomów. Zbadanie komórkowego pozio-
mu i aktywności translacyjnej poszczególnych
mRNA w celu skonstruowania specyficznych „map
ekspresyjnych” wszystkich genów dla różnych tk-
nek jest najważniejszym zadaniem powstającej no-
wej dyscypliny – transkryptomiki.

Translacja informacji genetycznej regulowana
jest zarówno na poziomie ogólnym (dotyczącym
wszystkich mRNA) jak i specyficznym dla każdej
cząsteczki mRNA. Ogólny wymiar kontroli polega
na zmienności poziomu i/lub aktywności składników
aparatu translacyjnego innych niż mRNA [1-5]. Z
kolei regulacja specyficzna dla poszczególnych ge-

¹Dr, ²prof. dr hab.; Pracownia Genetyki Nowotworów, Instytut
Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12/14, 61-704 Po-
znań; wlokrzy@man.poznan.pl

nów zależy głównie od właściwości strukturalnych odpowiadających im cząsteczek mRNA [5-9]. Poznane dotąd zależności pomiędzy strukturą mRNA i efektywnością procesu inicjacji translacji u Eukaryota, ustalone jeszcze w sposób tradycyjny — w wyniku badań indywidualnych mRNA — zostaną pokrótce opisane w tej pracy.

II. Budowa eukariotycznego mRNA

W sekwencji większości dotąd poznanych eukariotycznych mRNA zawarta jest informacja dotycząca syntezy tylko jednego łańcucha polipeptydowego. Takie mRNA nazywane są monocystronowymi. Jednym z nielicznych wyjątków jest ludzki informacyjny RNA, kodujący białko N-myc, wyizolowany z nowotworowej linii komórkowej. Ma on dwa aktywne kodony inicjujące, czego wynikiem jest synteza z tego mRNA długiej i krótkiej izoformy białka [10].

Sekwencje niemal wszystkich mRNA Eukaryota można podzielić na cztery elementy:

- 5'UTR (ang. *5' untranslated region*) — fragment nie podlegający translacji, położony na końcu 5', pomiędzy strukturą $m^7G\ cap$ (m^7GpppN — 7-metylo-guanozyna połączona z kolejnym nukleotydem mostkiem 5'-5'-trójfosforanowym) a kodonem inicjującym. Długość tego fragmentu jest różna dla rozmaitych mRNA i waha się średnio od 50 do 200 nukleotydów (występują również znacznie dłuższe sekwencje 5'UTR) [11, 12],
- sekwencję kodującą, stanowiącą otwartą ramkę odczytu ORF (ang. *open reading frame*), położoną pomiędzy kodonem inicjującym i terminującym,
- 3'UTR (ang. *3' untranslated region*) — fragment nie podlegający translacji, położony poniżej kodonu terminującego — UAA, UAG, UGA — bardzo zróżnicowany pod względem długości. Znajdowane są krótkie 50 nukleotydy, ale również bardzo długie, około 7000 nukleotydy sekwencje 3'UTR (np. w mRNA receptora IGF) [12],
- ogon poliadenylowy powstający na końcu 3' większości mRNA podczas obróbki potranskrypcyjnej, w niewielkiej odległości od sygnału poliadenylacji (najczęściej AAUAAA) — dobudowanych jest około 250-300 reszt adenylowych [13].

III. Mechanizm inicjacji translacji

U Prokaryota mała podjednostka rybosomu przyłącza się do mRNA bezpośrednio przy kodonie inicjującym, za co odpowiedzialne są sekwencje SD

(Shine-Dalgarno) bogate w puryny. Sekwencje te oddziałują na zasadzie komplementarności z fragmentem 16S rRNA położonym na końcu 3' cząsteczki. Taki mechanizm inicjacji translacji w sposób jednokowo wydajny umożliwia syntezę białek kodowanych przez policystronowe mRNA. Z kolei u organizmów eukariotycznych mniejsza podjednostka rybosomu 40S, z przyłączonym inicjatorowym Met-tRNA i specyficznymi czynnikami białkowymi, wiąże się z końcem 5' cząsteczki mRNA, a następnie przesuując się w kierunku 3' „poszukuje” sekwencji AUG, komplementarnej wobec antykodonu Met-tRNAi. Taki mechanizm inicjacji procesu translacji został nazwany skanowaniem. Jego kolejne etapy przedstawiono schematycznie na rycinie 1. Został on potwierdzony licznymi wynikami eksperymentalnymi. Po pierwsze, eukariotyczny rybosom nie jest zdolny do wiązania się z cyrkularną formą syntetycznego mRNA [14]. Po drugie, translacja naturalnych mRNA jest silnie zależna od struktury 5' $m^7G\ cap$. Po trzecie, utworzenie kompleksu inicjującego nie jest możliwe przy braku czynnika białkowego wiążącego się z końcem 5' mRNA β -globiny [15]. Po czwarte przyłączenie rybosomu jest hamowane przez obecność stabilnej struktury drugorzędowej lub wiązanie białka represorowego na końcu 5' cząsteczki mRNA [16, 17].

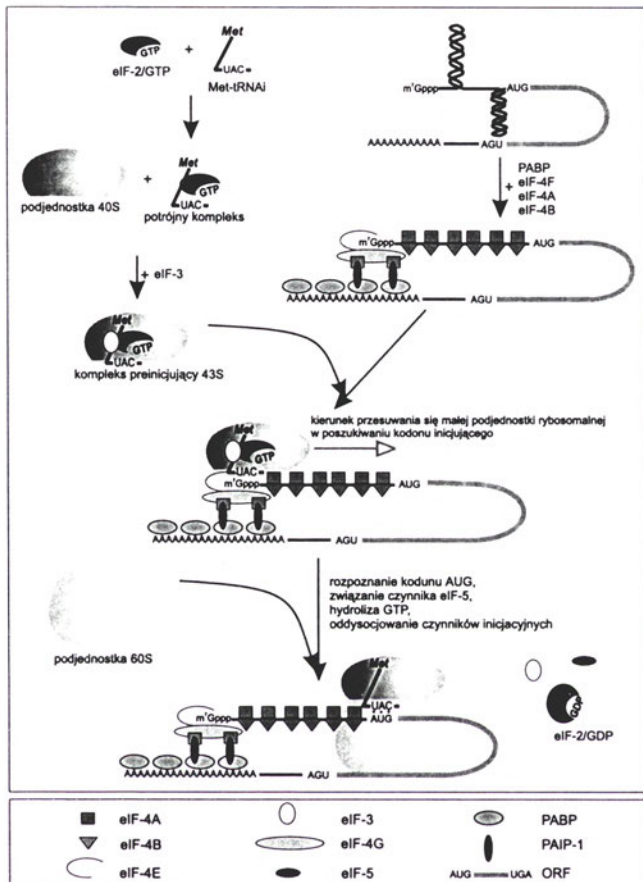
IV. Czynniki *trans* uczestniczące w inicjacji translacji

W procesie inicjacji translacji uczestniczy cały szereg czynników białkowych eIF (ang. *eukaryotic initiation factor*), z których kilka lepiej poznanych scharakteryzowano poniżej. Ich sekwencja aminokwasowa jest wysoce zachowawcza u wszystkich Eukaryota, dlatego też większość badań nad mechanizmem procesu inicjacji translacji prowadzonych jest *in vivo* w układzie drożdżowym.

IV-1. Białka rodziny eIF-4

Białka rodziny eIF-4 odpowiedzialne są za rozplatanie struktur drugorzędowych występujących w regionach 5'UTR oraz za przyłączanie podjednostki 40S do końca 5' mRNA. Rodzinę tę tworzą cztery czynniki eIF-4E, eIF-4A, eIF-4B oraz eIF-4F. Ostatni z wymienionych czynników składa się z trzech elementów składowych: eIF-4E, -4A i -4G. Białko eIF-4E specyficznie łączy się ze strukturą $m^7G\ cap$ i dlatego jest często nazywane CBP (ang. *cap binding protein*) [18]. Komórkowy poziom tego białka wpływa na efektywność inicjacji translacji. Nadeks-

presja eIF-4E prowadzi do transformacji nowotworowej komórek ssaczych, co może być wynikiem zwiększonego poziomu syntezy białek onkogennych [19]. Aktywność tego czynnika translacyjnego jest kontrolowana na drodze sygnalizacji związanej z insuliną i innymi czynnikami wzrostowymi. Jest ona związana ze stopniem ufosforylowania białka



Ryc. 1. Schemat przedstawiający kolejne etapy inicjacji translacji, przebiegającej według mechanizmu skaningu (szczegółowy opis w tekście).

4E-BP1 (ang. *eIF-4E binding protein*) wiążącego się z eIF-4E. Nieufosforylowane 4E-BP1 (przy braku stymulacji czynnikami wzrostowymi) zwiększa swoje powinowactwo do tego czynnika translacyjnego, a wiążąc się z nim uniemożliwia tworzenie kompleksu eIF-4F, niezbędnego do przyłączenia mniejszej podjednostki rybosomu [20, 21].

Kolejne białko eIF-4G, wchodzące w skład kompleksu eIF-4F, odpowiedzialne jest za przyłączenie czynnika eIF-4E do struktury *cap* [22]. W przypadku infekcji komórki wirusem polio, kodującym specyficzną proteazę, dochodzi do degradacji eIF-4G, a tym samym znacznego obniżenia wydajności translacji większości mRNA komórki gospodarza [23]. Wówczas mRNA wirusa, pozbawione struktury m⁷G cap, podlegają preferencyjnej, wydajnej translacji, związanej z występowaniem w nich charakterystycz-

nych elementów strukturalnych IRES (ang. *internal ribosome entry site*).

Trzeci czynnik opisywanego kompleksu – eIF-4A – jest białkiem wiążącym się z cząsteczkami RNA. Pełni on funkcję ATP-zależnej helikazy RNA, rozplatającej struktury drugorzędowe mRNA [24]. Jest niezbędnym czynnikiem w inicjacji translacji. Działanie tego białka w kompleksie eIF-4F oraz jako niezależnego czynnika translacyjnego przygotowuje miejsce wiązania mniejszej podjednostki rybosomalnej do końca 5' mRNA i ułatwia proces skaningu. Jego aktywność jest stymulowana przez białko eIF-4B, wyposażone również w domenę pozwalającą wiązać się z RNA [15].

IV-2. Czynniki translacyjne eIF-2

Czynnik translacyjny eIF-2 jest odpowiedzialny za przeniesienie inicjatorowej formy Met-tRNAi na małą podjednostkę rybosomu. W obrębie podjednostki g tego czynnika występuje miejsce wiązania nukleotydów guaninowych [25]. Kompleks eIF-2·GTP ma około 400-krotnie większe powinowactwo do Met-tRNAi w porównaniu z kompleksem eIF-2·GDP [26]. Utworzony w cytoplazmie potrójny kompleks eIF-2·GTP·Met-tRNAi łączy się z podjednostką 40S. Wiązanie to stymulowane jest przez kolejny czynnik translacyjny eIF-3. Powstający w ten sposób kompleks preinicjujący może się wiązać do końca 5' cząsteczki mRNA. Po zakończeniu procesu skaningu na kodonie AUG, rozpoznawanym przez antykodon tRNA^{met}, dochodzi do hydrolizy GTP przez eIF-2, aktywowanej przez białko eIF-5 [27, 28]. Hydroliza GTP powoduje zmiany konformacyjne, umożliwiające oddysocjowanie kompleksu eIF2·GDP od małej podjednostki rybosomu, która może wówczas związać się z podjednostką 60S. Ostatecznie rybosom 80S z Met-tRNAi w pozycji P jest gotowy do rozpoczęcia etapu elongacji syntezy białka.

Aby czynnik translacyjny eIF-2 mógł przyłączyć następną cząsteczkę Met-tRNAi niezbędna jest wymiana GDP na GTP, w czym uczestniczy białko eIF-2B. W komórkach eukariotycznych efektywność procesu translacji jest obniżana poprzez fosforylację czynnika eIF-2 przy udziale szeregu kinaz aktywowanych różnego rodzaju warunkami stresowymi, takimi jak np. niedobór aminokwasów czy szok termiczny. Ufosforylowana forma eIF-2 działa jak inhibitor kompetytywny, mając około 150-krotnie większe powinowactwo do białka eIF-2B niż nieufosforylowany eIF-2. Ponadto fosforylacja tego białka uniemożliwia oddysocjowanie od niego GDP [29], a tym

samym sprawa, że czynnik ten nie może pełnić sobie przypisanej funkcji, obniżając globalną efektywność procesu translacji w komórce. Również wiele innych czynników inicjacyjnych, na przykład wymieniony wcześniej eIF-2B, w pewnych warunkach może podlegać fosforylacji.

V. Czynniki *cis* uczestniczące w inicjacji translacji

Modulacja inicjacji translacji w komórkach eukariotycznych może być związana z różnymi elementami cząsteczki mRNA, takimi jak:

- struktura m^7G cap,
- pierwszorzędowa struktura otoczenia kodonu AUG — kontekst kodonu inicjującego,
- liczba tripletów AUG poprzedzających „właściwy” kodon inicjujący,
- drugorzędowa struktura występująca powyżej i poniżej kodonu AUG,
- długość sekwencji 5'UTR,
- długość ogona poliadenylowego,
- występowanie specyficznych struktur - potencjalnych miejsc wiązania białek represorowych.

V-1. Struktura m^7G cap

Struktura m^7G cap uformowana jest ostatecznie w procesie potranskrypcyjnej obróbki prekursorowego mRNA. Do struktury tej, występującej na samym końcu 5' mRNA, wiąże się czynnik translacyjny eIF-4F [18]. Jedną z funkcji tak utworzonego kompleksu jest ochrona mRNA przed działaniem egzorybonukleaz [30]. Jednak kompleks ten jest także nieodzownym elementem w stymulacji inicjacji translacji, zarówno w komórkach drożdżowych [31], jak i ssaczych [32]. Szczegółowe badania przepro-

wienia kompleksu inicjującego [32, 33]. W niektórych przypadkach metylacja sąsiadującego z m^7G nukleotydu może wpływać aktywująco na wydajność inicjacji translacji [34].

V-2. Kontekst kodonu inicjującego

Kontekst kodonu inicjującego, czyli sekwencja otoczenia kodonu AUG, w bardzo istotny sposób wpływa na efektywność inicjacji syntezy białka. Zależność tę wykazano na drodze ukierunkowanej mutagenезы [35]. Badania te doprowadziły do ustalenia optymalnego kontekstu nukleotydowego kodonu AUG – GCCRCC[AUG]G (gdzie R symbolizuje purynę). Obecność puryny, zwłaszcza A w pozycji -3 od kodonu inicjującego oraz G w pozycji +4 zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* wywołuje bardzo silny efekt wzmacniający, zwiększający wielokrotnie ilość syntetyzowanego białka [35-37]. Inne pozycje otoczenia kodonu AUG mają niewielkie znaczenie dla wydajności procesu translacji. Optymalne otoczenie kodonu inicjującego powoduje najprawdopodobniej spowolnienie procesu skaningu, co pozwala na efektywne oddziaływanie sekwencji AUG z antykodonom tRNA^{met}.

Takie eksperymentalne ustalenia zostały skonfrontowane z sekwencjami 699 różnych mRNA kręgowców [11]. Okazało się, że puryna w pozycji -3 wystąpiła w 97% (z czego A – 61%, G – 36%), a G w pozycji +4 znaleziono w 46% przeanalizowanych sekwencji (tabela 1 i 2).

V-3. Efekt pozycji kodonu inicjującego

Efekt pozycji kodonu inicjującego związany jest z tym, że nie każda trójka nukleotydów AUG może być odczytana jako sygnał wydajnie inicjujący proces

Tabela 1

Częstość występowania A, G, C i U w pobliżu miejsca startu translacji

pozycja:	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+4
Procent A	17	18	25	61	27	15	23
Procent G	44	23	15	36	13	21	AUG 46
Procent C	19	39	53	2	49	55	16
Procent U	20	20	7	1	11	9	15

Częstość występowania każdego nukleotydu w określonej pozycji wyrażona jest w procentach i obliczona jest na podstawie analizy sekwencji 699 mRNA kręgowców [11].

wadzone w latach 80-tych wykazały również, że cząsteczki mRNA pozbawione zmetylowanej guanozyny (m^7G) mają znacznie mniejszą zdolność two-

translacji. Znakomita większość mRNA kręgowców, bo aż około 90% ma odpowiedni kontekst nukleotydowy przy pierwszym kodonie AUG, zatem w proce-

się skaningu jest on odczytywany jako właściwy kodon inicjujący. Jest jednak grupa cząsteczek mRNA, u których pierwsza od końca 5' trójka nukleotydów AUG z nieznaczną wydajnością zatrzymuje skaningu podjednostki 40S, gdyż w pozycji -3, w stosunku do potencjalnego kodonu inicjującego, nie znajduje się puryna, lub przy obecności R(-3), brakuje G w pozycji +4. W niektórych mRNA znaczącą rolę przy inicjacji syntezy białka z konkretnego tripletu AUG (nawet bez wymaganego kontekstu nukleotydowego) odgrywa występowanie odpowiednio stabilnej struktury drugorzędowej w pobliżu owego kodonu (patrz podrozdział V-4).

Rozważając efekt pozycji kodonu inicjującego warto przyjrzeć się przykładom wpływu krótkich otwartych ramek odczytu (ORF), znajdujących się powyżej (w kierunku końca 5') funkcjonalnego miejsca inicjacji translacji na efektywność syntezy

zarodków poddany translacji *in vitro* wykazał 10-krotnie obniżoną syntezę proenkefaliny, w stosunku do transkryptu występującego w komórkach somatycznych. Tak znaczne obniżenie wydajności translacji wywołane jest istnieniem w intronie A czterech krótkich ORF. Taka modyfikacja związana z alternatywnym składaniem proenkefalinowego mRNA wyjaśnia istnienie niskiego stężenia peptydów opioidowych wykrywanych w komórkach zarodka szczura (przy niezmienionej w stosunku do komórek somatycznych ilości mRNA) [39].

Negatywna kontrola ekspresji wywołana przez krótkie otwarte ramki odczytu położone powyżej funkcjonalnego kodonu inicjującego jest również charakterystyczna dla mRNA kodujących szereg produktów komórkowych protoonkogenów (np. *c-sis*, *lck*, *c-myc*, *c-erb-A*) oraz innych białek uczestniczących w regulacji wzrostu i różnicowania komór-

Tabela 2

Sekwencje otaczające kodon AUG w mRNA kregowców

Sekwencja:		„funkcjonalny” kodon inicjujący	„niefunkcjonalny” kodon AUG w 5'UTR	
-3	+4			
A	nnAUG	G	175	4
A	A	114	5
A	C	63	8
A	U	73	4
G	G	130	8
G	A	47	7
G	C	47	5
G	U	27	5
C	G	9	7
C	A	2	8
C	Y*	4	12
U	G	8	4
U	A	0	13
U	Y*	0	16
razem #		699	106 AUG z 59 mRNA	

Wynik analizy otoczenia kodonu AUG z wykorzystaniem sekwencji 699 mRNA kregowców. Porównanie otoczenia funkcjonalnych kodonów inicjujących z otoczeniem „niefunkcjonalnych” kodonów AUG zlokalizowanych w sekwencjach 5'UTR 59 mRNA (* Y — pirymidyna) [11].

białka. Informacyjny RNA dekarboksylazy ornitynowej ma np. jedną krótką ORF powyżej właściwego kodonu START. Mutacja kodonu AUG w UUG w tej krótkiej ramce odczytu wywołuje pięciokrotne zwiększenie ilości syntetyzowanej dekarboksylazy ornitynowej [38].

Podczas analizy szczurzych bibliotek cDNA wykazano istnienie dwóch typów proenkefalinowego mRNA. Różniły się one jedynie długością części 5'UTR. Dłuższy mRNA wykryty w komórkach zarodkowych, ma niewycięty „somatyczny” intron A pomiędzy eksonami 1 i 2. Transkrypt specyficzny dla

rek [6]. Wszystkie te transkrypty są nietypowe pod względem długości sekwencji 5'UTR, bowiem ich funkcjonalny kodon inicjujący poprzedzony jest sekwencją często znacznie dłuższą niż 200-nukleotydową. Podobnie mRNA transformującego czynnika wzrostu TGF-β3 wyposażony jest w jeden z najdłuższych 5'UTR z do tej pory zidentyfikowanych. Długość jego sekwencji liderowej przekracza 1,1 tysiąca nukleotydów. Ponadto fragment ten ma 11 otwartych ramek odczytu, które znacząco wpływają na ilość syntetyzowanego funkcjonalnego białka. Stopień hamowania translacji przez 5'UTR

TGF- β 3 wykazano stosując translację *in vitro* transkrypty hybrydowego, zawierającego część kodującą acetylotransferazę chloramfenikolu (CAT), poprzedzoną wspomnianą długą sekwencją liderową. Zaobserwowano ponad 150-krotne obniżenie syntezy CAT, wywołane obecnością ORF w sekwencji 5'UTR TGF- β 3 [40]. W komórkach nowotworu sutka znaleziono skróconą formę mRNA tego czynnika wzrostu, który podlegał znacznie wydajniejszej translacji. Wykazano, że transkrypt ten pozbawiony był bardzo długiego, 870 nukleotydowego fragmentu regionu 5'UTR, zawierającego większość krótkich ORF [41].

V-4. Stabilna struktura drugorzędowa w pobliżu kodonu inicjującego

Stabilna struktura drugorzędowa w pobliżu kodonu inicjującego wielu mRNA ogranicza w znacznym stopniu zdolność tworzenia, w tym regionie, kompleksu inicjującego. W wielu dotąd przeprowadzonych badaniach wykazano, że obniżenie wydajności procesu translacji zależy od: (i) stopnia termodynamicznej stabilności struktury drugorzędowej oraz (ii) jej położenia w stosunku do początku transkrypty i kodonu inicjującego. Wykazano na przykład, że modyfikowany mRNA, zawierający strukturę „szpilki do włosów“ (ang. *hairpin structure*), o energii swobodnej tworzenia (ΔG) wynoszącej około -30 kcal/mol, położoną w odległości 12 nukleotydów poniżej m^7G cap, jest w niewielkim stopniu zdolny do utworzenia kompleksu inicjującego w warunkach *in vitro*. Jednakże ta sama struktura umieszczona 52 nukleotydy poniżej elementu cap nie wywiera żadnego wpływu na wydajność translacji [16]. Konsekwencją występowania tej struktury w pobliżu końca 5' mRNA jest blokowanie dostępu kompleksu preinicjującego 43S. Z kolei bardziej stabilna struktura ($\Delta G = -50$ kcal/mol) umieszczona powyżej kodonu inicjującego wpływa na obniżenie poziomu translacji w bardzo znacznym stopniu, sięgającym 85-95%. Podobne wyniki uzyskano prowadząc badania z użyciem mniej i bardziej stabilnej struktury w regionie 5'UTR w warunkach *in vivo* [42].

Inhibicja procesu tworzenia się kompleksu inicjującego przez strukturę drugorzędową występującą powyżej kodonu AUG, związana jest bezpośrednio z liniowym skanowaniem podjednostki 40S. Sugeruje się, że kompleks preinicjujący przemieszczając się wzdłuż sekwencji 5'UTR zostaje zatrzymany przed barierą, którą stanowi stabilna struktura trzonu i pętli, czego konsekwencją jest jego oddysocjowanie od cząsteczki mRNA. Mała podjednostka

rybosomalna lub związane z nią czynniki translacyjne mają zdolność likwidowania takich barier, jednakże zdolność ta maleje wraz z obniżaniem wartości energii swobodnej tworzenia się struktury drugorzędowej. W przeciwieństwie do podjednostki 40S, rybosom 80S w czasie elongacji wydajnie rozwija nawet bardzo stabilne struktury tworzone przez mRNA [16].

Wpływ stabilnych struktur w regionach liderowych opisano także dla wielu naturalnych cząsteczek informacyjnych RNA. Na przykład dla ludzkiego mRNA płytkowego czynnika wzrostowego (PDGF2), który zawiera długą oraz bogatą w G i C sekwencję liderową. Wprowadzenie 1022-nukleotydowego 5'UTR tego mRNA do reporterowego mRNA CAT, wywołuje 30-40-krotne obniżenie wydajności translacji białka CAT w transfekowanych komórkach COS [43]. Wykazano również, że zaledwie 140-nukleotydowy fragment tego regionu, bezpośrednio poprzedzający kodon AUG wywołuje taki sam efekt jak cały 5'UTR. Usunięcie całej sekwencji liderowej z mRNA PDGF2 zwiększa wyraźnie jego zdolność translacyjną, która koreluje ze wzrostem potencjału transformacyjnego komórek NIH 3T3 [43].

Również mRNA dekarboksylazy ornitynowej (ODC) podlega mało wydajnej translacji, wywołanej obecnością bardzo stabilnej struktury typu *hairpin* ($\Delta G = -97$ kcal/mol) tuż za m^7G cap, tworzonej przez prawie 100 nukleotydów z dużym udziałem reszt G i C [38, 44, 45]. Wprowadzenie mutacji obniżających stabilność struktury typu szpilki do włosów podnosi wydajność translacji mRNA ODC [46]. Wykazano również, że efektywność syntezy białka ODC nie ulega zmianie po odwróceniu orientacji tego fragmentu regionu 5'UTR. Zatem wyłącznie stabilna struktura, a nie związanie z nią białka represorowego, hamuje proces translacji.

W ostatnich latach opisano szereg mRNA, które w zależności od typu komórek mogą zawierać kilka alternatywnych regionów 5'UTR, różniących się znacznie termodynamiczną stabilnością tworzonej struktury RNA, a tym samym mających różną zdolność translacyjną. Są nimi na przykład mRNA kodujące: receptor interleukiny 1 [47], β -enolazę [48], białko A2A [49], basonuklinę [50], białko NRF-1 [51], czy kinazę PKR [52].

Występowanie struktury trzonu i pętli może mieć również korzystny wpływ na inicjację procesu translacji. Jednakże struktura ta (nawet o stosunkowo niewielkiej energii swobodnej tworzenia około -20 kcal/mol) musi znajdować się w określonej odległości (12-15 nukleotydów) poniżej kodonu ini-

ującego. W takich warunkach triplet AUG bez wymaganego zazwyczaj kontekstu sekwencji, a nawet inna trójka nukleotydów (np. GUG, UUG, ACG, CUG) może być odczytana jako funkcjonalny kodon inicjujący [53]. Przyczyną tego zjawiska jest najprawdopodobniej lokalne spowolnienie (lub zatrzymanie) przesuwu mniejszej podjednostki rybosomalnej wzdłuż cząsteczki mRNA, co umożliwia wiązanie kodonu inicjującego z antykodonem Met-tRNAi i rozpoczęcie procesu syntezy białka.

V-5. Długość sekwencji 5'UTR

Długość sekwencji 5'UTR w nielicznych przypadkach wpływa na efektywność tworzenia kompleksu inicjującego. Ma to miejsce tylko wtedy, gdy sekwencja poprzedzająca kodon START jest bardzo krótka. Gdy pierwszy kodon AUG (nawet z odpowiednim kontekstem nukleotydowym) występuje w odległości 12 nukleotydów poniżej m⁷G cap, to podjednostka 40S nie rozpoznaje tego kodonu i kończy skaning dopiero na następnej trójce AUG. Wiadomo również, że 5'UTR o długości 13-22 nukleotydów w znacznym stopniu obniża ilość syntetyzowanego białka w warunkach *in vitro* [54], a wydłużanie go od kilkunastu do około 80 nukleotydów wpływa na stopniowe zwiększanie efektywności translacji [55]. Naturalne regiony 5'UTR zawierają zwykle znacznie więcej niż 20 nukleotydów, dlatego przedstawione powyżej informacje można wykorzystać głównie w interpretacji zdolności translacyjnej krótkich ORF, których kodon AUG występuje w pobliżu elementu cap.

V-6. Długość ogona poliadenylowego

Długość ogona poliadenylowego zmniejsza się we wszystkich mRNA w czasie ich „życia” w komórce, co związane jest z aktywnością specyficznych rybonukleaz cytoplazmatycznych. Różna jest jednak szybkość skracania ogonów poli-A dla różnych cząsteczek mRNA.

Po przejściu transkryptu do cytoplazmy, z łańcuchem poli-A wiążą się białka PABP (ang. *poli-A binding protein*) o masie ~70kDa. Wykazano, że każde z tych białek łączy się do odcinka zawierającego 27 reszt adenylowych, zaś odległość pomiędzy kolejnymi PABP wynosi 13 reszt A [56]. Białka PABP mogą oddziaływać z czynnikami translacyjnymi związanymi ze strukturą m⁷G cap [57]. W komórkach drożdży oraz roślin białka te mają domeny umożliwiające kontakt bezpośrednio z czynnikiem eIF-4G (największa podjednostka kompleksu eIF-4F), w przypadku

roślin dodatkowo z eIF-4B [58, 59]. Białka PABP ssaków nie oddziałują bezpośrednio z eIF-4G, lecz za pośrednictwem białek PAIP-1 (ang. *PABP-interacting protein*) [60], wyposażonych w domeny wiążące czynniki eIF-4A i eIF-3, które z kolei oddziałują z czynnikiem eIF-4G (rycina 1). Kontakt PABP z eIF-4G zwiększa powinowactwo kompleksu eIF-4F do elementu cap oraz PABP do ogona poliadenylowego. Opisane powyżej oddziaływania sprawiają, że oba końce eukariotycznych cząsteczek mRNA w warunkach *in vivo* znajdują się blisko siebie.

Ogon poliadenylowy pełni trzy ważne funkcje w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji: (i) umożliwia transport mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, (ii) w kompleksie z białkami PABP zapobiega działaniu egzorybonukleaz oraz (iii) zwiększa efektywność inicjacji translacji.

Niektóre mRNA mają zaprogramowaną w swojej strukturze — najczęściej w sekwencji regionu 3'UTR — szybką samodegradację, często zależną od warunków środowiska. U drożdży proces ten rozpoczyna się od usunięcia ogona poliadenylowego z udziałem rybonukleazy Pan1p (ang. *PABP-dependent poly(A) nuclease*) [61,62], co powoduje oddysocjowanie od mRNA białek PABP a w konsekwencji znaczne zmniejszenie powinowactwa eIF-4E do elementu cap. Wówczas „odsłonięta” struktura m⁷G cap jest wydajnie usuwana z udziałem specyficznego enzymu Dcp1p i mRNA staje się podatny na działanie 5'→3' egzorybonukleazy Xrn1p [63,64]. Również w komórkach ssaczy deadenylacja prowadzi do szybkiej, enzymatycznej hydrolizy mRNA, zainicjowanej usunięciem elementu cap [65]. Taki mechanizm degradacji zapobiega syntezie błędnej, skróconej formy polipeptydu, kodowanego przez mRNA, którego integralność strukturalna została naruszona przez działanie egzo- lub endonukleaz.

Udział związanych z ogonem poli-A białek PABP w procesie inicjacji translacji zaobserwowano zarówno w warunkach *in vitro* [66] jak i *in vivo* [67]. Badania z wykorzystaniem mRNA pozbawionych ogona poliadenylowego wykazały, że takie mutanty podlegały znacznie mniej wydajnej translacji. Podobny efekt wywiera dodanie egzogennej, syntetycznej kompetytora poli-A do układu translacji *in vitro* [68]. Przyczyn tego zjawiska jest kilka. Po pierwsze, o czym wcześniej wspomniano, białka PABP związane z końcem 3' mRNA zwiększają powinowactwo czynników inicjujących translację do struktury cap, czego wynikiem jest bardziej wydajne przyłączanie mniejszej podjednostki rybosomalnej do końca 5' mRNA. Po drugie PABP uczestniczą w

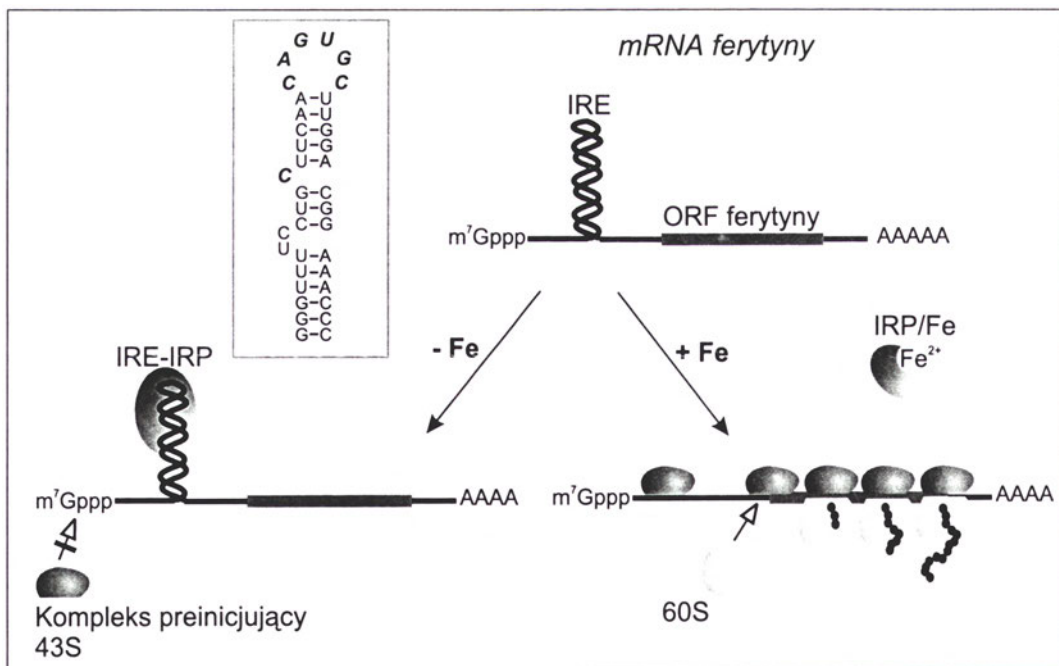
procesie przyłączania podjednostki 60S do związanej z kodonem AUG małej podjednostki 40S [69,70]. Po trzecie fizyczna bliskość obu końców mRNA zwiększa lokalne stężenie kompleksów preinicjujących 43S w pobliżu struktury *cap*, ponieważ po zakończeniu translacji niektóre podjednostki 40S pozostają związane z mRNA oraz przesuwać się w kierunku 3' przyłączają potrójne kompleksy Met-tRNAi·eIF-2·GTP i mogą ponownie zostać użyte do inicjacji translacji [57].

V-7. Białka represorowe wiążące się z mRNA

W wielu mRNA występują miejsca potencjalnego wiązania białek represorowych. Miejsca te stanowią zdefiniowane sekwencje nukleotydowe, często uwikłane w specyficzne struktury drugorzędowe. Nie wszystkie mRNA występujące w cytoplazmie ulegają przepisaniu na polipeptydy, gdyż proces ten może być blokowany między innymi przez białkowe represory translacji, mogące wiązać się do sekwencji 5'UTR lub 3'UTR [71]. Ten mechanizm kontroli

translacja zależy od sekwencji o długości 27 nukleotydów, zlokalizowanej w 5'UTR ferrytynowego mRNA. Ten wrażliwy na żelazo element IRE (ang. *iron responsive element*) tworzy strukturę trzonu i pętli, która łącząc się z białkiem IRP (zdolnym do wiązania jonów żelaza) niezasocjowanym z Fe^{2+} , całkowicie inhibuje syntezę ferrytyny. Kiedy zaś wzrośnie stężenie Fe^{2+} w cytoplazmie białko to wiążąc jony żelaza oddysocjuje od IRE aktywując proces translacji (rycina 2). Utworzenie kompleksu IRE-IRP uniemożliwia najprawdopodobniej przyłączenie mniejszej podjednostki rybosomalnej, ponieważ element IRE znajduje się w pobliżu struktury *cap* [75]. Motyw IRE znaleziono również w innych mRNA kodujących białka związane z metabolizmem żelaza. Konserwatywnymi częściami struktury typu hairpin tego elementu jest wybrzuszenie C i 6-nukleotydowa pętla terminalna.

Szereg cząsteczek mRNA kodujących białka aparatu translacyjnego, włączając rybosomalne białka strukturalne, w swoich regionach 5'UTR zawiera ciągi polipirymidynowe (pPy), uczestniczące w kon-



Ryc. 2. Schemat mechanizmu regulacji efektywności translacji mRNA ferrytyny w zależności od stężenia jonów żelaza (+Fe — wysoki, -Fe — niski poziom Fe^{2+}) — szczegółowy opis w tekście. W ramce przedstawiono strukturę drugorzędową elementu IRE znajdującego się w mRNA łańcucha H ludzkiej ferrytyny (kursywą zaznaczono zachowawcze zasady elementu IRE).

translacji określonych mRNA umożliwia bardzo szybką odpowiedź na stymulację czynnikami tak wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowymi.

Model negatywnej kontroli translacji można najlepiej prześledzić na przykładzie syntezy ferrytyny – białka odpowiedzialnego za wewnątrzkomórkowe magazynowanie jonów żelaza. Poziom syntezy tego białka jest zależny od stężenia żelaza w cytoplazmie [72-74]. Badania ze zrekombinowanym genem ferrytyny wykazały, że regulowana przez jony żelaza

ontroli efektywności translacji [76]. W różnych typach komórek wydajność translacji z tych mRNA regulowana jest przez mitogeny i sygnały różnicowania [77]. Różnej długości (5-14-nukleotydowe) ciągi pPy umieszczone są w sąsiedztwie struktury *cap*, a mutacje w obrębie tych sekwencji prowadzą do translacji konstytutywnej, co sugeruje, że działają one jako element negatywnej regulacji biosyntezy białka [78]. Wykryto na przykład, że jedynie z naturalnymi, a nie z pozbawionymi ciągów pPy sekwen-

cjami liderowymi cząsteczek mRNA rybosomowych białek L32 i L1 czynnik o masie 56 kDa wiąże się specyficznie [79, 80].

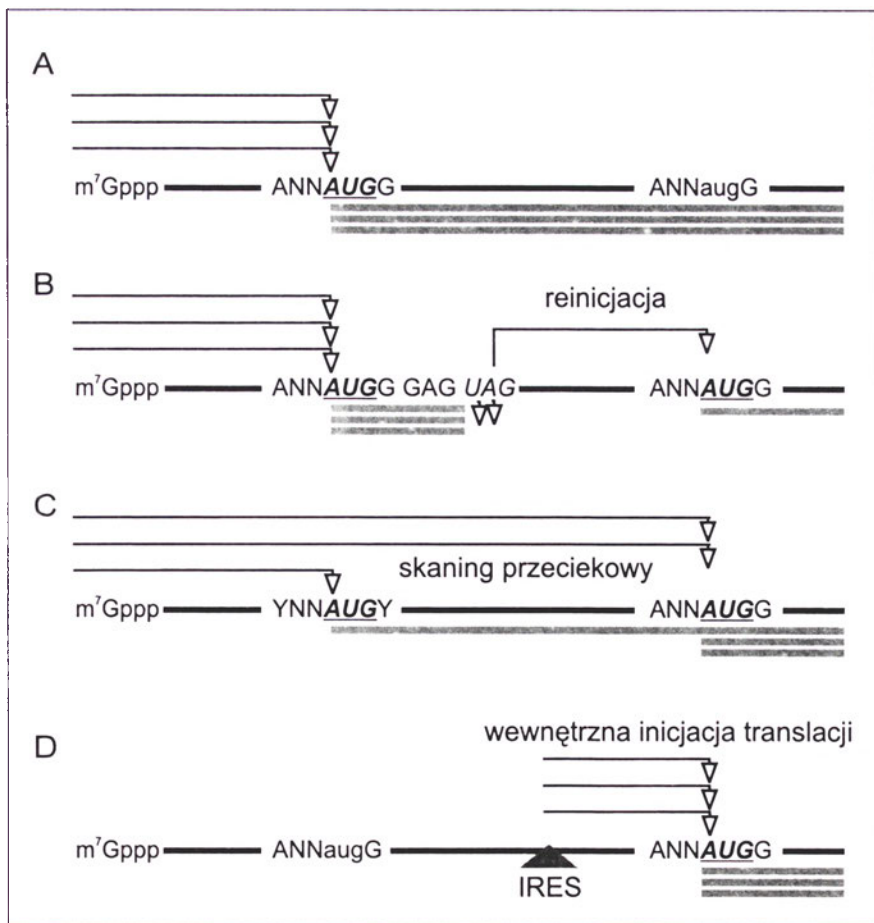
W czasie różnicowania krwinek czerwonych, mRNA kodujący erytrocytową 15-lipooksygenazę (LOX) jest syntetyzowany przez wszystkie etapy erytropoezy, lecz aktywność translacyjną wykazuje tylko w retikulocytach krwi obwodowej. 15-LOX jest enzymem katalizującym degradację fosfolipidów, co prowadzi do niszczenia błon wewnętrznych, np. mitochondrialnych w dojrzewającym retikulocycie. Szczurzy mRNA LOX ma 10, a ludzki tylko 4 tandemowe powtórzenia 19-nukleotydowych motywów, bogatych w pirymidyny, umieszczonych w części 3'UTR. Do takich segmentów mogą specyficznie przyłączać się białka retikulocytowe LOX-BP, będące represorami translacji 15-lipooksygenazy [81-83]. Jest to pierwszy opisany przykład regulacji inicjacji translacji przez specyficzne interakcje białka z sekwencją położoną w 3'UTR informacyjnego RNA.

Negatywna kontrola ekspresji z udziałem białek represorowych może odbywać się również w systemie autoregulacji. Wówczas translacja określonego mRNA znajduje się pod kontrolą jego produktu białkowego. Dobrze poznana jest autoregulacja eks-

presji syntetazy tymidylowej (TS), kluczowego enzymu syntezy prekursorów DNA. Informacyjny RNA TS zawiera dwa miejsca specyficznego wiązania białka TS, z których jedno zlokalizowane jest w sekwencji liderowej i stanowi je 29-nukleotydowa struktura typu szpilki do włosów [84]. Wykazano, że ludzkie białko TS specyficznie hamuje wydajność translacji mRNA TS w układzie *in vitro* [85]. Inhibicja translacji jest jednak całkowicie zniesiona w środowisku zawierającym substraty dla syntetazy tymidylowej, takie jak np. dUMP.

VI. Mechanizmy pozwalające ominąć pierwszy kodon AUG

Znakomita większość eukariotycznych mRNA jest monocystronowych i podlega inicjacji translacji z pierwszego kodonu AUG. Jednak jak wcześniej wspomniano około 5-10% cząsteczek mRNA ma jeden lub więcej tripletów AUG w regionach 5'UTR. W przypadku takich cząsteczek dochodzi do znacznego obniżenia poziomu translacji, co opisano w rozdziale V-3. Istnieją trzy możliwe mechanizmy pozwalające odczytać właściwe, funkcjonalne kodony inicjujące (rycina 3) — skanowanie przeciekowe, reinicjacja i wewnętrzna inicjacja translacji.



Ryc. 3. Mechanizmy inicjacji translacji umożliwiające rozpoczęcie syntezy białka z kodonu inicjującego, położonego poniżej innego tripletu AUG. Zwykle translacja zachodzi z pierwszego od końca 5' kodonu AUG (A). Jednak w przypadku niektórych mRNA możliwa jest również inicjacja translacji z kodonu START leżącego poniżej innego/innych tripletów AUG. Może ona przebiegać według różnych mechanizmów: B — reinicjacji, C — skaningu przeciekowego, D — wewnętrznej inicjacji translacji (szczegółowy opis w tekście). Czarnymi liniami zaznaczono kierunek przesuwania się małej podjednostki rybosomalnej 40S wzdłuż cząsteczki mRNA, zaś szarymi — syntetyzowane polipeptydy. Na schemacie wskazano „aktywne” AUG i „nieaktywne” — aug kodony inicjujące wraz z otoczeniem nukleotydowym (Y — pirymidyna).

VI-1. Skaniny przeciekowy

Skaning przeciekowy polega na tym, że część małych podjednostek rybosomalnych nie rozpoznaje pierwszego tripletu AUG i zatrzymuje się na drugim, czy jeszcze dalszym kodonie AUG. Większość opisanych dotąd przypadków takiej formy skaningu wynika z braku optymalnego kontekstu sekwencji w pobliżu tripletów AUG (rozdział V-2). Zatem im „gorszy” jest kontekst sekwencji w pobliżu pierwszego tripletu AUG z tym większą wydajnością przebiega translacja drugiej ORF i *vice versa*. Opisano ponad dwadzieścia mRNA (głównie wirusowych), których pierwsze triplety AUG mają suboptymalne otoczenie sekwencji, pozwalają na syntezę dwóch różnych białek z jednego mRNA [6, 37, 86, 87]. Istnieje również możliwość obejścia pierwszego tripletu AUG, niezależnie od kontekstu sekwencji, kiedy znajduje się on w odległości mniejszej niż 20 nukleotydów od końca 5' mRNA [54, 88, 89]. Nowsze dane eksperymentalne sugerują również, że skaning przeciekowy może być modulowany w zależności od fazy wzrostu komórek lub temperatury [90, 91].

VI-2. Reinicjacja

Gdy rybosom 80S zakończy translację pierwszej otwartej ramki odczytu, z cząsteczką mRNA może pozostać związana mniejsza podjednostka rybosomalna 40S. Po przyłączeniu odpowiednich czynników inicjacyjnych może ona powtórnie rozpocząć skaning w poszukiwaniu kolejnego kodonu AUG (rycina 3). Zdolność podjednostki 40S do reinicjacji jest ograniczona długością pierwszej ORF. Z jedyńskich przeprowadzonych dotąd badań wynika, że długość ta nie powinna przekroczyć 30 kodonów [92]. Ponadto reinicjacja u Eukaryota przebiega z największą wydajnością kiedy kodon terminujący pierwszej ORF występuje w odpowiednio dużej odległości od następnego cistronu [93]. Wynika to z konieczności ponownego związania kompleksu Met-tRNAi·eIF-2 przez podjednostkę 40S co wymaga odpowiednio długiego czasu [94]. Proces reinicjacji jest bardzo słabo poznany. Wiadomo jednak, że przebiega on z bardzo niską wydajnością.

VI-3. Wewnętrzna inicjacja translacji

Opisano kilka przykładów wirusowych cząsteczek mRNA, które podlegają translacji według mechanizmu niezależnego od struktury m⁷G cap. W regionie położonym powyżej otwartej ramki odczytu mają one element strukturalny określany jako wew-

nętrne miejsce wiązania rybosomu — IRES (ang. *internal ribosome entry site*), który zawiera długi, silnie ustrukturalizowany fragment RNA. Ten element strukturalny wraz z szeregiem oddziałujących z nim czynników białkowych, wśród których znajdują się inicjacyjne czynniki translacyjne eIF-4F i eIF-3 [95], tworzy platformę, do której w pobliżu kodonu AUG wiąże się kompleks preinicjujący 43S [96-98]. Wykryto także kilka specyficznych dla różnych mRNA białek, niezbędnych do inicjowania translacji według mechanizmu IRES. Są nimi na przykład autoantigen La niezbędny do translacji mRNA wirusa polio [99, 100] czy białko PTB wiążące się do ciągów polipirymidynowych cząsteczek RNA wirusa EMCV [101, 102]. Elementy IRES wykryto początkowo w bogatych w krótkie ORF i bardzo długich regionach 5'UTR niektórych wirusów [24, 103], jednak później opisano je również dla kilku komórkowych mRNA [97, 104, 105]. Mechanizm wewnętrznej inicjacji translacji, zwłaszcza w przypadku komórkowych mRNA, jest jednak nadal kwestionowany przez niektórych autorów [5, 106].

VII. Związek z chorobami człowieka

Wiele mRNA pochodzących z tego samego genu w zależności od rodzaju tkanki może zawierać alternatywne regiony 5'UTR, które mają znacząco różną zdolność translacyjną [5, 98]. Zjawisko to najczęściej związane jest z procesem alternatywnego składania RNA i/lub aktywnością różnych regionów promotorowych w poszczególnych typach komórek. Informacyjny RNA protoonkogenu *c-mos* może na przykład zawierać dwie różniące się długością i strukturą sekwencje liderowe (980 i 300 nukleotydów), z których dłuższa bardzo silnie inhibuje proces biosyntezy białka [107]. Z kolei inny gen *ATM* może tworzyć aż 12 różnych regionów 5'UTR, co wynika z aktywności w tym genie kilku regionów promotorowych oraz z alternatywnego składania mRNA. Te sekwencje liderowe, znacznie różniące się długością (146-884 nt), zawartością krótkich ORF (od 1 do 8) oraz stabilnością struktury drugorzędowej (wartość ΔG od -27 do -147 kcal/mol), odgrywają istotną rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu [108]. Badany w naszym laboratorium mRNA genu supresorowego *BRCA1* również może zawierać dwa różne regiony 5'UTR (140 i 402 nt). Obie sekwencje liderowe, ze względu na różną trwałość występujących w nich struktur II-rzędowych, mogą być związane z różną zdolnością translacyjną poszczególnych mRNA, oraz zaburzona ich dystrybucja w komórkach nowotworów piersi w porównaniu ze zdrowymi

komórkami gruczołu sutkowego może odgrywać istotną rolę w patogenezie choroby nowotworowej, poprzez znaczne obniżenie poziomu białka BRCA1 [109].

W przypadku niektórych genów wykryto mutacje typu substytucji w sekwencjach odpowiadających regionom 5'UTR lub mutacje prowadzące do wydłużenia czy skrócenia regionów 5'UTR, odpowiedzialne za różnego rodzaju choroby dziedziczne [5]. Na przykład mutacja germinalna prowadząca do utworzenia kodonu AUG w sekwencji liderowej mRNA genu *p16*, związana z dziedziczną formą czerniaka, znacznie zmniejsza efektywność syntezy białka supresorowego p16, co jest powodowane obecnością „nienaturalnej” krótkiej ORF [110]. Innym przykładem mogą być mutacje dynamiczne w genie *FMRI*, polegające na ekspansji trójnukleotydowych powtórzeń (CGG)_n znajdujących się w sekwencji odpowiadającej regionowi 5'UTR mRNA *FMRI*. Prowadzą one do obniżenia ekspresji tego genu, co jest związane ze znacznym zwiększeniem stabilności struktury drugorzędowej, tworzonej przez sekwencję liderową [111], a w konsekwencji są odpowiedzialne za część przypadków jednostki chorobowej zwanej zespołem łamliwego chromosomu X.

Podziękowanie

Praca finansowana z grantu KBN — 6P04B 031 18 oraz z Subsydium FNP

Artykuł otrzymano 27 stycznia 2000 r.

Zaakceptowano do druku 13 marca 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Herskocy J W B (1991) *Annu Rev Biochem* 60: 717-755
2. Merrick WC (1992) *Microbiol Rev* 56: 291-315
3. Morris DR (1995) *Prog Nuc Acid Res Mol Biol* 51: 339-363
4. Donahue TF (1997) *mRNA metabolism and post-transcriptional gene regulation*, Wiley-Liss Inc.
5. Kozak M (1999) *Gene* 234: 187-208
6. Kozak M (1991) *J Cell Biol* 115: 887-903
7. Kozak M (1991) *J Biol Chem* 266: 19867-19870
8. Gray NK, Wickens M (1998) *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 399-458
9. Preiss T, Hentze MW (1999) *Curr Opin Genet Dev* 9: 515-521
10. Makela TP, Saksela K, Alitalo K (1989) *Mol Cell Biol* 9: 1545-1552
11. Kozak M (1987) *Nucl Acids Res* 15: 8125-8148
12. Pesole G, Liuni S, Grillo G, Licciulli F, Larizza A, Makalowski W, Saccone C (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 193-196
13. Barabino SM, Keller W (1999) *Cell* 99: 9-11
14. Kozak M (1979) *J Biol Chem* 254: 4731-4738
15. Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU (1998) *Nature* 394: 854-859
16. Kozak M (1989) *Mol Cell Biol* 9: 5134-5142
17. Paraskeva E, Gray NK, Schlager B, Wehr K, Hentze MW (1999) *Mol Cell Biol* 19: 807-816
18. Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK (1997) *Cell* 89: 951-961
19. Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N (1990) *Nature* 345: 544-547
20. Haghghat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N (1995) *EMBO J* 14: 5701-5709
21. Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N (1999) *EMBO J* 18: 270-279
22. Novoa I, Carrasco L (1999) *Mol Cell Biol* 19: 2445-2454
23. Sonenberg N (1990) *Curr Top Microbiol Immunol* 161: 23-47
24. Altman M, Blum S, Wilson TMA, Trachsel H (1990) *Gene* 91: 127-129
25. Hannig EM, Cigan AM, Freeman BA, Kinzy TG (1993) *Mol Cell Biol* 13: 506-520
26. Rowlands AG, Panniers R, Henshaw EC (1988) *J Biol Chem* 263: 5526-5533
27. Chakrabarti A, Maitra U (1991) *J Biol Chem* 266: 14039-14045
28. Huang HK, Yoon H, Hannig EM, Donahue TF (1997) *Genes Dev* 11: 2396-2413
29. Price N, Proud C (1994) *Biochimie* 76: 748-760
30. Muhlrud D, Decker CJ, Parker R (1994) *Genes Dev* 8: 855-866
31. Lo HJ, Huang HK, Donahue TF (1998) *Mol Cell Biol* 18: 665-675
32. Horikami SM, De Ferra F, Moyer SA (1984) *Virology* 138: 1-15
33. Malone RW, Felgner PL, Verma IM (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6077-6081
34. Kuge H, Brownlee GG, Gershon PD, Richter JD (1998) *Nucleic Acids Res* 26: 3208-3214
35. Kozak M (1986) *Cell* 44: 283-292
36. Kozak M (1989) *Mol Cell Biol* 9: 5073-5080
37. Kozak M (1997) *EMBO J* 16: 2482-2492
38. Grens A, Scheffler IE (1990) *J Biol Chem* 265: 11810-11816
39. Rao SM, Howells RD (1993) *J Biol Chem* 268: 22164-22169
40. Arrick BA, Lee AL, Grendell RL, Derynck R (1991) *Mol Cell Biol* 11: 4306-4313
41. Arrick BA, Grendell RL, Griffin LA (1994) *Mol Cell Biol* 14: 619-628
42. Kozak M (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2850-2854
43. Rao CD, Pech M, Robbins KC, Aaronson SA (1988) *Mol Cell Biol* 8: 284-292
44. Manzella JM, Blackshear PJ (1990) *J Biol Chem* 265: 11817-11822
45. Pyronnet S, Vagner S, Bouisson M, Prats AC, Vaysse N, Pradayrol L (1996) *Cancer Res* 56: 1742-1745
46. Johannes G, Berger FG (1992) *J Biol Chem* 267: 10108-10115
47. Ye K, Vannier E, Clark BD, Sims JE, Dinarello CA (1996) *Cytokine* 8: 421-429
48. Oliva D, Venturella S, Passantino R, Feo S, Giallongo A (1995) *Eur J Biochem* 232: 141-149
49. Lee YC, Chang CW, Su CW, Lin TN, Sun SH, Lai HL, Chern Y (1999) *J Neurochem* 73: 1790-1798
50. Tang W, Tseng H (1999) *Gene* 237: 35-44
51. Huo L, Scarpulla RC (1999) *Gene* 233: 213-224
52. Kawakubo K, Kuhlen KL, Vessey JW, George CX, Samuel CE (1999) *Virology* 264: 106-114
53. Kozak M (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8301-8305
54. Kozak M (1991) *Gene Expr* 1: 111-115
55. Kozak M (1991) *Gene Expr* 1: 117-125
56. Jackson RJ, Standard N (1990) *Cell* 13: 15-24
57. Gallie DR (1998) *Gene* 16: 1-11
58. Tarun SZ Jr., Sachs AB (1996) *EMBO J* 15: 7168-7177
59. Le H, Tanguay RL, Balasta ML, Wei CC, Browning KS, Metz AM, Goss DJ, Gallie DR (1997) *J Biol Chem* 272: 16247-16255

60. Craig AW, Haghighat A, Yu AT, Sonenberg N (1998) *Nature* **392**: 520-523
61. Boeck R, Tarun S Jr, Rieger M, Deardorff JA, Muller-Auer S, Sachs AB (1996) *J Biol Chem* **271**: 432-438
62. Brown CE, Tarun SZ Jr, Boeck R, Sachs AB (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 5744-5753
63. Decker CJ, Parker R (1993) *Genes Dev* **7**: 1632-1643
64. Niepel M, Ling J, Gallie DR (1999) *FEBS Lett* **462**: 79-84
65. Wei CC, Balasta ML, Ren J, Goss DJ (1998) *Biochemistry* **37**: 1910-1916
66. Munroe D, Jacobson A (1990) *Gene* **91**: 151-158
67. Gallie DR (1991) *Genes Dev* **5**: 2108-2116
68. Gallie DR, Tanguay R (1994) *J Biol Chem* **269**: 17166-17173
69. Sachs AB, Davis RW (1989) *Cell* **58**: 857-867
70. Jacobson A (1996) *Translational control*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor
71. Gray NK (1998) *Methods Mol Biol* **77**: 379-97
72. Pantopoulos K, Johansson HE, Hentze MW (1994) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **48**: 181-238
73. Mascotti DP, Rup D, Thach RE (1995) *Annu Rev Nutr* **15**: 239-261
74. Mikulits W, Schranzhofer M, Beug H, Mullner EW (1999) *Mutat Res* **437**: 219-230
75. Gray NK, Hentze MW (1994) *EMBO J* **13**: 3882-3891
76. Morris DR, Kakegawa T, Kaspar RL (1993) *Biochemistry* **32**: 2931-2937
77. Kaspar RL, Morris DR, White MW (1993) *Translation regulation gene expression*, Plenum Press, New York
78. Levy S, Avni D, Hariharan N, Perry RP, Meyuhas O (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3319-3323
79. Kaspar RL, Kakegawa T, Cranston H, Morris DR, White MW (1992) *J Biol Chem* **267**: 508-514
80. Cardinali B, Di Cristina M, Pierandrei-Amaldi P (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 2301-2308
81. Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Standart N, Thiele BJ (1994) *EMBO J* **13**: 1476-1481
82. Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW (1997) *Cell* **89**: 597-606
83. Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Hentze MW (1998) *Trends Biochem Sci* **23**: 409-411
84. Chu E, Voeller D, Koeller DM, Drake JC, Takimoto CH, Maley GF, Maley F, Allegra CJ (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 517-521
85. Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, Zinn S, Allegra CJ (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8977-8981
86. Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lanc MD (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9606-9610
87. Muralidhar S, Becerra SP, Rose JA (1994) *J Virol* **68**: 170-176
88. Slusher LB, Gillman EC, Martin NC, Hopper AK (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9789-9793
89. Schutze MP, Peterson PA, Jackson MR (1994) *EMBO J* **13**: 1696-1705
90. Liu Y, Garceau NY, Loros JJ, Dunlap JC (1997) *Cell* **89**: 477-486
91. Spotts GD, Patel SV, Xiao Q, Hann SR (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 1459-1468
92. Luukkonen BG, Tan W, Schwartz S (1995) *J Virol* **69**: 4086-4094
93. Kozak M (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 3438-3445
94. Hinnebusch AG (1997) *J Biol Chem* **272**: 21661-21664
95. Sizova DV, Kolupaeva VG, Pestova TV, Shat-sky IN, Hellen CU (1998) *J Virol* **72**: 4775-4782
96. Kaminski A, Howell MT, Jackson RJ (1990) *EMBO J* **9**: 3753-3759
97. Belsham GJ (1992) *EMBO J* **11**: 1105-1110
98. van der Velden AW, Thomas AA (1999) *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 87-106
99. Meerovitch K, Svitkin YV, Lee HS, Lejbkovicz F, Kenan DJ, Chan EK, Agol VI, Keene JD, Sonenberg N (1993) *J Virol* **67**: 3798-3807
100. Svitkin YV, Meerovitch K, Lee HS, Dholakia JN, Kenan DJ, Agol VI, Sonenberg N (1994) *J Virol* **68**: 1544-550
101. Hellen CU, Witherell GW, Schmid M, Shin SH, Pestova TV, Gil A, Wimmer E (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7642-7646
102. Hunt SL, Jackson RJ (1999) *RNA* **5**: 344-359
103. Pelletier J, Sonenberg N (1988) *Nature* **334**: 320-325
104. Macejak DG, Sarnow P (1991) *Nature* **353**: 90-94
105. Oh SK, Scott MP, Sarnow P (1992) *Genes Dev* **6**: 1643-1653.106.
106. Sachs AB, Sarnow P, Hentze MW (1997) *Cell* **89**: 831-838
107. Steel LF, Telly DL, Leonard J, Rice BA, Monks B, Savitski JA (1996) *Cell Growth Differ* **7**: 1415-1424
108. Savitski K, Platzer M, Uziel T, Gilad S, Sartiel A, Rosenthal A, Elroy-Stein O, Shiloh Y, Rotman G (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 1678-1684
109. Sobczak K (1999) *Analiza struktury regionów regulatorowych mRNA genu BRCA1*, praca doktorska, IChB PAN, Poznań
110. Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, Hogg D (1999) *Nature Genet* **21**: 128-132
111. Feng Y, Zhang F, Lokey LK, Chastain JL, Lakis L, Eberhart D, Warren ST (1995) *Science* **268**: 731-734

Perspektywy wykorzystania syntetycznych wirusów w terapii genowej

Prospects of using synthetic viruses in gene therapy

ALEKSANDER SOCHANIK¹, STANISŁAW SZALA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Domena kondensująca
- III. Systemowe wprowadzanie kompleksu nośnik - DNA *in vivo*
- IV. Transfer kompleksów do komórek
- V. Domena transdukcijna
- VI. Domena fuzogenna
- VII. Domena translokacji jądrowej
- VIII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: Arg-Chol — ω -BOC-argininoglicynian cholesterolu; ASOR — (receptor) asjaloorozomukoproteidowy; BGTC — 3- β -[(N',N'-diguanydyloaminoetano) karbamoilo] cholesterol; BOC — grupa ochronna *tert*-butyloksykarbonylowa; CHIm — karbaminian (3-imidazolo-1-izopropyl) cholesterolu; CTAB — bromek cetylotrimetyloamoniowy; DC-6-14 — chlorek O,O'-ditetradekanoilo-N-(α -trimetyloamionoacetylo) dietanoloaminy DC-Chol — 3 β -[N-(N',N'-dimetyloaminoetano)karbamoilo] cholesterol; DDAB — bromek dimetylodioktadecyloamoniowy; DMRIE — bromek 1,2-dimirystyloksypropylo-3-dimetylohydroksyetyloamoniowy; DOGS — dioktadecyloamidoglicylospermina; DOPE — dioleilofosfatydyloetanoloamina; DORIE — bromek 1,2-dioleilooksypropylo-3-dimetylohydroksyetyloamoniowy; DOSC — ester cholinowy 1,2-dioleilo-3-sukcynylo-*sn*-glicerolu; DOSPA — trifluoroocetan 2,3-dioleilooksy-N-[2(sperminokarboksamido)etylo]N,N-dimetylo-1-propanaminiowy; DOTAP — metylosiarczan N-[1-(2,3-dioleilooksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy; DOTB — 1,2-dioleilo-3-(4'-trimetyloamiono)-butanoilo-*sn*-glicerol; DOTIM — chlorek 1-[2[(oleoilooksy)etylo]-2-oleilo-3-(2-hydroksyetylo)-imidazolu, DOTMA — chlorek N-[1-(2,3-dioleilooksy)propylo]N,N,N-trimetyloamoniowy; DPPES — dipalmitoilofosfatydyloetanoloamidospiermina; DTAB — bromek didecylotrimetyloamoniowy; Lys-Pam₂-GroPEtn — kwas lizynylo-dipalmitoil-(L)- α -fosfatydyloetanolo-amino-2-trifluoroocetowy, PE — fosfatydyloetanoloamina; PEG — glikol polietylenowy; PEI — polietylenoimina; SA — stearyloamina; Spd — spermidyna; Spd⁺-Chol — 3- β -[(N¹- i N⁸-spermidyno)karbamoilo]choleste-

Contents:

- I. Introduction
- II. Condensation domain
- III. Systemic delivery of complex carrier - DNA *in vivo*
- IV. Transfer of complexes into cells
- V. Transductional domain
- VI. Fusogenic domain
- VII. Nuclear translocation domain
- VIII. Final remarks

rol; Spd⁺-Chol — 3- β -[(N⁴-spermidyno)karbamoilo]cholesterol; TTAB — bromek tetradecylotrimetyloamoniowy.

I. Wstęp

Podstawowym założeniem terapii genowej jest wprowadzenie do komórek terapeutycznego genu. W przypadku terapii genowej nowotworów dostępne obecnie metody transferu DNA *in vivo* (z zastosowaniem np. liposomów czy zmodyfikowanych wirusów) umożliwiają wprowadzenie do komórek nowotworowych tzw. genów samobójczych (zob. [1]) lub genów cytokin pobudzających przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną (zob. [2]), genów proapoptotycznych (zob. [3]) lub genów hamujących angiogenezę (zob. [4]).

Transfer materiału genetycznego do komórek stwarza jednakże niemałe kłopoty. Jak dotąd brak nośników, które posiadałyby takie zalety jak np.: ochrona podanego *in vivo* DNA przed degradacją, tkankowa wybiórczość, niskie ryzyko rekombinacji genetycznej (aktywacji onkogenów) i niepożądanego odpowiedzi immunologicznej. Ogranicza to rozwój terapii genowej.

Stosowane obecnie nośniki terapeutycznego DNA to pewne zmodyfikowane wirusy lub tzw. nośniki niewirusowe.

Do tych ostatnich zaliczają się liposomy kationowe (sferyczne agregaty lipidowe) [5, 6], obdarzone ładunkiem oligo- i polipeptydy (np. peptyd I [7]), po-

¹Dr, ²prof. dr hab., Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział Gliwice, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

li-L-lizyna [np. 8], histydylowana poli-L-lizyna [9], poli-L-ornityna [10]), lipidowe pochodne poliamin [11]) oraz różne kationowe polimery (np. polietylenoimina [np. 12-14], dendrymery poliamidoaminowe [15] polimerosomy (kopolimery polietylenoglikolu i polietyloetyleny)[16] oraz polimery poliwinylowe [17]).

Ze względu na ryzyko mutacji insercyjnych i wywoływanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez nośniki wirusowe obecnej generacji, nowym rozwiązaniem, jeśli chodzi o transfer DNA w warunkach *in vivo*, mogą okazać się nośniki niewirusowe, zwłaszcza tzw. „syntetyczne wirusy“. Pod pojęciem „syntetycznych wirusów“ rozumie się stabilne w kontakcie z płynami ustrojowymi układy supramolekularne posiadające domeny funkcjonalne podobne lub analogiczne do występujących u naturalnych wirusów (patrz Ryc. 1). Dzięki obecności takich modularnych domen syntetyczny wirus może *in vivo* kierować się do określonych tkanek, wydajnie

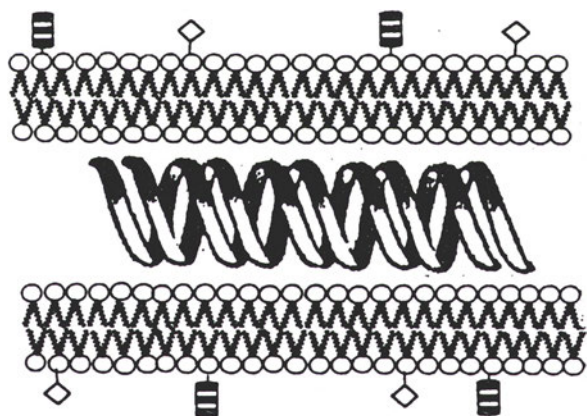
supramolekularny charakteryzujący się obecnością wspomnianych domen pełniących określone funkcje, np. kondensacji DNA, rozpoznawania receptorów powierzchni komórki, fuzji z błoną endosomu i translokacji jądrowej.

Prostota, niskie koszty, możliwość systemowego wprowadzenia DNA za pomocą posiadającego podwójną swoistość (transdukcyjną i transkrypcyjną) kompleksu z pochodnymi lipidów mogą okazać się zaletami syntetycznych wirusów.

Niniejsza praca stara się pokazać rozwój badań nad uniwersalnym syntetycznym nośnikiem DNA.

II. Domena kondensująca

Podstawowym elementem budowy syntetycznego wirusa jest tzw. dwuwarstwa lipidowa (ang. *lipid bilayer*) otaczająca część wewnętrzną omawianej struktury [18-20]. W skład tworzących ją dwuwarstw lipidowych wchodzi obdarzone ładunkiem



Składowe syntetycznego wirusa

lipid, domena kondensująca, główny składnik

pochodna lipidowa, domena transdukcyjna

pochodna lipidowa, domena fuzogenna / endosomolityczna

penetrować błonę komórkową oraz opuszczać światło pęcherzyków endocytarnych.

W przygotowaniu tego rodzaju niewirusowych nośników DNA wykorzystuje się zjawisko spontanicznej agregacji cząsteczek lipidów w określonych warunkach [18-20]. Agregacja ma miejsce np. podczas sonikacji emulsji lipidów ultradźwiękami. W wyniku agregacji cząsteczek lipidów powstaje układ

Ryc. 1. Syntetyczny wirus. Prowizoryczny schemat niewirusowego nośnika DNA tzw. syntetycznego wirusa zawierającego cztery podstawowe domeny funkcjonalne. Schemat pokazuje samoagregujące lipidy upakowane w tzw. dwuwarstwę lipidową. Niektóre cząsteczki lipidów posiadają wypadkowy ładunek dodatni (domena kondensująca), do innych przyłączone są kowalencyjnie różne ligandy (domeny transdukcyjna i fuzogenna). Symbolicznie zaznaczono przenoszony plazmidowy DNA zawierający transgen oraz jego promotor (mogący pełnić równocześnie rolę domeny lokalizacji jądrowej — patrz tekst).

lipidy kationowe oraz inne lipidy, elektrostatycznie obojętne. Otoczka tego rodzaju, tzw. domena kondensująca stanowi podstawową domenę syntetycznego wirusa. Jej funkcją jest kondensacja i ochrona przenoszonego *in vivo* plazmidowego DNA przed enzymatyczną degradacją. Kondensacja przenoszonego DNA jest podstawowym wymogiem skutecznego transferu przez błonę komórkową. Bez neutraliza-

cji ujemnego ładunku i zmniejszenia liniowych rozmiarów nieskondensowanych cząsteczek transport DNA przez błonę komórki wydaje się niemożliwy.

W fizjologicznym pH lipidy kationowe liposomowej „otoczki“ nośnika niewirusowego obdarzone są wypadkowym ładunkiem dodatnim. W wyniku zmieszania plazmidowego DNA (posiadającego ładunek ujemny) z emulsją zawierającą nośnik lipidowy dochodzi do ich wzajemnego oddziaływania elektrostatycznego. Jego następstwem są zmiany konformacyjne zarówno w lipidzie jak i w DNA. Zmiany DNA obejmują zmniejszenie jego efektywnych rozmiarów (kondensację) dzięki zobojętnieniu ujemnych ładunków grup fosforanowych. DNA przyjmuje wówczas kształt mocno zbitego kłęбка. Szereg badań wskazuje na niejednorodność, różną wielkość oraz kształt kompleksów. Powstawanie kompleksów zależy od stosunku molowego składowych kompleksu, struktury lipidów, pH, siły jonowej oraz innych czynników. Jest ono najszybsze gdy wypadkowy ładunek kompleksu waha się w granicach 1,0-1,1, zaś gdy ładunek wypadkowy kompleksu przewyższa 1,2 osiągnięcie stanu równowagi tworzenia kompleksu jest wydłużone [21]. Ma to duże znaczenie dla wydajności transferu DNA *in vivo*.

Istnieją rozbieżności co do konformacji powstającego kompleksu: część danych wskazuje na powstanie ciągłej struktury lipidowej otaczającej cząsteczkę DNA [22], inna część przemawia za lokalizacją DNA na powierzchni kompleksu [21], a jeszcze inna sugeruje, że lipidy nie tworzą w kompleksie dwuwarstwy [23] lub tworzą wysoko uporządkowane struktury wielowarstwowe pomiędzy którymi znajduje się upakowany DNA [24].

Powstały kompleks zwany jest lipopleksem jeśli nośnikiem DNA są liposomy kationowe, zaś jeśli w roli nośnika występują polimery kationowe lub oba naraz to kompleksy noszą nazwę odpowiednio poliopleksu albo lipopolipeksu [25].

Istotnym jest czy wprowadzane systemowo kompleksy DNA i lipidów kationowych rzeczywiście uczestniczą bezpośrednio w transferze *in vivo* DNA do komórki czy też lipidowe składniki kompleksu służą jedynie jako pozakomórkowy nośnik tzw. „nagiego“, to jest nieskondensowanego DNA, mającego również zdolność transfekcji [26]. W wyjątkowych sytuacjach, np. w transferze terapeutycznych genów do pewnych typów guzów nowotworowych „nagi“ DNA może być przydatny [27]. Panuje jednak raczej powszechne przekonanie, że skuteczność systemowej terapii genowej nowotworów zależy od dostarczenia terapeutycznego DNA do krwiobiegu w postaci kompleksu z nośnikiem. Bada-

nia dowiodły, że podanie „nagiego“ DNA, nawet w ilościach prowadzących do stałego stężenia w surowicy krwi, nie powoduje ekspresji transgenu w tkankach [28]. Natomiast wprowadzenie do krwiobiegu DNA skompleksowanego z lipidami a następnie nieskompleksowanego DNA nie obniża ekspresji w pierw wprowadzonego DNA. Dowodzi to, że nośniki lipidowe grają czynną rolę w procesie transferu genów a nie uwalniają jedynie cząsteczki DNA zdolne do transfekcji komórek. Spostrzeżenie grupy Szoki potwierdza celowość prac nad syntetycznymi nośnikami DNA, zdolnymi m. in. do kondensacji DNA i ochrony przed enzymami litycznymi [28].

Lipidy kationowe to amfipatyczne cząsteczki składające się z części hydrofobowej, którą tworzą pochodne lipidów oraz części hydrofilowej, którą stanowią różne protonowalne ugrupowania. Obie części scala (wiązaniami typu eterowego, estrowego, amidowego lub karbamoilowego) łącznik o różnej liczbie atomów węgla w łańcuchu. Obecność tych elementów jest wspólnym mianownikiem budowy wszystkich lipidów kationowych, które poza tym znacznie różnią się strukturalnie.

Pierwszy kationowy lipid, DOTMA (nazwy chemiczne omawianych lipidów – patrz wykaz stosowanych skrótów), zsyntezowali w 1987 roku Felgner i w s p . [5]. Nowsze lipidy kationowe typu DOTMY to DMRIE i DORIE [29], DOTAP, DOTB oraz DOSC [30]. Obecnie do grupy tych lipidów, zawierających jedno lub więcej ugrupowań obdarzonych w warunkach fizjologicznych ładunkiem dodatnim (pochodne czwartorzędowych związków amoniowych) zalicza się ponad sto zsyntezowanych związków [31].

Wiązanie eterowe (obecne np. w DOTMA, DMRIE) trudno ulega biodegradacji podczas gdy wiązanie estrowe (obecne np. w DOTAP, DOTB i DOSC) łatwiej ulega hydrolizie [32]. Związkiem należącym do omawianego typu lipidów kationowych, który ostatnio okazał się skuteczny (w kombinacji z DOPE oraz cholesterolem) w transferze DNA *in vivo* jest lipid DC-6-14 [33]. Skuteczność transfekcji z udziałem tego związku potwierdza przypuszczenia, że hydroksyetylowe czwartorzędowe pochodne amoniowe zawierające łańcuchy dimirystylowe (jak np. w DMRIE) lepiej nadają się do tworzenia stabilnych dwuwarstw lipidowych od pochodnych z łańcuchami zarówno dłuższymi jak i krótszymi [29].

Inna grupa związków kationowych znajdujących zastosowanie w komponowanych nośnikach niewirusowych to alkiloaminy lub alkiloamidy. Należą do nich m. in. czwartorzędowe detergenty amoniowe: CTAB, DTAB, TTAB, stearyloamina oraz DDAB [1,

2, 34]. Do związków tych zaliczają się również lipidowe pochodne poliamin sperminy i spermidyny wykazujące zdolność do samoagregacji i trwałej kondensacji DNA w warunkach fizjologicznych np. DOGS i DPPES [11]. Do lipidowych pochodnych poliamin zaliczyć należy także DOSPA [35]. Związek ten posiada w części hydrofobowej reszty oleilowe (podobnie jak DOTMA), natomiast do części kationowej dołączona jest spermina. Przy fizjologicznym pH wypadkowy ładunek elektryczny części kationowej wynosi +5. Liposomy tego typu wykazują zwiększoną zdolność transfekcji komórek *in vitro* w porównaniu z liposomami monokationowymi (np. DOTMA). Skuteczność transfekcyjna nośników zawierających lipopoliaminy najprawdopodobniej jest wypadkową trzech czynników: 1° zdolności do upakowania DNA, 2° zwiększonej gęstości ładunku w grupie aminowej w porównaniu z ugrupowaniem amoniowym (w tym ostatnim ładunek jest rozmyty na większą ilość protonów co powoduje słabsze oddziaływanie z resztami fosforanowymi i karboksylowymi związków wchodzących w skład błony komórkowej), 3° obecności zasadowej aminy drugorzędowej (np. w DOGS) posiadającej $pK \sim 5.4$ i mogącej buforować kwasowość endosomów, chroniąc pośrednio DNA przed degradacją [35].

Jeszcze inny typ lipidów kationowych to syntetyczne pochodne imidazolu, np. DOTIM [36] lub pewnych fosfatydyloetanolamin, takich jak DPPES [11] czy Lys-Pam₂-GroPEtn [21].

Ostatnim typem omawianych związków kationowych są pochodne cholesterolu. Za pierwszy związek tego rodzaju uważa się DC-Chol, zsyntezowany na początku lat dziewięćdziesiątych przez G a o i H u a n g a [6]. W związkach tego typu cholesterol połączony jest z ugrupowaniami zawierającymi pierwszo-, drugo- lub trzeciorzędowe grupy aminowe (w odróżnieniu od analogów DOTMA zawierających zwykle czwartorzędowe ugrupowania amoniowe) za pomocą różnych łączników. Łącznik obecny w DC-Chol zawiera wiązanie typu karbamoilowego. Dzięki obecności takiego wiązania lipidy typu DC-Chol są dość stabilne chemicznie (w porównaniu z lipidami zawierającymi wiązanie eterowe lub estrowe), np. nie ulegają łatwo utlenianiu. Natomiast w komórce są one rozkładane przez esterazy i łatwo metabolizowane. *In vitro* DC-Chol jest co najmniej pięciokrotnie mniej toksyczny od DOTMA [6].

Pochodne cholesterolu mogą tworzyć w środowisku wodnym, w kombinacji z DOPE, struktury zawierające dwuwarstwę lipidową [32]. Obecność cholesterolu w nośniku stabilizuje dwuwarstwę lipido-

we i zwiększa ich oporność na destrukcyjne działanie białek osocza krwi i chroni DNA przed enzymami litycznymi [36-38].

W badaniach przydatności do transfekcji *in vivo* nośników zawierających DC-Chol stwierdzono obecność transgenu w komórkach po upływie 20 dni od dożylnego podania zwierzętom [39]. Nie stwierdzano objawów zapalnych ani zmian aktywności badanych enzymów wątroby ani też nie stwierdzano zaburzeń rytmu pracy serca lub niedokrwienia mięśnia sercowego [40]. DC-Chol był wykorzystany w próbach terapii genowej [np. 41].

Cholesterol wykorzystano w syntezie innych lipidów kationowych, np. CHIm [42], BGTC [43], połączeń cholesterolu ze spermidyną [31, 44-46], galaktozą [47]. Transfekcję z udziałem tych pochodnych cholesterolu badano zarówno *in vitro* jak również *in vivo*.

Również wykorzystywano cholesterol w charakterze obojętnego składnika liposomów kationowych [33, 48, 49]. Kompleksy DNA z nośnikiem zawierającym cholesterol w połączeniu z DMRIE, podane systemowo ciężarnym myszom, okazały się zdolne do pokonania bariery łożysko-płód. Ekspresję transgenu stwierdzono u potomstwa tych myszy [49].

DC-Chol jest przykładem monokationowej pochodnej lipidowej zaś BGTC lub pochodne spermidynowe są przykładem pochodnych oligokationowych. Substancje, które przy fizjologicznym pH są protonowane (np. spermidyna) nadają połączeniu z cholesterolem charakter oligokationu. Zwiększona gęstość ładunku dodatniego nośnika (w porównaniu z nośnikami monokationowymi) umożliwia wydajne kompleksowanie i kondensację posiadających ujemny ładunek cząsteczek DNA oraz przyczynia się do wzrostu wydajności endocytozy takiego kompleksu. Silnie zasadową grupę guanidynową zdolną do kompleksowania DNA zawiera także arginina [50]. Przykładem lipidu kationowego opartego na połączeniu fragmentu cholowego cholesterolu z modyfikowaną sterycznie arginina jest Arg-Chol [51].

Innym jeszcze lipidowym składnikiem konstruowanych obecnie nośników niewirusowych może być fosfatydyloetanolamina modyfikowana za pomocą polietylenoglikolu (PEG-PE) [52]. Do końca cząsteczki PEG może być dołączony ligand, jak np. w amino-PEG-PE, metoksy-PEG-PE i hydrazido-PEG-PE [53]. Liposomy zawierające pochodne PEG mają wydłużony czas półtrwania w krwiobiegu gdyż dzięki efektywnemu ekranowaniu przez PEG są skuteczniej chronione przed obdarzonymi ujemnym ładunkiem składnikami surowicy [54]. Obecność gli-

kolipidowych lub fosfolipidowych pochodnych PEG w błonach liposomalnych powoduje także znaczne zmniejszenie fagocytozy liposomów tego typu [52].

Zależność pomiędzy strukturą lipidu kationowego a wydajnością procesu transfekcji jest złożona ponieważ lipidy kationowe mogą być elementem budowy także innych domen syntetycznego wirusa. Wydaje się jednak, że do bardziej istotnych cech wydajnych transfekcyjnie lipidów kationowych należą: 1° tzw. temperatura przejścia fazowego T_c lipidu niższa od 37°C [21] (powyżej T_c dwuwarstwa lipidowa jest w stanie tzw. ciekłokrystalicznym i następuje samorzutna naprawa jej defektów strukturalnych powstałych w trakcie formowania liposomów), 2° niska toksyczność związku [41], 3° wartość tzw. potencjału zeta będącego miarą ładunku powierzchniowego liposomów, wyznaczającego rozmiar kompleksów danego nośnika z DNA [55].

Zsyntezowano także inne struktury mogące pełnić rolę otoczki sztucznego wirusa. Są to analogiczne do liposomów układy zwane polimerosomami. Składają się one z amfipatycznych kopolimerów zawierających np. glikol polietylenowy (PEG) i polietyloetylen [16]. W porównaniu z dwuwarstwami lipidowymi charakteryzują się one o wiele większą odpornością mechaniczną i mniejszą przepuszczalnością dzięki selektywności metod sieciowania polimeru.

III. Systemowe wprowadzanie kompleksu nośnik-DNA *in vivo*

Badania nad degradacją lipopleksów wykazały, że DNA jest usuwany z krążenia w ciągu 5 minut od podania lipopleksu, zaś internalizowany przez komórki nabłonkowe płuc — w ciągu pierwszych 60 minut [56]. Zatem skutecznie działający nośnik niewirusowy podany systemowo powinien przetrwać w krwioobiegu przez okres rzędu godziny.

Próbuje się różnych metod stabilizacji kompleksów nośnik-DNA w obecności surowicy. Jedną z metod jest tzw. prekondensacja DNA, poprzedzająca utworzenie właściwego kompleksu z lipidem kationowym. Do tego celu nadają się np. bogate w lizynę albo argininę peptydy kationowe mające sekwencje podobne do tych, które występują w histonie H1 oraz protaminie. Zwiększona w wyniku prekondensacji wydajność transfekcji nie zależy od typu komórek [57].

Stabilizację kompleksu nośnik-DNA w obecności surowicy powoduje też wprowadzenie uprzednio do krwioobiegu „zwykłych“ (niekationowych) liposomów przenoszących prolek dichlorometylenobisfosfonian, hamujący aktywność makrofagów [58]. Se-

lektywnie pobieranie przez makrofagi wątroby i śledziony liposomów z prolekiem prowadzi do zredukowania liczebności populacji tych komórek. Ponieważ makrofagi pełnią kluczową rolę w usuwaniu z krwioobiegu kompleksów niewirusowych nośników z DNA, w wypadku wprowadzenia lipopleksów do układu krążenia obserwuje się wzrost wydajności transfekcji.

Opracowano też metodę zamykania plazmidowego DNA w nośniku-otoczce lipidowej zawierającej lipid kationowy, fuzogenny lipid neutralny i zdolną do dysocjacji cząsteczkę PEG [59]. Kompleks taki posiada wymiary poniżej 70 nm, jest odporny na degradację i nadaje się do podawania ustrojowego. Jednocześnie cząsteczki PEG połączone z nośnikiem łańcuchami ceramidowymi mogą ulegać dysocjacji. Umożliwia to oddziaływanie takich nośników z komórkami docelowymi i destabilizację błony plazmatycznej.

IV. Transfer lipopleksów do komórek

Wniknięcie skompleksowanego DNA do komórki jest możliwe dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy dodatnio naładowanym lipidowym nośnikiem DNA w kompleksie a błoną komórkową obdarzoną ładunkiem ujemnym. Niekiedy w miejscu adsorpcji dochodzi do destabilizacji i deformacji błony komórkowej. Destabilizacja ta umożliwia fuzję lipidów w miejscu kontaktu nośnika z błoną lub spontaniczną endocytozę kompleksu, w której pośredniczą proteoglikany [zob. 56, 60]. Dla kompleksów zawierających stabilne dwuwarstwy lipidowe większe znaczenie wydaje się mieć endocytoza. Sama fuzja z błoną komórki wydaje się odgrywać mniejszą rolę, czego zdają się dowodzić np. doświadczenia z udziałem czwartorzędowych detergentów amoniowych zdolnych do transfekcji lecz nie do fuzji z błoną.

Wydajność endocytozy zależy m. in. od ilości, rodzaju i rozkładu przestrzennego ładunków dodatnich lipidu kationowego, rozmiaru powstałych kompleksów DNA-lipidy i ich ładunku wypadkowego. Wydaje się, że w warunkach *in vitro* transfer DNA jest najbardziej skuteczny gdy tzw. współczynnik ρ kompleksu (stosunek ładunków dodatnich do ujemnych w kompleksie) przekracza 1,2 [21]. Natomiast w warunkach *in vivo* optymalna wartość współczynnika ρ wynosi 1,0-1,1 [61]. Internalizacja kompleksów w drodze endocytozy jest jednak powolna: po upływie szeregu godzin nie więcej niż 70% kompleksów zostaje internalizowanych [21].

V. Domena transdukcijna

Obecność lipidu z przyłączonym kowalencyjnie ligandem podczas spontanicznej agregacji dwuwarstwy lipidowej umożliwia rozpoznawanie przez nośnik swoistego receptora na powierzchni komórek, np. nowotworowych. Obecność tej tzw. domeny transdukcijnej powinna umożliwiać wysoką swoistość wprowadzania DNA do komórek.

Swoiste wprowadzanie DNA do określonych typów komórek umożliwiają nośniki zawierające takie ligandy jak galaktoza [18, 62], kwas foliowy [63, 64], insulina [65], transferyna [66], peptydy wiążące się z integryną [67, 68] i inne. Np. reszty galaktozowe połączone kowalencyjnie z polilizyną są rozpoznawane przez receptor asjaloorozomukoproteidowy (ASOR) [69]. Wbudowanie do dwuwarstwy lipidowej cholesterolu z galaktozą umożliwia rozpoznawanie przez liposomy receptorów asjaloglikoproteinowych komórek wątroby [47]. W niektórych badaniach próbowano również stosować związany z polilizyną asjaloorozomukoid (po usunięciu neuramini-dazy kwasu sjalowego) [70].

Do swoistego wprowadzania DNA do komórek wątrobiaka za pośrednictwem receptora asjaloglikoproteinowego wykorzystano połączenie galaktozy z histonem H1 [71]. Za pośrednictwem receptora serpiny do tych komórek wprowadzono też kompleks plazmidowego DNA z koniugatem poli-L-lizyny i peptydu zawierającego sekwencję pięciu aminokwasów rozpoznawanych przez ten receptor [72].

Do swoistego wprowadzania DNA do określonych komórek można również wykorzystać tzw. immunoliposomy to jest liposomy, w których funkcje liganda pełnią monoklonalne przeciwciała. Przykładem takiego zastosowania, *in vitro*, mogą być immunoliposomy połączone z przeciwciałami skierowanymi przeciwko białkom CD4 i CD8 na powierzchni niektórych komórek nowotworowych [73].

VI. Domena fuzogenna

Trzecią domeną, którą powinien zawierać syntetyczny wirus to tzw. domena fuzogenna (endosomolityczna). Domena ta umożliwia destabilizację i rozpad endosomu, tj. struktury cytoplazmatycznej, wewnątrz której znalazły się wchłonięte w trakcie endocytozy kompleksy DNA i nośnika. Destabilizacja dwuwarstwy lipidowej endocytów i rozpad pęcherzyków, tzw. endosomoliza, prowadzi do uwalniania kompleksu do cytoplazmy [32, 74]. Tylko około 15% endosomów ulega procesowi destabilizacji, prowadzącemu do uwolnienia ich zawartości do

cytoplazmy [75]. Reszta ulega przekształceniu w lizosomy, w których dochodzi do całkowitej degradacji kompleksów nośnik-DNA.

Destabilizacja błony endosomu i uwolnienie kompleksów nośnik-DNA do cytoplazmy zależą m. in. od rodzaju lipidu kationowego oraz lipidu dopełniającego we wprowadzonym kompleksie oraz pH wewnątrz endosomu. Destabilizacji endosomu sprzyja także zobojętnienie ładunku lipidu kationowego w kompleksie przez spontanicznie przemieszczające się z zewnętrznej do wewnętrznej monowarstwy endosomu lipidy o charakterze anionowym. Następujące zobojętnienie ładunku lipidów kationowych zaburza oddziaływania elektrostatyczne tych lipidów z DNA i prowadzi do jego uwalniania z kompleksu [75]. Destabilizująco na endosomy działa chlorokina [29]. Związek ten posiada słabo zasadowy charakter i gromadząc się w endosomach zapobiega „dojrzwaniu“ endosomu oraz jego łączeniu się z lizosomami. Podobnie destabilizująco na endosomy działają inne substancje, np. gramicydyna S [76], listeriolizyna O [77] czy egzotoksyna A bakterii *Pseudomonas* [78].

Zależna od pH endosomoliza może też zachodzić dzięki obecności w nośniku lipidów sprzężonych chemicznie z syntetycznymi peptydami o sekwencji podobnej do N-końca podjednostki HA-2 hemaglutyniny wirusa grypy [79]. Zależna od pH fuzja błony endosomu z tzw. wirosomami zawierającymi rekonstruowaną hemaglutyninę oraz wiążące DNA lipidy kationowe również prowadzi do zwiększenia ekspresji przenoszonego transgenu [80].

Właściwości endosomolityczne wykazuje także polietylenoimina (PEI) mogąca równocześnie, ze względu na zdolność kondensacji DNA, pełnić funkcję dwóch wymienionych wyżej domen [12, 68]. Inną jeszcze możliwością zwiększenia wydajności wprowadzania DNA do komórek *in vivo* w oparciu o wykorzystanie domeny endosomolitycznej jest kowalencyjne sprzężenie lipidów z peptydami zdolnymi do destabilizacji błon, np. melityną [81] czy częściowo histydylowaną poli-L-lizyną [9]. pK układu imidazolowego (~6) powoduje, że podczas dojrzwania endosomu następuje protonacja histydyny i destabilizacja błony endosomu zawierającego taki nośnik.

VII. Domena translokacji jądrowej

Domena syntetycznego wirusa mająca ułatwiać przemieszczanie się wprowadzanego kompleksu lub samego transgenu do jądra stransfekowanej komórki nosi nazwę domeny translokacji jądrowej.

Etap związany z wniknięciem cząsteczek DNA do jądra komórkowego jest krytyczny dla wydajności lipofekcji czy polifekcji. Bez wspomnianej domeny kompleksy przemieszczające się do jądra komórki stanowią niewielką ilość uwolnioną z endosomów [71]. Los kompleksów nośnik-DNA w cytoplazmie nie jest jasny. Możliwe, że dochodzi do całkowitej lub częściowej dysocjacji DNA od nośnika w drodze wymiany z innymi polianionami (RNA, fosfatydyloseryną, proteoglikanami).

Teoretycznie rozmiar porów w błonie jądrowej wyklucza dyfuzję cząsteczek większych niż 40kDa, w tym także DNA [21]. Ogólnie rzecz biorąc, uwolniony z endosomów plazmidowy DNA może więc wnikać do jądra komórki albo pasywnie, podczas jej podziału (co tłumaczyłoby łatwość transfekowania komórek intensywnie dzielących się), albo aktywnie — jeżeli towarzyszy mu tzw. sygnał lokalizacji jądrowej.

Wprowadzenie do nośnika takiego sygnału może polegać na kowalencyjnym połączeniu części lipidów tworzących nośnik z histonami, peptydami czy defektywnymi wirusami. Przykładem jest peptyd I składający się z dwudziestu aminokwasów końca NH₂ białka włóknistego adenowirusa oraz szeregu reszt lizynowych [7]. Oprócz sekwencji lokalizacji jądrowej peptyd ten zawiera motyw NPXY zwiększający wydajność endocytozy, a reszty lizynowe sprzyjają dodatkowo kondensacji DNA. Innym przykładem jest poli-L-lizyna, sprzęgnięta z zawierającym sygnał NLS fragmentem późnego antygeny SV40, [82].

Innym rozwiązaniem prowadzącym do obecności sygnału lokalizacji jądrowej jest odpowiednia konstrukcja samego transfekowanego DNA. Polega ona na wbudowaniu do plazmidu promotora swoistego tkankowo genu [83]. Promotor taki wiąże swoiście czynniki transkrypcyjne obecne w cytoplazmie stransfekowanych komórek. Ponieważ czynniki te posiadają również (inne domeny) sekwencje lokalizacji jądrowej możliwa jest zatem translokacja do jądra wtórnych kompleksów zawierających czynniki transkrypcyjne i wprowadzony DNA (być może z nośnikiem). W transporcie (translokacji) bierze udział specyficzne białko receptorowe (importyna) kierujące kompleks do porów jądrowych [84]. Przykładem takiego rozwiązania jest umieszczenie w plazmidzie promotora dla czynnika transkrypcyjnego Pax-6 swoistego dla niektórych komórek mózgu, lub promotora dla czynnika transkrypcyjnego AP-2b swoistego dla tkanek gałki ocznej. Innymi przykładami są promotor zawierający miejsca wiążące dla GATA-1 i czynniki transkrypcyjne swo-

iste dla komórek układu krwiotwórczego czy wreszcie sekwencje promotorowe α -aktyny specyficzne dla mięśni szkieletowych [83].

Tak skonstruowana domena translokacji jądrowej syntetycznego wirusa umożliwi również tkankową specyficzność ekspresji wprowadzanego genu. Dlatego domenę tworzoną przez swoisty promotor kontrolujący przenoszony terapeutyczny DNA można również uważać za domenę w sensie transkrypcyjnym. Przykładem takiego układu jest np. gen samobójczy deaminazy cytozyny pod kontrolą promotora genu tyrozynazy ulegającego swoistej ekspresji w komórkach czerniaka [1, 2].

IX. Uwagi końcowe

Wydajność transferu DNA, zwłaszcza *in vivo*, za pomocą nośników lipidowych oraz ekspresja w komórkach docelowych zależy od kilku niezależnych procesów: sposobu wprowadzenia kompleksu, endocytozy, endosomolizy i transportu do jądra. Transfer cząsteczek DNA za pomocą obecnej generacji nośników niewirusowych nie jest jeszcze wydajny i wybiórczy. Mankamenty te być może zostaną usunięte jeśli uda się zsyntezować takie kowalencyjnie zmodyfikowane lipidy, które w drodze samoagregacji będą zdolne utworzyć domeny funkcjonalne zapewniające ochronę kompleksu nośnik-DNA podczas krążenia w krwiobiegu, wybiórczą i szybszą endocytozę kompleksu przez docelowe komórki, wydajny rozpad endosomów oraz translokację DNA do jądra jak i ekspresję wprowadzonego genu. Konstrukcja nośników niewirusowych, przenoszących terapeutyczny DNA jest więc wyzwaniem dla chemików.

Podziękowanie

Praca została sfinansowana z grantu Z-KBN 004/PO4/98

Artykuł otrzymano 13 grudnia 1999 r.

Zaakceptowano do druku 6 kwietnia 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Szala S, Missol E, Sochanik A i wsp (1996) *Gene Therapy* 3: 1026-1031
2. Missol E, Sochanik A, Szala S (1995) *Canc Lett* 97: 189-193
3. Favrot M, Coll J-L, Louis N i wsp (1998) *Gene Therapy* 5: 728-739
4. Wilczyńska U, Szary J, Szala S (1999) *Współczesna Onkologia* 4: 139-142
5. Felgner PL, Gadek TR, Holm M i wsp (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413-7417
6. Gao X, Huang L (1991) *Biochem Biophys Res Commun* 179: 280-285
7. Zhang F, Andreassen P, Fender P i wsp (1999) *Gene Ther* 6: 171-181

8. Wagner E, Zenke M., Cotten M. i wsp (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3410-3414
9. Midoux P, Monsigny M (1999) *Bioconjugate Chem* **10**: 406-411
10. Dong Y, Skoultchi AI, Pollard J (1993) *Nucl Acid Res* **21**: 771-772
11. Behr J-P, Demeneix B, Loeffler J-P (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6982-6986
12. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA i wsp (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7297-7301
13. Coll JL, Chollet P, Brambilla E i wsp (1999) *Human Gene Ther* **10**: 1659-1666
14. Kircheis R, Kichler A, Wallner G i wsp (1997) *Gene Therapy* **4**: 409-418
15. Hudde T, Rayner SA, Corner RM i wsp (1999) *Gene Therapy* **6**: 939-943
16. Discher B, Won YY, Ege DS i wsp (1999) *Science* **284**: 1143-1146
17. Mendiratta SK, Quezada A, Matar M i wsp (1999) *Gene Therapy* **6**: 833-839
18. Remy J-S, Kichler A, Mordvinov V i wsp (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1744-1748
19. Abdallah B, Sachs L, Demeneix BA (1995) *Biol Cell* **85**: 1-7
20. Sochanik A, Szala S (1996) *Acta Biochim Polon* **43**: 293-300
21. Miller AD (1998) *Angew Chem Int Ed* **37**: 1768-1785
22. Gherson H, Ghirlando R, Guttman SB i wsp (1993) *Biochemistry* **32**: 7143-7151
23. Spector M, Schnur JM (1997) *Science* **275**: 791-792
24. Rädler JO, Koltover I, Salditt, T i wsp (1997) *Science* **275**: 810-814
25. Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP i wsp (1997) *Hum Gene Ther* **8**: 511-512
26. Song YK, Liu F i Liu D (1998) *Gene Therapy* **5**: 1531-1537
27. Budryk M, Wilczyńska U, Szary J, Szala S (1999) *Cancer Lett (w druku)*
28. Barron LG, Uyechi LS i Szoka Jr FC (1999) *Gene Therapy* **6**: 1179-1183
29. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN i wsp (1994) *J Biol Chem* **269**: 2550-2561
30. Leventis R, Silvius JR (1990) *Biochim Biophys Acta* **1023**: 124-132
31. Lee ER, Marshall J, Siegel CS i wsp (1996) *Hum Gene Ther* **7**: 1701-1717
32. Gao X, Huang L (1995) *Gene Therapy* **2**: 710-722
33. Kikuchi A, Aoki Y, Sugaya S i wsp (1999) *Hum Gene Ther* **10**: 947-955
34. Rose JK, Buonocore L, Whitt MA (1991) *BioTechniques* **10**: 520-525
35. Sugaya S, Fujita K, Kikuchi A i wsp (1996) *Hum Gene Ther* **7**: 223-230
36. Kirby C (1980) *Biochem J* **186**: 591-598
37. Bhattacharya S, Halder S (1996) *Biochim Biophys Acta* **1283**: 21-30
38. Crook K, Stevenson BJ, Dubouchet M i wsp (1998) *Gene Therapy* **5**: 137-143
39. Stewart M, Plautz G, Del Buono L i wsp (1992) *Hum Gene Ther* **3**: 267-275
40. Nabel EG, Gordon D, Yang Zhi-Y i wsp (1992) *Hum Gene Ther* **3**: 649-656
41. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY i wsp (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11307-11311
42. Budker V, Gurevich V, Hagstrom JE i wsp (1996) *Nature Biotechnol* **14**: 760-764
43. Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M i wsp (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9682-9686
44. Guy-Caffey J, Bodepudi V, Bishop JS i wsp (1996) *J Biol Chem* **270**: 31391-31396
45. Moradpour D, Schauer JI, Zurawski VR i wsp (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **221**: 82-88
46. Bishoff R, Cordier Y, Perraud F i wsp (1997) *Anal Biochem* **254**: 69-81
47. Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M i wsp (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 78-83
48. Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM i wsp (1997) *Nature Biotechnol* **15**: 647-652
49. Ochiya T, Takahama Y, Baba-Toriyama H i wsp (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **258**: 358-365
50. Lewis JG, Lin KY, Kothavale A i wsp (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3176-3181
51. Sochanik A, Kaida I, Mitrus I i wsp (2000) *Cancer Gene Ther* **7**: 513-520
52. Hong K, Zheng W, Baker A i wsp (1997) *FEBS Lett* **400**: 233-237
53. Zalipsky S, Brandeis E, Newman M i wsp (1994) *FEBS Lett* **353**: 71-74
54. Meyer O, Kirpotin D, Hong K i wsp (1998) *J Biol Chem* **273**: 15621-15627
55. Takeuchi K-I, Ishihara M, Kawaura C i wsp (1996) *FEBS Lett* **397**: 207-209
56. Barron LG, Gagné L i Szoka Jr FC (1999) *Human Gene Ther* **10**: 1683-1694
57. Schwartz B, Ivanov M-A Pitard B i wsp (1999) *Gene Therapy* **6**: 282-292
58. Schughart K, Bischoff R, Ali Hadji A i wsp (1999) *Gene Therapy* **6**: 448-453
59. Wheeler JJ, Palmer L, Ossanlou L i wsp (1999) *Gene Therapy* **6**: 271-281
60. Labat-Moleur F, Steffan A-M, Brisson C i wsp (1996) *Gene Therapy* **3**: 1010-1017
61. Schwartz B, Benoist C, Abdallah B i wsp (1995) *Hum Gene Ther* **6**: 1515-1524
62. Perales JC, Ferkol T, Molas M i wsp (1994) *Eur J Biochem* **226**: 255-266
63. Lee R, Low P (1994) *J Biol Chem* **269**: 3198-3204
64. Lee R, Huang L (1996) *J Biol Chem* **271**: 8481-8487
65. Rosenkranz AA, Yachmenev SV, Jans D i wsp (1992) *Exp Cell Res* **199**: 323-329
66. Simoes S, Slepushkin V, Gaspar R i wsp (1998) *Gene Therapy* **5**: 955-964
67. Hart SL, Arancibia-Carcamo C, Wolfert MA i wsp (1998) *Hum Gene Ther* **9**: 575-585
68. Erbacher P, Remy JS, Behr, JP (1999) *Gene Therapy* **6**: 138-145
69. Perales JC, Ferkol T, Beegen H i wsp (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4086-4090
70. Findeis MA, Merwin JM, Spitalny G i wsp (1993) *Tibtech* **11**: 202-204
71. Chen J, Stickles, RJ, Daichendt K (1994) *Hum Gene Ther* **5**: 429-435
72. Ziady A-G, Ferkol T, Gerken T i wsp (1999) *Gene Therapy* **5**: 1685-1697
73. Kao GY, Chang LJ, Allen T (1996) *Cancer Gene Ther* **3**: 250-256
74. Lasic DD, Templeton NS (1996) *Adv Drug Deliv Rev* **20**: 221-266
75. Xu Y, Szoka F (1996) *Biochemistry* **35**: 5616-5623
76. Legendre JY, Szoka FC (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 893-897
77. Wu GY, Wu CH i Zhang Y (1995) W: *Abstract Book, 3rd Symposium on Gene Therapy, Berlin (Germany)*
78. Fominaya J, Wels W (1995) W: *Abstract Book, 3rd Symposium on Gene Therapy, Berlin (Germany)*
79. Wagner E, Curiel D, Cotten M (1994) *Adv Drug Deliv Rev* **14**: 113-135
80. Schoen P, Chonn A, Cullis PR i wsp (1999) *Gene Therapy* **6**: 823-832
81. Legendre JY, Trzeciak A, Bohrmann B i wsp (1997) *Bioconjugate Chem* **8**: 57-63
82. Chan, CK i Jans DA (1999) *Human Gene Ther* **10**: 1695-1702
83. Vacik J, Dean BS, Zimmer WE i wsp (1999) *Gene Therapy* **6**: 1006-1014
84. Powers M, Forbes D (1994) *Cell* **79**: 931-934

Wewnątrzkomórkowy transfer genów

Intracellular genes transfer

ANNA POWOLNY¹, HANNA JAŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Informacja genetyczna genomów organelliowych
- III. Sposoby transferu materiału genetycznego
- IV. Warunki pomyślnego transferu genów
- V. Przykłady transferu materiału genetycznego
 - V-1. Transfer z mitochondriów do jądra
 - V-2. Transfer z chloroplastów do jądra
 - V-3. Transfer z chloroplastów do mitochondriów
 - V-4. Transfer z jądra do mitochondriów
 - V-5. Brak transferu do chloroplastów
- VI. Konsekwencje przeniesienia informacji genetycznej
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Genetic information of modern organellar genomes
- III. Pathways of genetic material transfer
- IV. Circumstances of successful genes transfer
- V. Examples of genetic material transfer
 - V-1. Transfer from mitochondria to nucleus
 - V-2. Transfer from chloroplasts to nucleus
 - V-3. Transfer from chloroplasts to mitochondria
 - V-4. Transfer from nucleus to mitochondria
 - V-5. Lack of transfer to chloroplasts
- VI. Consequences of genetic information transfer
- VII. Conclusions

Wykaz skrótów: kpz— tysiąc par zasad.

I. Wstęp

Modyfikowanie organizmów przez wprowadzenie obcego kwasu nukleinowego jest niewątpliwie jedną z największych zdobyczy nauki XX wieku. Przenoszenie sekwencji nukleotydowych pomiędzy organellami komórki eukariotycznej jest również formą transferu informacji genetycznej, jest to jednak zjawisko naturalnie zachodzące w przyrodzie. Proces ten nie jest charakterystyczny dla danej grupy eukariontów i wydaje się być uniwersalny o niebagatelnym znaczeniu dla ewolucji. Co więcej, uważa się, że jest on ciągle aktywny. Do niedawna utrzymywano, że transfer materiału genetycznego może odbywać się tylko w kierunku jądra [1]. Obecnie znane są przypadki „ucieczki” DNA/RNA z jądra i chloroplastów do mitochondriów. Poniższa praca ma na celu przedstawienie poznanych dróg naturalnie zachodzącego transferu genów między organellami.

II. Informacja genetyczna genomów organelliowych

Powszechnie akceptowana teoria endosymbiotycznego pochodzenia mitochondriów i chloroplastów zakłada, że były one niegdyś wolno żyjącymi bakteriami, podobnymi do współczesnych bakterii purpurowych i cyjanobakterii [2]. Jeśli porówna się wielkość genomów mitochondrialnych i chloroplastowych odpowiednio z proteobakteryjnymi i cyjanobakteryjnymi, to okaże się, że są one bardzo zredukowane. Dane oparte na szybko rosnącej liczbie zsekwencjonowanych genomów mitochondrialnych wskazują na to, że organizmy eukariotyczne różnią się liczbą i składem genów kodowanych przez mitochondria. Tylko cztery geny (*cob*, *cox*, *rns*, *rnl*) zidentyfikowano jako wspólne dla wszystkich badanych genomów mitochondrialnych [3]. Największą liczbę genów mitochondrialnych zidentyfikowano u wiciowca *Raclinomonas americana*. Jego genom mitochondrialny obejmuje 97 genów, z czego 67 koduje białka [4]. Można z nim porównać jedynie mitochondrialne genomy roślinne np. *Arabidopsis thaliana*, w którym zidentyfikowano 57 genów kodujących białka, geny rRNA oraz niekompletny zestaw tRNA; ponadto odnotowano obecność wielu ramek odczytu o nieznannej jeszcze funkcji [5]. Szacuje się, że ogólna liczba genów mitochondrialnych w tym organi-

¹ Licencjat biotechnologii, ² dr hab., Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego; Tamka 2, 50-137 Wrocław; e-mail: Janska@bf.uni.wroc.pl

zmie może dochodzić do 100. Należy podkreślić, że liczba genów nie wiąże się bezpośrednio z wielkością genomu. Na przykład genom mitochondrialny *Raclinomonas americana* ma wielkość 69 kpz, a genom *Arabidopsis* 367 kpz. Uważa się, że znaczne rozmiary genomów mitochondrialnych roślin są spowodowane nie tylko obecnością dodatkowych genów, ale również występowaniem dużej liczby sekwencji powtórzonych, jak i sekwencji pochodzenia jądrowego oraz chloroplastowego [5]. Poważną redukcję przeszło mitochondrialne DNA zwierząt [3]. Charakteryzuje się ono obecnością średnio 13 genów kodujących białka, a także niekompletnego zestawu tRNA i rRNA. Z wyjątkiem krótkiego regionu, genom ten odznacza się brakiem sekwencji niekodujących i z tego względu jego rozmiar u zwierząt osiąga tylko 17 kpz [6]. Przykładem skrajnej redukcji genomu mitochondrialnego, a właściwie jego braku, są hydrogenosomy – organelle wytwarzające wodór wykryte u wielu beztlenowych eukariontów. Jedną z hipotez dotyczących ich pochodzenia mówi, że są to wysoce zmodyfikowane mitochondria przystosowane do anaerobowego środowiska [7]. Pozostałością po przodkach są, między innymi, otaczające je podwójne błony i zdolność do syntezy ATP. Hydrogenosomy różnią się od mitochondriów brakiem cytochromów, brakiem cyklu CKTK i oksydatywnej fosforylacji, ale przede wszystkim jednak całkowitą utratą genomu.

W celu określenia stopnia redukcji genomu chloroplastów porównano liczbę białek konieczną do ich prawidłowego funkcjonowania z liczbą białek kodowanych przez genom cyjanobakterii (*Synechocystis* - zawiera 3168 genów kodujących białka) [8]. Na tej podstawie oszacowano, że chloroplasty powinny zawierać około 2000 różnych białek, wliczając również te, które koordynują funkcjonowanie chloroplastów i komórki oraz izoformy enzymów. Tymczasem, obok zestawów rRNA i tRNA, chloroplasty u *Oryza* kodują 76 białek, a u *Arabidopsis* jedynie 31 białek. Geny pozostałe w chloroplastach należą głównie do łańcucha fotosyntetycznego, inne natomiast odpowiadają za transkrypcję i translację, syntezę aminokwasów i kwasów tłuszczowych [8].

Zgodnie z teorią endosymbiotyczną za zredukowanie genomów prokariontów do obecnie istniejącej postaci odpowiadają następujące zjawiska [1, 8]:

- utrata genów odpowiadających za funkcje nieprzydatne nowopowstałemu organellum wewnątrz komórki gospodarza, np. geny kodujące składniki syntezy ściany komórkowej;
- utrata genów występujących jednocześnie w genomie gospodarza i organizmie kolonizującym

- np. szereg genów warunkujących podstawowe funkcje komórkowe (ang. *housekeeping genes*);
- transfer DNA między organellami.

W początkowych etapach ewolucji eukariontów miał miejsce olbrzymi przepływ genów, którego forma była prawdopodobnie odmienna od obecnie stwierdzanych transferów pojedynczych sekwencji [1, 8]. Efektem pierwotnego transferu jest skupienie większości informacji genetycznej w jądrze. Późniejsze zjawiska przenoszenia materiału genetycznego są charakterystyczne dla konkretnego gatunku i mogą być przydatne w badaniach filogenetycznych.

III. Sposoby transferu materiału genetycznego

Błony otaczające organella są strukturami dynamicznymi podlegającymi zmianom podczas życia komórki. Mogą one pączkować, ulegać fuzji i podlegać morfologicznym reorganizacjom. W trakcie tych procesów istnieje szansa ucieczki fragmentów materiału genetycznego przez powstałe miejscowo nieszczelności błony organellów [1]. Fragmenty genomu mogą być także uwalniane w trakcie terminalnej degradacji i lizy organelli przez lizosomy i wakuole. Prawdopodobna jest również fuzja heterotypowych błon umożliwiająca bezpośredni transfer DNA między organellami. Obecność systemów transportujących RNA i białka do wnętrza organelli stwarza również możliwość niewłaściwego ich wykorzystania, tzn. transportu kwasów nukleinowych w przeciwną stronę [1, 8]. Ponieważ przenoszenie materiału genetycznego może zajść za pośrednictwem DNA, jak i RNA, to prawdopodobny staje się udział retrowirusów jako nośników przenoszących je między organellami [9]. Wiele faktów wskazuje na to, że między organellami przenoszone są nie tylko geny lub ich fragmenty, ale również sekwencje niekodujące.

IV. Warunki pomyślnego transferu genów

Sama możliwość uwolnienia i przeniesienia kwasu nukleinowego z jednego organellum do drugiego nie wystarczy, aby można było mówić o funkcjonalnym transferze genów. Ponieważ systemy ekspresji i organizacji genomów różnią się między poszczególnymi organellami, zatem musi dodatkowo wystąpić szereg sprzyjających okoliczności [8, 10-15].

Pierwszym warunkiem jest obecność kilku kopii przenoszonej sekwencji w jej rodzimym przedziale komórkowym. Jeśli transfer się nie powiedzie (lub jeśli przeniesiona sekwencja nie będzie kompletna),

to nie powinno to zagrozić prawidłowemu funkcjonowaniu organizmu. Zarówno chloroplasty, jak i mitochondria, posiadają wiele kopii DNA, a jeśli wziąć pod uwagę przenoszenie z udziałem RNA, to prawdopodobieństwo zaburzenia funkcjonowania organizmu jest jeszcze mniejsze.

Następnie musi zajść fizyczne przeniesienie sekwencji z jednego przedziału komórkowego do drugiego. Mimo kilku przedstawionych wyżej dróg transferu kwasów nukleinowych między organellami, proces ten nie jest do końca wyjaśniony.

Kolejnym etapem jest integracja sekwencji do innego genomu. Nie jest do końca jasne czy zachodzi to w sposób przypadkowy, czy też występują jakieś zasady wyboru odpowiedniego miejsca integracji. Mimo wielu starań, nie ustalono cech charakterystycznych sekwencji otaczających przeniesiony fragment DNA. Prezentowana przez nie różnorodność może być wynikiem przypadkowej integracji lub procesów rearanżacyjnych następujących już po włączeniu obcego elementu. Najważniejszym i krytycznym etapem pomyślnego transferu genu jest nabywanie przez wstawiany fragment DNA odpowiedniej sekwencji promotorowej, regulatorowej, a także sygnałowej, kierującej produkt genu do właściwego przedziału. Jeśli to nie nastąpi, to przeniesiona sekwencja staje się pseudogenem, a następnie ulega całkowitej degeneracji. Proponowane użycie RNA jako nośnika informacji genetycznej między kompartmentami rozwiązuje problem redagowania informacji genetycznej, które musiałyby zostać przeprowadzone w jądrze/mitochondrium [11, 12, 14].

Podczas transferu prawdopodobna jest sytuacja, w której sekwencja przeniesiona nabyła już element promotorowy, lecz nie posiada jeszcze sekwencji sygnałowej. W takim wypadku produkt tego genu znalazłby się w cytosolu wpływając na przebiegające tam procesy. Zależnie od funkcji tego białka w cytoplazmie stan ten może być przejściowy lub jeśli jest to korzystne dla komórki utrzymywać się. Przykładem genów przeniesionych do jądra, których produkty pozostały w cytoplazmie, są enzymy szlaku glikolitycznego i glukoneogenezy u roślin wyższych [8]. Według najnowszych koncepcji pierwotny eukarion — gospodarz prekursorów mitochondriów i chloroplastów — był filogenetycznie spokrewniony z *Archaeobacteria* [2]. W związku z tym uważano, że wymienione wyżej enzymy cytosolowe powinny być pochodzenia archeobakteryjnego, a nie jak się okazało, pochodzenia eubakteryjnego [8]. Sądzi się, że archeobakteryjne enzymy szlaku glikolitycznego i glukoneogenezy zostały zastąpione produktami genów jądrowych pochodzących z pramitochondriów

bądź prachloroplastów. Mało prawdopodobne jest wprowadzenie sekwencji do genomu w taki sposób, aby nastąpiła jej natychmiastowa ekspresja i translokacja produktu do rodzimego przedziału. Bardziej prawdopodobne jest stopniowe nabywanie odpowiednich sekwencji. Jeśli białko, tzn. produkt przeniesionej sekwencji, będzie efektywnie spełniało swoją funkcję, to może nastąpić inaktywacja genu pierwotnego. Taki gen ulegając degeneracji wypada z puli genetycznej.

V. Przykłady transferu materiału genetycznego

Identyfikacja przeniesionych sekwencji ma związek z rozwojem technik molekularnych, a szczególnie z coraz większą liczbą zsekwencjonowanych genomów. Wykrywane są jedynie sekwencje wykazujące znaczny stopień homologii do oryginału. Fragmenty ulegające zmianom są najprawdopodobniej niewykrywane. Dlatego też uważa się, że zjawisko transferu materiału genetycznego między organellami ma miejsce dużo częściej niż świadczą o tym wykrywane homologie [10]. Przytoczone poniżej przykłady transferu, to jedynie nieznacznym odsetek tego zjawiska.

V-1. Transfer z mitochondriów do jądra

Wśród wielu udokumentowanych transferów genów z mitochondrium do jądra, transfer genu kodującego podjednostkę oksydazy cytochromowej (*cox2*) jest interesujący ze względu na to, że na jego przykładzie można prześledzić kolejne etapy transferu w zależności od rozpatrywanej rośliny z rodziny motylkowych [11, 12]. U niektórych przedstawicieli tej rodziny *cox2* znajduje się w genomie mitochondrialnym, a u innych w genomie jądrowym. W grochu gen ten jest obecny zarówno w jądrze, jak i w mitochondrium, lecz tylko wersja mitochondrialna jest transkrybowana. Jest to więc etap, na którym przeniesiona sekwencja nie zdobyła jeszcze promotora. Kolejny stopień na drodze transferu prezentuje soja [12]. W jej genomie jądrowym obecna jest aktywna forma *cox2*. Mimo to mitochondria zawierają jeszcze niefunkcjonalną sekwencję tego genu. Ostatnim etapem transferu jest utrata genu mitochondrialnego i przejęcie wszystkich funkcji przez gen kodowany w jądrze, co możemy obserwować na przykładzie fasolnika chińskiego [11]. Podobne zjawisko można obserwować w przypadku genu kodującego rybosomalne białko S10. W ziemniaku i grochu jest on kodowany przez genom mitochondrialny [13], ale już u

Oenothera berteriana i *Arabidopsis thaliana* jedyna funkcjonalna forma tego genu obecna jest w jądrze [14]. Oznacza to, że transfer *rps10* nastąpił w trakcie ewolucji prowadzącej do powstania tych dwóch gatunków.

Transfery genu kodującego podjednostkę oksydazy cytochromowej u soi i genu kodującego rybosomalne białko S10 u *Arabidopsis* mają pewną cechę wspólną [11-14]. W obu wypadkach sekwencje DNA znalezione w jądrze wykazują wyższy stopień homologii do zredagowanego transkrypty niż do genu mitochondrialnego. Sugeruje to wykorzystanie RNA jako pośrednika między przedziałami. Transfer za pośrednictwem RNA wymaga aktywności odwrotnej transkryptazy w jednym z przedziałów komórkowych. Odwrotna transkrypcja może zachodzić zarówno w mitochondriach, jak i w cytosolu lub w jądrze. Należy jednak pamiętać, że jeśli odwrotna transkrypcja zajdzie w pierwszym przedziale, to nośnikiem informacji między organellami byłby DNA, a nie RNA. Analiza sekwencji genów jądrowych *cox2* i *rps10* wykazała, że w obu wypadkach intron oddziela sekwencję sygnałową od sekwencji homologicznej do mitochondrialnego genu. Teoretycznie możliwe jest dopasowanie zupełnie przypadkowej sekwencji do roli sygnałowej na drodze alternatywnego składania (ang. *splicing*). W tym jednak wypadku położenie intronu sugeruje nabycie N-terminalnego polipeptydu przez przetasowania egzonów (ang. *exon shuffling*) [14].

Inny sposób nabycia sekwencji sygnałowej opisano dla genu *rps11* z ryżu [15]. W rezultacie duplikacji następującej po transferze do jądra, jest on obecny w dwóch kopiach — jako *rps11-1* i *rps11-2*. Obie kopie tego genu poprzedzone są odmiennymi sekwencjami, homologicznymi do sekwencji sygnałowych dwóch różnych genów jądrowych. N-końcowa sekwencja produktu genu *rps11-1* jest homologiczna do polipeptydu sygnałowego podjednostki β syntetazy ATP, natomiast gen *rps11-2* poprzedzony jest sekwencją homologiczną do presekwencji podjednostki Vb oksydazy cytochromowej. Mechanizm uzyskania tych sekwencji nie jest znany. Istnienie w pojedynczym genomie dwóch identycznych presekwencji w dwóch różnych genach sugeruje, że sekwencje sygnałowe mogą być uzyskiwane na drodze duplikacji/rekombinacji. Z analizy przeprowadzonej za pomocą RT-PCR wynika, że mimo obecności dwóch genów *rps11* aktywna jest tylko forma *rps11-1*. *Rps11-2* prawdopodobnie nie posiada sygnałów inicjacji transkrypcji, być może zostały one utracone na drodze ewolucji lub funkcjonują jedynie w niektórych tkankach.

Warto zauważyć, że mitochondria ryżu nadal zawierają transkrybowaną formę genu *rps11* [11]. Jest ona transkrybowana dzięki sekwencjom genów *nad1* i *rps4*, znajdujących się w jej otoczeniu. Mimo to *rps11* zawarty w mitochondriach jest jedynie pseudogenem, ponieważ w 229 pozycji zawiera stop kodon. Ponadto modyfikacje potranskrypcyjne nie tylko nie zmieniają go na kodon sensowny, ale prowadzą do powstania drugiego takiego kodonu w 82 pozycji. Jest to przykład genu inaktywowanego na poziomie transkrypty [15].

Większość opisanych transferów dotyczy sekwencji kodujących, co przemawia za transferem za pośrednictwem RNA. Jednak w genomie jądrowym szczura stwierdzono obecność dwóch sekwencji w 80% homologicznych do niekodującego regionu mitochondrialnego DNA, tzw. D-pętli [9]. Z uwagi na duże podobieństwo tych dwóch fragmentów do siebie sugeruje się, że ich duplikacja nastąpiła już po przeniesieniu do genomu jądrowego. Sekwencja ta nie jest transkrybowana w mitochondrium, wyklucza się zatem udział RNA jako nośnika informacji. Bardziej prawdopodobny jest udział retrowirusa, ponieważ w sąsiedztwie przeniesionych sekwencji znajdują się pozostałości elementów LINE (ang. *long interspersed repetitive element*) oraz odcinki homologiczne do wirusowej odwrotnej transkryptazy i RNAzy H.

Sekwencje homologiczne do mitochondrialnej D-pętli odnaleziono również w jądrowym genomie człowieka [16]. Od momentu ich transferu do jądra ewoluują one z szybkością typową dla innych zawartych w nim sekwencji niekodujących, czyli prawie 40 razy wolniej niż w mitochondrium. Fakt ten wykorzystano w badaniach filogenetycznych mających na celu ustalenie korzeni gatunku ludzkiego [16].

V-2. Transfer z chloroplastów do jądra

U roślin mitochondria nie są jedynymi donorami obcych sekwencji nukleotydowych obecnych w jądrowym genomie. Równie często stwierdza się sekwencje homologiczne do DNA chloroplastów. W 1995 roku porównano sekwencje chloroplastowe, mitochondrialne i jądrowe pochodzące z baz danych i w pobliżu 15 genów jądrowych wykazano 19 niezależnych insercji organellowego DNA o wielkości od 38 do 785 par zasad [17]. W oparciu o te same dane oszacowano, że 3-7% genomu jądrowego roślin tworzą sekwencje pochodzenia organellowego.

Fragmenty homologiczne do DNA chloroplastów są rozrzucone po całym genomie jądrowym, a ich ilość i długość różni się w zależności od gatunku

[17]. Pięć krótkich chloroplastowych fragmentów, niektóre mniejsze niż 60 pz, zidentyfikowano w haploidalnym genomie jądrowym szpinaku [17]. U tytoniu wykryto fragment sekwencji nukleotydowej o wielkości 14 kpz zawierający kompletne geny *trnS*, *tps4*, *trnT*, *trnF*, *psb6*, *ndhG*, *trnV*, *trnM* oraz niekompletne *atpE* i *psaA* [18]. Jest on doskonałym przykładem przeniesienia dużego fragmentu chloroplastowego DNA. Znaczne, bo aż 99% podobieństwo do oryginału, świadczy o tym, że transfer — w ewolucyjnej skali czasu — miał miejsce stosunkowo niedawno. Sekwencja DNA przebywająca dłużej w jądrze uległaby większym zmianom.

Istnieją przykłady przeniesienia do jądra zarówno sekwencji transkrybowanych, jak i nietranskrybowanych w chloroplastach [17, 19]. Zlokalizowano również wiele sekwencji chimerycznych, będących zlepkiem dwóch (lub więcej) indywidualnych fragmentów znacznie od siebie oddalonych w plastydowym DNA. Przypadki te świadczą o tym, że translokacja fragmentów genomu nastąpiła za pośrednictwem DNA.

Jednym z genów pochodzenia chloroplastowego, który po przeniesieniu do jądra utrzymał swą funkcję, jest gen kodujący czynnik elongacyjny uczestniczący w syntezie białka — *tufA* [20, 21]. Obliczono, że procent homologii między chloroplastowym genem pochodzącym z *Chlamydomonas* a jego jądrowym odpowiednikiem z *Arabidopsis* wynosi 77% na poziomie aminokwasów i 67% na poziomie nukleotydów. Przypuszcza się, że gen ten został przeniesiony z genomu chloroplastowego do jądrowego na wczesnym etapie ewolucji *Charophyceae*, jednej z klas zielonych glonów [21]. Na podstawie badań przeprowadzonych nad *Coleochaete orbicularis*, gatunku należącego do tej klasy, stwierdzono, że chloroplastowa forma genu *tufA* jest nadal obecna w tym organellum. W związku z tym sugeruje się, że został on również zachowany w chloroplastach innych gatunków tej klasy, ale funkcje pełnione przez jego produkt są bardzo różnorodne i rzadko związane z syntezą białka.

V-3. Transfer z chloroplastów do mitochondriów

Obecność chloroplastowego DNA w genomach mitochondrialnych została stwierdzona u wszystkich zbadanych roślin wyższych. Dotychczas poznano całą sekwencję tylko jednego genomu mitochondrialnego roślin wyższych, a mianowicie genomu *Arabidopsis thaliana*. Oszacowano, że w genomie tym znajduje się około 1% sekwencji homologicznych do materiału genetycznego chloroplastów [5].

Przyjmuje się, że przeniesienie sekwencji chloroplastowych nie było procesem jednorazowym, lecz następowało stopniowo w czasie ewolucji. Brak sekwencji chloroplastowych w genomie mitochondrialnym glonów i porostnicy wielokształtnej świadczy o tym, że transfer miał miejsce już po rozjeściu się roślin wyższych i niższych [22].

Z różnej długości fragmentów homologicznych do DNA chloroplastów najdłuższy odnaleziono w mitochondriach kukurydzy [23]. Jest to odcinek o długości 12 kpz przejawiający 90% homologii do chloroplastowej sekwencji nukleotydowej zawierającej geny kodujące 16S rRNA, trnI oraz trnV. Większość fragmentów plastydowego DNA obecnych w mitochondriach nie koduje funkcjonalnych genów, ponieważ zostały one uszkodzone przez substytucję zasad, a przede wszystkim przez liczne rearanżacje zachodzące bardzo często w genomach mitochondrialnych. Wyjątkiem są geny tRNA [24, 25]. W zależności od gatunku ich liczba waha się od 5 do 6. Geny *trnN*, *trnM* i *trnW* są aktywne u wszystkich zbadanych jedno- i dwuliściennych roślin, natomiast obecność i aktywność innych plastydowych genów różni się w zależności od gatunku [24]. Wy tłumaczenia tego zjawiska doszukiwano się w odpowiednim otoczeniu sekwencji, nie znaleziono jednak reguł pozwalających określić czy dany gen będzie, czy nie będzie ulegał ekspresji. Z drugiej strony wykazano, że w niektórych przypadkach plastydowy DNA może być źródłem sekwencji promotorowych dla rodzimych genów mitochondrialnych. Dowodem tego jest gen *nad9*, którego miejsca inicjacji transkrypcji znajdują się wewnątrz sekwencji przeniesionej z chloroplastów [26].

V-4. Transfer z jądra do mitochondriów

Transfer genów między mitochondrium i jądrem odbywa się w obydwu kierunkach. Jak dotychczas, w większości genomów jądrowych zsekwencjonowano głównie funkcjonalne geny i regiony znajdujące się w bezpośredniej bliskości sekwencji kodujących. Prawdopodobnie z tego powodu znanych jest więcej przykładów transferów genów, zachodzących w kierunku jądra [27].

Udokumentowano obecność przeniesionych fragmentów genomu jądrowego w mitochondrialnym genomie *Oenothera* [28]. Odcinek zidentyfikowany w genomie *Oenothera* zawiera część sekwencji kodującej 18S rRNA małej podjednostki rybosomu cytoplazmatycznego. W pobliżu znajduje się krótka otwarta ramka odczytu (ORF) o sekwencji wykazującej podobieństwo do odwrotnej transkryptazy.

Prawdopodobnie ORF jest funkcjonalny, ponieważ jego położenie sugeruje udział odwrotnej transkrypcji w wbudowaniu sekwencji jądrowej do genomu mitochondrialnego.

W kontekście transferu sekwencji jądrowych do mitochondrium szczególne zainteresowanie budzą ruchome elementy genomu. Poznanie sekwencji retrotranspozonów oraz sekwencji genomu mitochondrialnego *Arabidopsis* umożliwiło odnalezienie dziewięciu regionów tego genomu homologicznych do trzech klas retrotranspozonów: Ty1/*cop*ia-, Ty3/*gypsy*- i rodziny sekwencji nonLTR/LINE [27]. Mimo, że stwierdzono indywidualne transfery każdego z elementów, to nie ustalano zauważalnych preferencji w wyborze miejsca integracji. Wykazano tylko, że wszystkie umieszczone są w regionach międzygenowych. Zidentyfikowane w genomie mitochondrialnym *Arabidopsis* sekwencje retrotranspozonów nie mogą być aktywne, ponieważ są w znacznym stopniu zdegenerowane — niekompletne, często zawierają dodatkowe kodony stop lub mają zmienioną ramkę odczytu.

Zastanawiająca jest obecność znacznej ilości sekwencji jądrowych retrotranspozonów w mitochondriach *Arabidopsis*. Obejmują one prawie 5% genomu mitochondrialnego, podczas gdy sekwencje pochodzenia chloroplastowego stanowią 1% [27, 29].

V-5. Brak transferu do chloroplastów

Wobec wielocząsteczkowej i zmiennej organizacji roślinnych genomów mitochondrialnych plastydowe DNA wydaje się bardzo zwarte i konserwatywne [30]. Nie znane są przykłady transferu sekwencji nukleotydowych do chloroplastów. Ten przedział komórkowy jest donorem sekwencji w wewnątrzkomórkowym transferze DNA, ale nigdy ich akceptorem. Prawdopodobnie jest to związane właśnie ze skondensowaną i konserwatywną strukturą genomu, która nie dopuszcza do wprowadzenia obcego DNA.

VI. Konsekwencje przeniesienia informacji genetycznej

Znakomitą większość poznanych do tej pory przykładów transferu stanowią sekwencje DNA napływające do jądra. W związku z rozmiarami tego zjawiska można zastanowić się nad korzyściami jakie ono przynosi oraz nad jego ograniczeniami.

Wydaje się oczywiste, że istnieją pewne restrykcje, ponieważ mitochondria i chloroplasty nie straciły całkowicie swojego DNA. Bariery trudnymi do pokonania mogą być różnice w kodzie genetycz-

nym między organellami, trudności z nabyciem możliwości prawidłowej ekspresji i regulacji oraz skierowaniem produktu genu do właściwego organellum. Sugerowano również, że możliwe jest wejście białek kodowanych przez przeniesione geny na drogę wydzielniczą, jeśli będą one syntetyzowane na rybosomach retikulum endoplazmatycznego [1]. Znacznym utrudnieniem transportu, a w konsekwencji zablokowaniem procesu transferu, mogą być hydrofobowe domeny odpowiadające transmembranowym segmentom białek [1]. Obok trudności w transporcie wiąże się to również z problemami z prawidłowym wbudowaniem białka w błonę docelowego organellum. Teorii tej przeczy jednak przeniesienie do jądra genu *cox2* kodującego białko transmembranowe, które zawiera kilka domen hydrofobowych [8, 12]. Inna hipoteza zakłada, że geny kodujące białka kluczowe dla prawidłowego przebiegu procesów bioenergetycznych, muszą pozostać w organellach, ponieważ ich ekspresja jest kontrolowana zmianami potencjału oksydoredukcyjnego [31, 32]. Zmiany te są tak gwałtowne, że tylko obecność genów w organellum zapewnia dostatecznie szybką reakcję. Prawdopodobne jest też, że produkty niektórych genów, jeśli znajdują się w cytoplazmie, mogą niekorzystnie wpływać na żywotność komórki. Na przykład pojawienie się w cytoplazmie cytochromu c jest jednym z pierwszych etapów apoptozy [8].

Mimo wielu ograniczeń i trudności, które musi pokonać sekwencja nukleotydowa istnieją określone przyczyny transferu genów. Zarówno mitochondria, jak i chloroplasty, są przedziałami, w których powstają największe ilości wolnych rodników w komórce. Ze względu na ich mutageny wpływ na pozabawione histonów DNA transfer do jądra wydaje się zjawiskiem korzystnym. Uważa się, że geny odpowiedzialne za funkcje regulatorowe są z większą łatwością akceptowane przez genom jądrowy niż geny odpowiedzialne za funkcje enzymatyczne i strukturalne [8]. Przykładem tego jest chloroplastowa Clp proteaza. U wszystkich badanych roślin regulatorowa podjednostka tego białka znajduje się w jądrze, a katalityczna została w genomie chloroplastowym. Prawdopodobnie dzięki przeniesieniu do jądra genów regulatorowych komórka usprawnia koordynację i regulację procesów zachodzących w różnych organellach.

Na los genów ma również wpływ efekt zapadki Mullera (ang. *Muller's ratchet*). Teoria ta zakłada szybką akumulację mutacji letalnych w populacjach aseksualnych [8]. Gen przechodząc do jądra zmienia sposób dziedziczenia i może brać udział w procesie rekombinacji podczas mejozy. Tym samym zabez-

piecza się przed akumulacją potencjalnie letalnych mutacji. Wpływ efektu zapadki Mullera jest bardziej zrozumiała w przypadku zwierząt, nie może być jednak przeceniany. Udokumentowano bowiem, że wbrew hipotezie Mullera tempo mutacji punktowych u roślin jest większe w genomie jądrowym niż w pozostałych genomach. Wydaje się, że zjawiskiem kompensującym efekt zapadki Mullera jest rekombinacja zachodząca szczególnie często w roślinnych genomach mitochondrialnych.

VII. Podsumowanie

Proces transferu informacji genetycznej wewnątrz komórki nie został jeszcze do końca wyjaśniony. Nie poznano mechanizmów pozwalających pokonać podwójne błony otaczające organella. Otwarty pozostaje również problem integracji i nabycia zdolności do ekspresji. Interesujący jest — jeśli w ogóle możliwy — etap funkcjonowania dwóch genów i ich produktów równocześnie oraz przełączenie aktywności z jednego genu na drugi. Obecnie obserwuje się transfery pojedynczych sekwencji.

Znaczenie i zasięg wewnątrzkomórkowego przenoszenia sekwencji nukleotydowych poznamy zapewne dopiero po zsekwencjonowaniu i porównaniu genomów mitochondrialnych, chloroplastowych i jądrowych u poszczególnych gatunków i w różnych liniach filogenetycznych.

Już po recenzji tej pracy ukazała się publikacja dotycząca sekwencji chromosomu 2 z *Arabidopsis thaliana* [Lin X, Kaul S, Shea T, Benito M, Town C, Fujii C, Manson T, Bowman C, Barnstead M, Feldblyum T, Buell C, Ketchum K, Lee J, Ronning C, Koo H, Moffat K, Cronin L, Shen M, Pai G, Aken S, Umayam L, Tallon L, Gill J, Adams M, Carrere A, Creasy T, Goodman H, Somerville C, Copenhagen G, Preuss D, Nierman W, White O, Eisen J, Salzberg S, Fraser C, Venter J (1999) *Nature* 402: 761-768]. Okazało się, że chromosom ten zawiera sekwencję o długości 270 kbp w 99% identyczną z sekwencją mitochondrialego genomu tej rośliny. Sugeruje to, że około 75% genomu mitochondrialnego *A. thaliana* zostało niedawno przeniesione do jądra. Wykrycie tak długiej insercji autorzy określają jako nie spodziewane.

Artykuł otrzymano 17 listopada 1999 r.
Zaakceptowano do druku 6 kwietnia 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Thorsness PE, Weber ER (1996) *Int Rev Cytol* 165: 207-234
2. Gray MW (1992) *Int. Rev Cytol* 141: 233-357
3. Palmer JD (1997) *Nature* 387: 454-455
4. Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray M (1997) *Nature* 387: 493-497
5. Unsel M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997) *Nature genetics* 15: 57-61
6. Bonen L (1991) *Curr Genet Dev* 1: 515-522
7. Palmer JD (1997) *Science* 275: 790-791
8. Martin W, Herrmann RG (1998) *Plant Physiol* 118: 9-17
9. Zullo S, Sieu LC, Slightom JL, Hadler HI, Eisenstadt JM (1991) *J Mol Biol* 221: 1223-1235
10. Brennicke A, Grohmann L, Hiesel R, Knoop V, Schuster W (1993) *FEBS Lett* 325: 140-145
11. Nugent JM, Palmer JD (1991) *Cell* 66: 473-481
12. Covallo PS, Gray MW (1992) *EMBO J* 11: 3815-3820
13. Knoop V, Ehrhardt T, Latting K, Brennicke A (1995) *Curr Genet* 27: 559-564
14. Wischmann C, Schuster W (1995) *FEBS Lett* 374: 152-156
15. Kodowaki K, Kubo N, Ozawa K, Hirai A (1996) *EMBO J* 15: 6652-6662
16. Zischler H, Geisert H, van Haeseler A, Puabo S (1995) *Nature* 378: 489-492
17. Ayliffe MA, Scott NS, Timmis JN (1998) *Mol Biol Evol* 15: 738-745
18. Ayliffe MA, Timmis JN (1992) *Mol Gen Genet* 236: 105-112
19. Martin W, Stoebe B (1998) *Nature* 393: 162-165
20. Baldauf SL, Palmer JD (1990) *Nature* 344: 262-265
21. Baldauf SL, Manhart JR, Palmer JD (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5317-5321
22. Kanno A, Nakazono M, Hirai A, Kameya T (1997) *Curr Genet* 32: 413-419
23. Nakazono M, Hirai A (1993) *Mol Gen Genet* 236: 341-346
24. Fey J, Dietrich A, Cosset A, Desprez T, Marchal-Drouard L (1997) *Curr Genet* 32: 358-360
25. Miyata S, Nakazono M, Hirai A (1998) *Curr Genet* 34: 216-220
26. Nakazono M, Nishiwaki S, Tsutsumi N, Hirai A (1996) *Mol Gen Genet* 252: 371-378
27. Knoop V, Unsel M, Marienfeld J, Brandt P, Sunkel S, Ullrich H, Brennicke A (1996) *Genetics* 142: 579-585
28. Schuster W, Brennicke A (1987) *EMBO J* 6: 2857-2863
29. Brennicke A, Klein M, Binder S, Knoop V, Grohmann L, Malek O, Marchfelder A, Marchfelder J, Unsel M (1996) *Naturwissenschaften* 83: 339-346
30. Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun CR, Meng BY (1989) *Mol Gen Genet* 217: 185-194
31. Allen FJ (1993) *J Theor Biol* 165: 609-631
32. Race HL, Herrmann RG, Martin W (1999) *Trends Genet* 15: 364-370

Dendrymery — nie takie zwyczajne polimery

Dendrimers — not so common polymers

DARIUSZ M. DOMAŃSKI*, MIŁOSZ A. FABER**

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Synteza dendrymerów klasy PAMAM
- III. Strategie syntezy dendrymerów
 - III-1. Synteza rozbieżna (*Divergent*)
 - III-2. Synteza zbieżna (*Convergent*)
 - III-3. Inne strategie syntezy
- IV. Właściwości dendrymerów
- V. Dendrymery optycznie czynne
 - V-1. Dendrymery zawierające stereogenny rdzeń
 - V-2. Dendrymery z chiralną powierzchnią
 - V-3. Dendrymery zawierające centra stereogenne w całej swojej strukturze
- VI. Dendrymery zawierające atomy pierwiastków metalicznych
 - VI-1. Nanokompozyty dendrymerowe
 - VI-2. Dendrymery metaloporfirynowe
- VII. Glikodendrymery
- VIII. Dendrymery kwasów nukleinowych
- IX. Transfer genów
- X. Skuteczność transfekcji
- XI. Cytotoksyczność
- XII. Perspektywy badań nad dendrymerami

Contents:

- I. Introduction
- II. Synthesis of PAMAM dendrimers
- III. Strategies of dendrimer synthesis
 - III-1. Divergent approach
 - III-2. Convergent approach
 - III-3. Other strategies
- IV. Properties of dendrimers
- V. Optically active dendrimers
 - V-1. Dendrimers with stereogenic core
 - V-2. Dendrimers with chiral surface
 - V-3. Dendrimers with stereogenic centers in various parts of their structure
- VI. Dendrimers with metal atoms
 - VI-1 Dendritic nanocomposites
 - VI-2 Metaloporphyrin dendrimers
- VII. Glycodendrimers
- VIII. Nucleic acid dendrimers
- IX. Transfer of genes
- X. Efficiency of transfection
- XI. Cytotoxicity
- XII. Future of dendrimers research

Wykaz skrótów: DAB — 1,4 diaminobutan; DEAE — dekstran — dietyloaminoetylo-dekstran; EDA — etylenodiamina; ESI — ang. *electron spectroscopic image*; PAMAM — dendrymer poliamidoaminowy; SDS — siarczan dodecyłu sodu; TAEA — tris(2-aminoetylo)amina; TRIS — 2-amino-(hydroksymetylo)-1,3 propanodiol

I. Wstęp

Dendrymery są nową, niezwykle interesującą rodziną polimerów o architekturze makromolekularnej, zwaną gęstą gwiazdą (ang. *dense star*). Częsteczki dendrymerów, inaczej niż klasyczne polimery, posiadają bardzo wysoki stopień jednolitości, specyficzny rozmiar i kształt oraz wysoką gęstość wysycenia powierzchni grupami funkcyjnymi.

Idea tworzenia silnie rozgałęzionych molekuł oraz przewidywanie ich niezwykłych właściwości pochodzi od F l o r y, laureata nagrody Nobla z roku 1974, zajmującego się syntezą polimerów liniowych. Niestety dostępne wtedy techniki syntezy i analizy otrzymywanych związków nie były na tyle zaawansowane, by można było pokusić się o syntezę polimerów o wyrafinowanych właściwościach. Dopiero w roku 1978 V o g t l e poinformował o istnieniu pierwszej cząsteczki dendrymeru, jednakże prace jego natrafiły na sporo problemów. Mniej więcej w tym samym czasie D e n k e w a l t e r użył naturalnie występującego aminokwasu lizyny do tworzenia pierwszych dendrymerów [1]. Prawdziwy przełom i znaczny wzrost zainteresowania dendrymerami nastąpił w roku 1985, po publikacjach T o m a l i i [2] i N e w k o m e [3].

Historia odkrycia dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) była w pewnej mierze dziełem przypadku. Podczas standardowej syntezy polimeru typu kłęбка statystycznego, zbudowanego z dwóch

*Mgr, **dr; Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytetu Łódzkiego, ul. St. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

monomerów, akrylanu metylu ($C_4H_6O_2$) i etylenodiaminy ($C_2H_8N_2$), Tomalia, aby ułatwić mieszanie się reagentów, wprowadził do układu również metanol. Wbrew wcześniejszym przewidywaniom okazało się, że dodany rozpuszczalnik modyfikował jednak przebieg reakcji, ułatwiając wymianę atomów wodoru pochodzących od grup aminowych etylenodiaminy, na akrylan metylu. Otrzymany produkt wywołał spore zdziwienie badaczy, gdyż nie wykazywał podobieństwa do polimerów liniowych syntetyzowanych wcześniej tą metodą [2].

II. Synteza dendrymerów klasy PAMAM

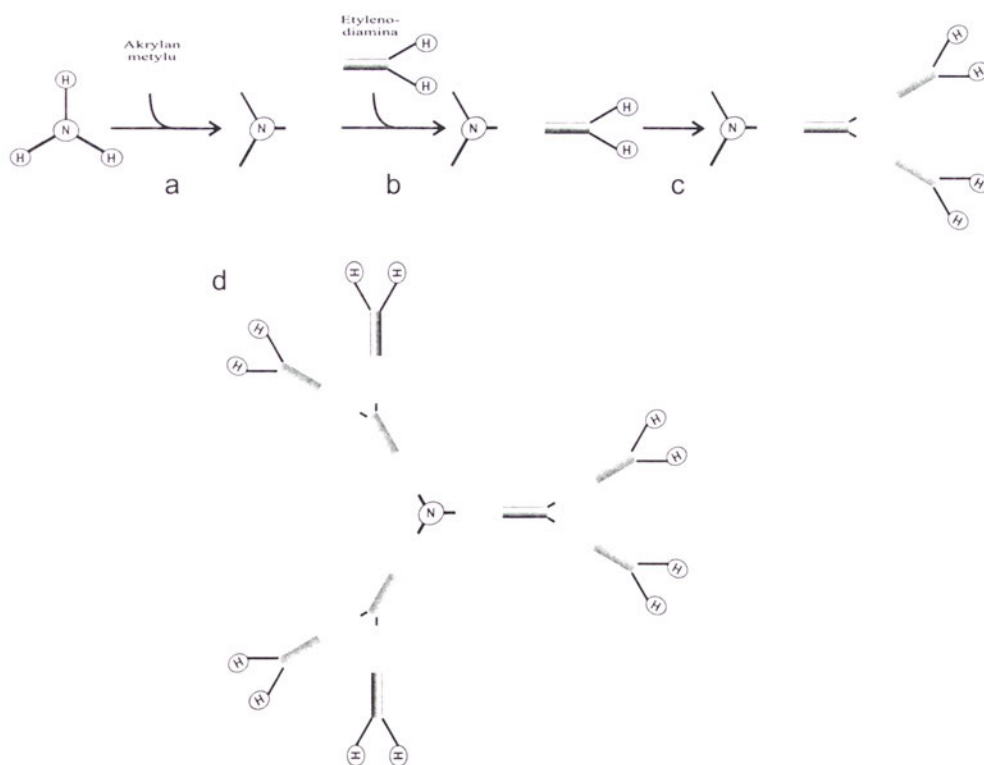
Do cząsteczek amoniaku (NH_3) dodano akrylan metylu oraz metanol ułatwiający podstawienie wszystkich trzech atomów wodoru grupami akrylanometylowymi. Następnie do układu wprowadzono drugi monomer etylenodiaminę, wiążącą się z wolnymi końcami grup akrylanometylowych. Teraz grupy aminowe (NH_2) etylenodiaminy stanowią swobodne zakończenia trzech gałęzi powstającej cząsteczki, co sprawia, że już sześć atomów wodoru, zamiast początkowych trzech, może ulegać podstawieniu monomerami akrylanometylowymi (Ryc. 1). Podczas przyrostu kolejnych warstw dendrymeru (generacji), masa cząsteczki zwiększa się około dwukrotnie, natomiast liczba powierzchniowych

grupek osiągnięcia średnicy około 130 Å, co ma miejsce w generacji dziesiątej (G10), niemożliwy jest już dalszy przyrost cząsteczki. Rozkład masy w cząsteczce nie jest dokładnie poznany. Na podstawie aktualnie istniejących hipotez można się pokusić jedynie o stwierdzenie, że środek masy znajduje się gdzieś pomiędzy rdzeniem a powierzchnią dendrymeru [4].

Obecnie oprócz cząsteczki amoniaku (NH_3), jako rdzeń stosuje się także etylenodiaminę (EDA), tris(2-aminoetylo)aminę (TAEA) lub cząsteczkę D-glukozy, co wpływa na zmianę niektórych parametrów opisujących cząsteczkę [5]. Dane dotyczące średnic, zawartości powierzchniowych grup funkcyjnych oraz mas cząsteczkowych kolejnych generacji dendrymerów zbudowanych wokół różnych typów cząsteczek rdzeniowych przedstawione zostały w tabeli 1. Zestawione dane nie są ze sobą całkowicie spójne, co tłumaczyć można skąpą liczbą opublikowanych dotychczas doniesień naukowych oraz różnymi warunkami wykonywania oznaczeń. Odnosi się to w szczególności do średnic cząsteczek dendrymerów.

III. Strategie syntezy dendrymerów

Od narodzin pierwszego dendrymeru do dnia dzisiejszego wypracowano kilka różnych strategii syn-



Ryc.1. Synteza dendrymeru poli-amidoaminowego PAMAM: a) do cząsteczki amoniaku dołączany jest pierwszy z monomerów — akrylan metylu, b) dołączenie drugiego monomeru — etylenodiaminy, c) atomy wodoru wymieniane zostają na akrylan metylu, co powoduje dalszy przyrost gałęzi dendrymeru, d) druga generacja dendrymeru typu PAMAM

grup aminowych wzrasta dokładnie dwukrotnie. Średnica cząsteczki przyrasta o około 10 Å. Gęstość upakowania gałęzi wzrasta tak znacznie, że w mo-

tezy cząsteczek tego typu. Mając na uwadze charakter niniejszego opracowania, ograniczymy się do dokładniejszego omówienia jedynie dwóch podsta-

Tabela 1Podstawowe parametry cząsteczek dendrymerów klasy PAMAM, zawierających różne rodzaje rdzeni (NH₃, EDA, TAEA) [5].

Generacja dendrymeru	NH ₃			EDA			TAEA		
	Mcz	Średnica [C]	Liczba GP	Mcz	Średnica [C]	Liczba GP	Mcz	Średnica [C]	Liczba GP
0,0	359	10,8	3	-	-	4	-	-	-
1,0	1043	15,8	6	-	-	8	-	-	-
1,5	2173 ^a	36,2 ^a	6 ^a	2935	-	8	-	-	-
2,0	2411	22,0	12	3256	-	16	-	-	-
2,5	4671 ^a	48,3 ^a	12 ^a	6011	-	16	-	-	-
3,0	5147	31,0	24	6909	-	32	-	-	-
3,5	9668 ^a	66,1 ^a	24 ^a	12419	-	32	-	-	-
4,0	10619	40,0	48	14125 _b	50 ^b	64 ^b	10401 ^b	-	48 ^b
4,5	19661 ^a	87,9 ^a	48 ^a	25234	-	64	-	-	-
5,0	21563	53,0	96	28788 _b	-	128 ^b	21345 ^b	53 ^b	96 ^b
5,5	39648 ^a	103,9 ^a	96 ^a	-	-	-	-	-	-
6,0	43451	67,0	192	57972 _b	60 ^b	256 ^b	43233 ^b	64 ^b	192 ^b
6,5	79621 ^a	126,8 ^a	192 ^a	-	-	-	-	-	-
7,0	87227	80,0	384	-	-	512 ^b	-	-	-
7,5	159568 ^a	147,3 ^a	384 ^a	-	-	-	-	-	-
8,0	174779	92,0	768	23338 _{3^b}	-	1024 ^b	-	-	-
8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9,0	349883	105,0	1536	-	-	2048	-	-	-
9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,0	700091	124,0	3072	-	-	4096	-	-	-

Liczba GP – liczba grup powierzchniowych; ^aOttaviani MF, Bossmann S., Turro NJ, Tomalia DA (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 2, 661-671; ^bTang MX, Redemann CT, Szoka FC Jr (1996) *Bioconjugate Chem.* 7, 703-714

wowych, historycznie najstarszych metod oraz zasygnalizowania istnienia pozostałych, odsyłając zainteresowanych czytelników do literatury poświęconej tematowi.

III-1. Synteza rozbieżna (*Divergent*)

Wzrost cząsteczki następuje od centralnie położonego rdzenia, w kierunku zewnętrznym. Kolejne warstwy dendrymeru tworzone są poprzez szereg następujących po sobie reakcji przyłączania i aktywacji monomerów (Ryc. 2). Metoda ta dzięki szybkości i łatwemu wzrostowi liczby grup funkcyjnych, jest idealnym sposobem syntezy szczególnie dendrymerów wyższych generacji, jednakże niemo-

żliwe jest uzyskanie dendrymeru zawierającego różne typy terminalnych grup funkcyjnych w różnych rejonach cząsteczki.

III-2. Synteza zbieżna (*Convergent*)

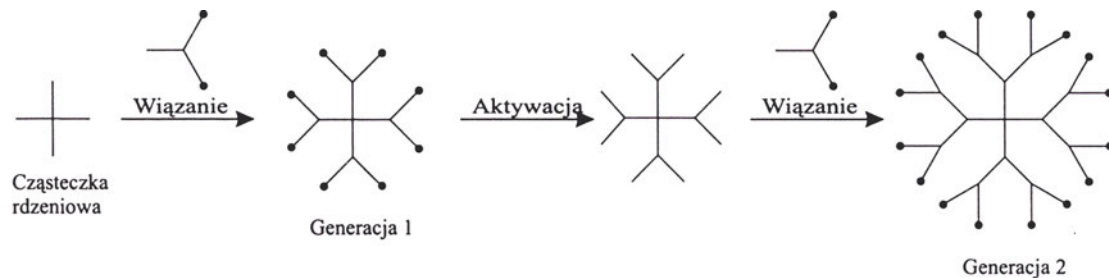
Do wybranej grupy końcowej dobudowywany jest fragment gałęzi w ten sposób, aby pozostała tylko jedna reaktywna grupa funkcyjna mogąca służyć do wiązania z innymi, identycznie zsyntetyzowanymi podjednostkami dendrymeru (monodendronami).

Mała liczba możliwych reakcji ubocznych sprawia, że powstająca cząsteczka pozbawiona jest ułomności strukturalnych, poza tym możliwe jest

kontrolowanie rodzaju i położenia grup funkcyjnych w obrębie całego dendrymeru (Ryc. 3).

III-3. Inne strategie syntezy

W celu uproszczenia i przyspieszenia syntezy, a także by ułatwić oczyszczanie ostatecznego produktu, opracowano między innymi, strategię dwustop-

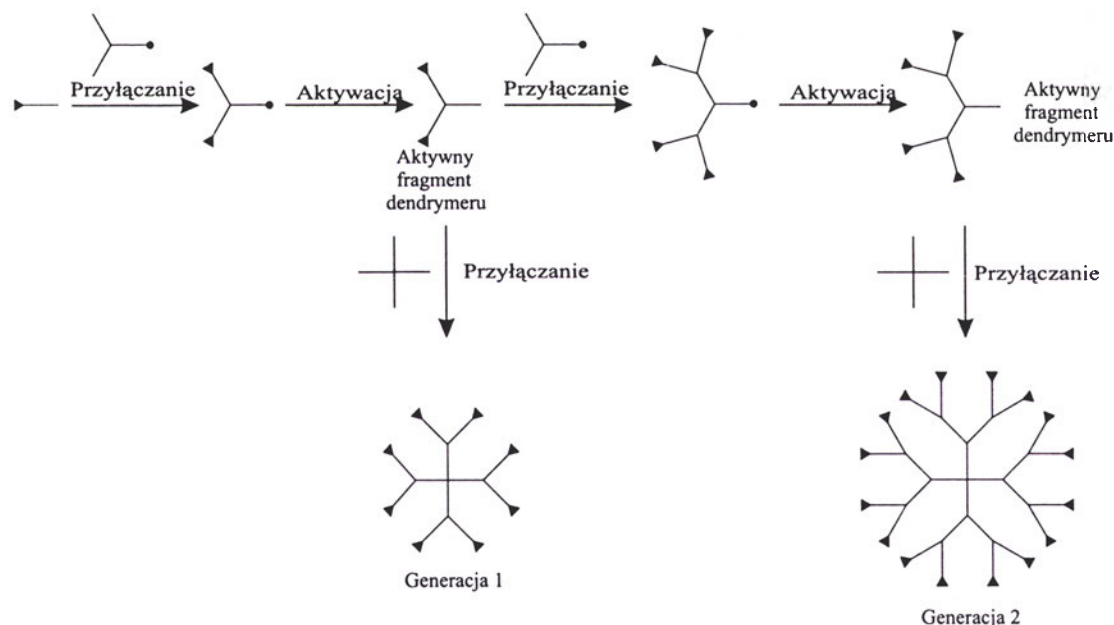


Ryc. 2. Strategia syntezy rozbieżnej — wzrost następuje od cząsteczki rdzenia w kierunku zewnętrznym.

niowego rozbieżnego wzrostu hiperrdzenia, strategię przyłączania rozgałęzionych monomerów oraz strategię użycia dwóch monomerów [6]. Bardzo ciekawą koncepcję budowy dendrymeru przedstawił wraz ze

Dendrymery będące w stanie stałym lub stopionym posiadają zazwyczaj kształt sferyczny lub przepodobny, w roztworach natomiast przyjmują przeważnie kształt sferyczny [10]. Dendrymery poliamidoaminowe niższych generacji charakteryzują się otwartą strukturą i dyskopodobnym kształtem. Począwszy od generacji trzeciej ich kształt przechodzi z otwartego w sferyczny, a struktura z każdą ko-

lejną generacją staje się coraz bardziej zwarta [11]. Rodzaj rozpuszczalnika, w którym znajdują się cząsteczki dendrymerów, często bardzo silnie wpływa na strukturę całej cząsteczki. Istnieją roz-



Ryc.3. Strategia syntezy zbieżnej — do grupy końcowej dobudowywany jest fragment gałęzi w ten sposób, aby pozostała tylko jedna reaktywna grupa funkcyjna służąca do wiązania z innymi podobnymi gałęziami.

swoim zespołem B r a a m [7], syntetyzując, podobnie jak T o m a l i a [8], polimer liniowy, w którym łańcuchy boczne zastąpione zostały cząsteczkami dendrymerów (Ryc. 4).

IV. Właściwości dendrymerów

Niezwykle właściwości dendrymeru wynikają między innymi z ich struktury morfologicznej, właściwości monomerów budujących dendrymer oraz rodzaju terminalnych grup funkcyjnych, od których bardzo często zależy zachowanie całej cząsteczki [9].

puszczalniki, w których dendrymery rozwijają swoją strukturę, oraz rozpuszczalniki sprawiające, że cząsteczka dendrymeru przyjmuje formę zwartą, utrudniając tym samym dostęp do swego wnętrza. (Ryc. 5) [7].

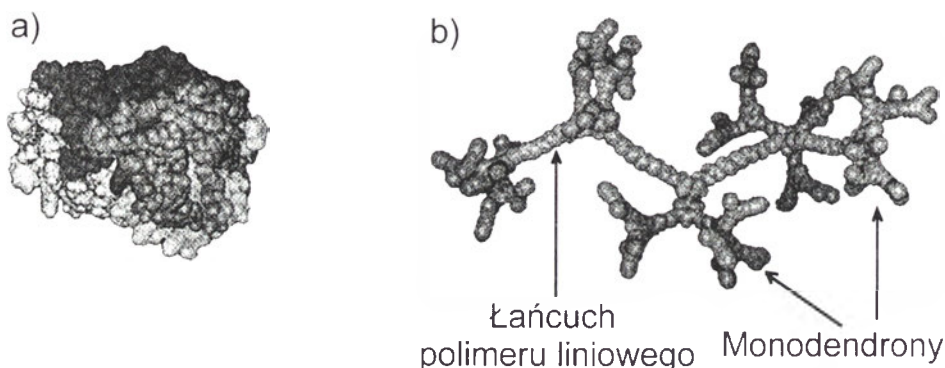
Dendrymery zbudowane są z warstw gałęzi wyrastających z umieszczonej centralnie cząsteczki rdzenia. Budowa taka sprawia, że w peryferyjnej części cząsteczki gałęzie są bardzo ciasno upakowane, podczas gdy wewnątrz pozostaje sporo miejsca, które można wykorzystać do przenoszenia mniejszych molekuł (Ryc. 6). Pewien problem stanowi kontrolowane otwieranie i zamykanie przestrzeni wewnątrz

dendrymeru tak, aby możliwe było wykluczenie przypadkowego uwalniania przenoszonych substancji.

Pierwsza udana próba zamknięcia mniejszych cząsteczek wewnątrz dendrymeru poczyniona została przez zespół M e i j e r a, który jako czynnik zamykający zastosował odpowiednio przygotowane aminokwasy [12]. We wnętrzu dendrymerów PAMAM przenoszono jednocześnie 4 molekuly barwnika różu bengalskiego oraz od 1 do 8 molekul

nu, jako grup terminalnych, zamykających wnętrza dendrymerów polipropylenoiminowych. Naświetlanie światłem o długości fali wynoszącej 313 nm powodowało przechodzenie azobenzenu z konformacji przestrzennej *cis* do konformacji *trans* (Ryc. 7), odblokowując tym samym dostęp do wnętrza dendrymeru. Zjawisko to było w pełni odwracalne pod wpływem światła o długości 254 nm [15].

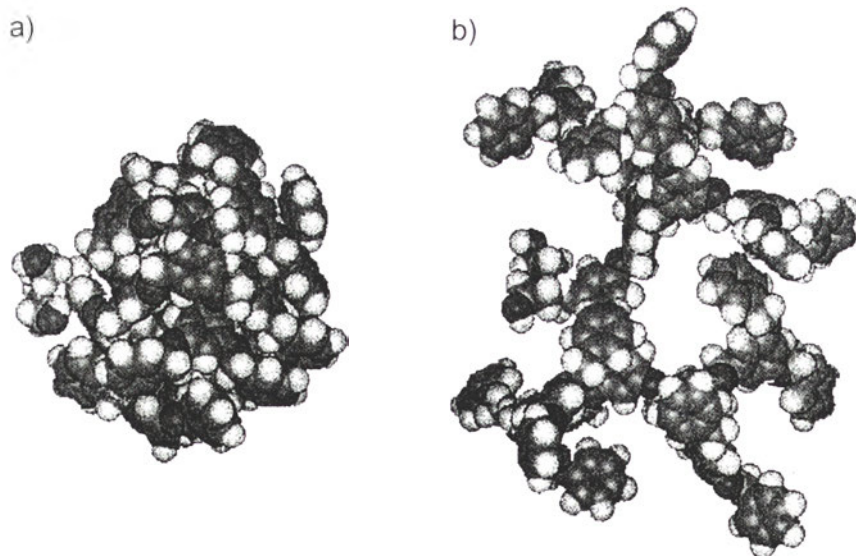
Obecnie czynione są próby wykorzystania wolnych przestrzeni wewnątrz cząsteczki dendrymeru



Ryc. 4. W polimerze liniowym łańcuchy boczne zastąpione zostały przez fragmenty dendrymerów. a) polimer w stanie zwiniętym b) cząsteczka nie skondensowana.

kwasu *p*-nitrobenzenowego. Cząsteczki fenyloalany, zamykające dostęp do wnętrza dendrymeru, zostały usunięte po spełnieniu swojej funkcji w wyniku kwaśnej hydrolizy [13]. S e e b a c h i jego współpra-

podczas procesu oczyszczania wód, ekstrakcji produktów farmaceutycznych z tanków fermentacyjnych, selektywnej enkapsulacji leków, w transporcie substratów chemicznych do reakcji polimeryzacji



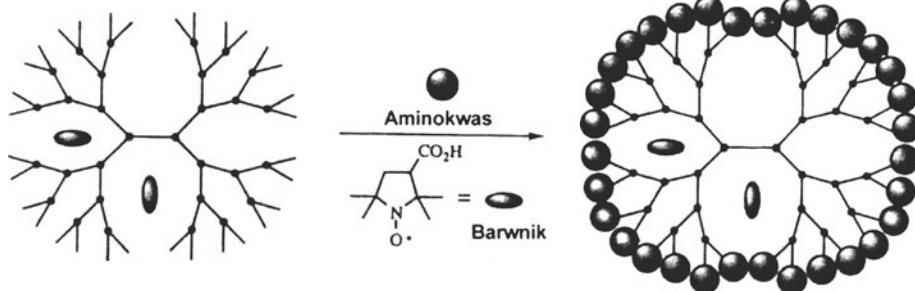
Ryc. 5. Rodzaj rozpuszczalnika silnie wpływa na strukturę przestrzenną dendrymeru: a) dostęp do wnętrza cząsteczki zamknięty dzięki oddziaływaniu rozpuszczalnika, b) wnętrza cząsteczki dendrymeru wyeksponowane w rozpuszczalniku innego typu.

cownicy, sprawdzając stabilność jednego z zsyntetyzowanych przez siebie dendrymerów w środowisku zawierającym różnego rodzaju hydrolazy, zaobserwowali możliwość kontrolowanego degradowania cząsteczek dendrymeru przez lipazy, proteazy i esterazy [14].

Bardzo obiecujące wydaje się być użycie przez V o g t l e i współpracowników cząsteczek azobenze-

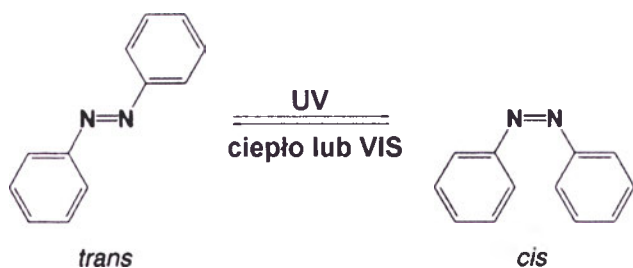
prowadzonej w środowisku ciepłego dwutlenku węgla, będącego w stanie nadkrytycznym. W hydrofilowym dendrymerze czwartej generacji typu DAB-*dendr*-(NH₂)₃₂ terminalne grupy aminowe zostały zastąpione w około 90% przez łańcuchy perfluoropolietrowe o wzorze OC-CF(CF₃)-O-(CF₂-CF(CF₃)-O)₅-CF₂CF₂CF₃. Tak przygotowany dendrymer stał się praktycznie nierozpuszczalny w wo-

dzie, w większości rozpuszczalników nieorganicznych, a także w takich rozpuszczalnikach jak: metanol, chlorek metylenu, tetrahydrofuran, chloroform czy aceton. W temperaturze pokojowej, pod ciśnieniem 76 atmosfer dendrymer wykazywał jednak rozpuszczalność w ciekłym dwutlenku węgla. Micele dendrymerowe tego rodzaju mogą przenosić oranż metylowy (barwnik o charakterze jonowym rozpusz-



Ryc. 6. Niektóre dendrymery mogą przenosić w swym wnętrzu mniejsze cząsteczki. Po umieszczeniu dendrymerów w roztworze barwnika dostęp do ich wnętrza można zamknąć przez przyłączenie aminokwasów.

czalny w CO₂) z roztworu wodnego do ciekłego dwutlenku węgla. Mechanizm tego procesu nie jest jeszcze precyzyjnie poznany, aczkolwiek autorzy pracy widzą możliwość zastąpienia ogromnych ilości rozpuszczalników organicznych zużywanych w laboratoriach, poprzez odpowiednio zaprojektowane systemy ekstrakcyjne oparte na zastosowaniu dendrymerów i ciekłego CO₂ [16].



Ryc. 7. Azobenzen zmienia swoją konformację przestrzenną pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego. Proces ten jest w pełni odwracalny.

V. Dendrymery optycznie czynne

Wprowadzenie chiralnych elementów do struktury dendrymeru powoduje powstanie niesymetrycznych, niesferycznych cząstek posiadających chiralną powierzchnię oraz chiralne przestrzenie wewnątrzcząsteczkowe. Zbudowane w ten sposób cząsteczki można wykorzystać na przykład do selektywnego wiązania enancjomerów określonego typu. Podczas asymetrycznej katalizy chiralna powierzchnia dendrymeru może służyć jako egzoreceptor, zaś wewnątrz jako chiralny endoreceptor [17].

Chiralne właściwości dendrymeru mogą pochodzić z różnych obszarów cząsteczki: z chiralnych grup terminalnych, chiralnego rdzenia, chiralnych gałęzi budujących dendrymer lub kombinacji tych możliwości [18].

Thomas i Thor [19] zaproponowali podział dendrymerów optycznie czynnych na trzy główne klasy:

1. dendrymery ze stereogennym rdzeniem,
2. dendrymery z chiralną powierzchnią,
3. dendrymery zawierające centra stereogenne w całej swojej strukturze

V-1. Dendrymery zawierające stereogeny rdzeń

Wszystkie obecnie znane dendrymery tego typu zawierają element chiralny dokładnie w swoim rdzeniu (Ryc. 8a). Można przewidywać także stworzenie innych rodzin dendrymerów, gdzie stereogeny monomer zostaje wyparty podczas przyłączania kolejnych warstw z rdzenia na peryferie cząsteczki (Ryc. 8b) lub gdzie rdzeń zawiera więcej niż jeden chiralny monomer (Ryc. 8c).

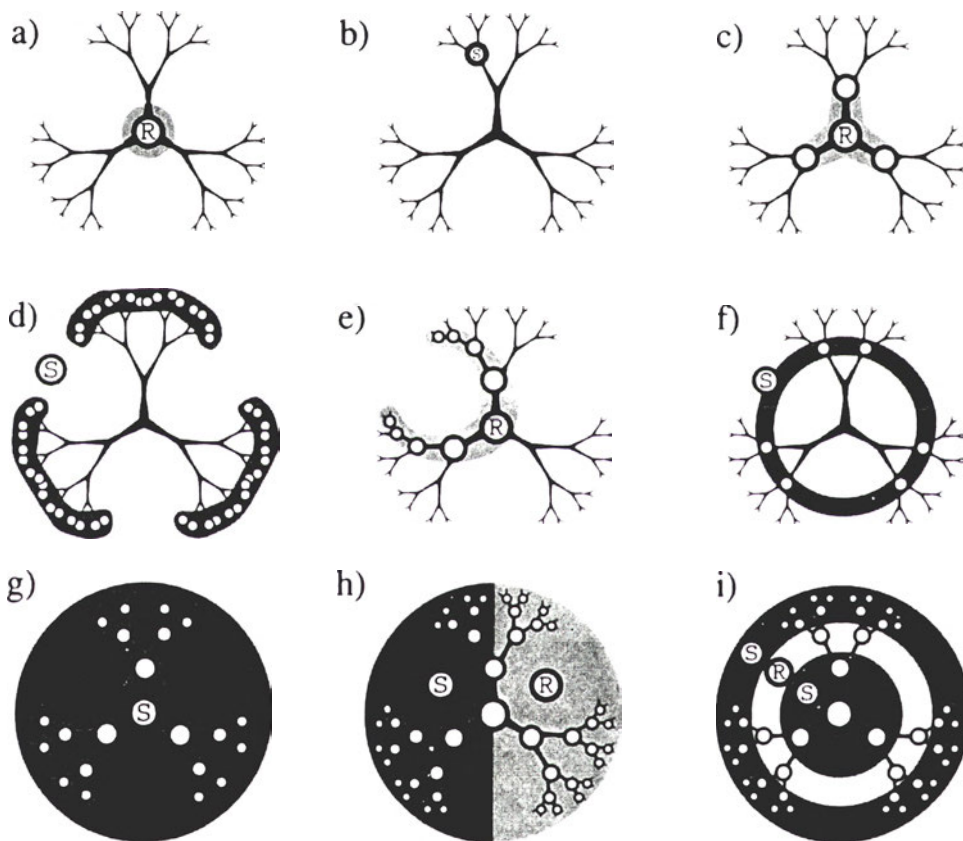
Seebach wraz ze swoim zespołem zaobserwował w dendrymerach gdzie cząsteczkę rdzenia stanowiły różne pochodne tris(hydroksymetylo) metanu, zjawisko stopniowego maskowania aktywności optycznej rdzenia poprzez otaczające go nieczynne optycznie gałęzie. Praktycznie już w trzeciej generacji obserwowana aktywność optyczna spadała do zera [20].

V-2. Dendrymery z chiralną powierzchnią

Najprostszym sposobem uzyskania tego typu molekuli jest modyfikacja niechiralnego dendrymeru poprzez przyłączenie chiralnych elementów do powierzchni ostatniej jego warstwy (Ryc. 8d). Dołączanie kolejnych warstw, tym razem achiralnych, może doprowadzić do sytuacji, gdy chiralna warstwa otoczona będzie warstwami achiralnymi (Ryc. 8f).

V-3. Dendrymery zawierające centra stereogenne w całej swojej strukturze

Niektóre możliwe rodzaje dendrymerów zawierających chiralne monomery w całej swojej strukturze przedstawione są na rycinach 8g-i. Uwidocznione są tam dendrymery, w których wszystkie monomery posiadają taką samą konfigurację absolutną (Ryc. 8g), oraz dendrymery zbudowane z bloków, plasterków lub generacji monomerów o różnych konfiguracjach absolutnych (Ryc. 8h-8i). Jednolitą powierzchnią chiralną mogą tworzyć także elementy rozmieszczone w sąsiadujących ze sobą gałęziach (Ryc. 8e) [19].



Ryc. 8. Dendrymery wykazujące aktywność optyczną mogą zawierać centra stereogenne w różnych miejscach swojej struktury (szczegółowy opis w tekście).

W roku 1998 grupa pod kierownictwem Meijera zaproponowała syntezę chiralnego dendrymeru poprzez przyłączenie do cząsteczki rdzenia gałęzi pochodzących od różnych generacji dendrymeru (Ryc. 9) [18].

VI. Dendrymery zawierające atomy pierwiastków metalicznych

Wprowadzenie atomów metali do struktury dendrymeru prowadzi do powstawania cząsteczek o różnych, często bardzo interesujących właściwościach. Kilka dotychczas zsyntetyzowanych metalodendrymerów opisanych zostało poniżej.

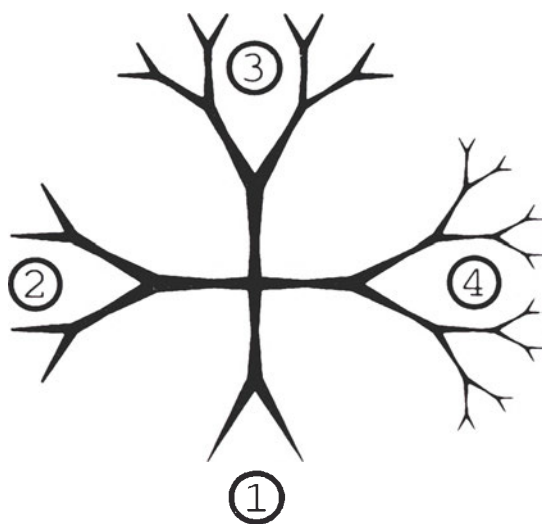
VI-1. Nanokompozyty dendrymerowe

Trudności w konstruowaniu nanokompozytów o precyzyjnie zdefiniowanych rozmiarach i właściwościach stanowią główne ograniczenie rozwoju współczesnej nanotechnologii. Wydaje się więc, że użycie dendrymerów charakteryzujących się idealnie powtarzalnym, pozbawionym defektów kształtem może okazać się obiecującym kierunkiem rozwoju tej dziedziny.

Balogh i Tomalia donieśli niedawno o stworzeniu nanokompozytu opartego o powierzchniowo modyfikowany dendrymer PAMAM, który kompleksowano jonami dwuwartościowej miedzi

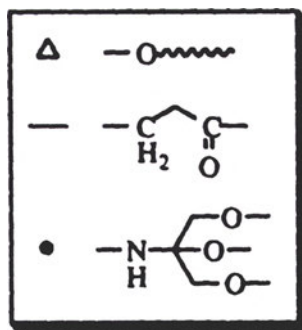
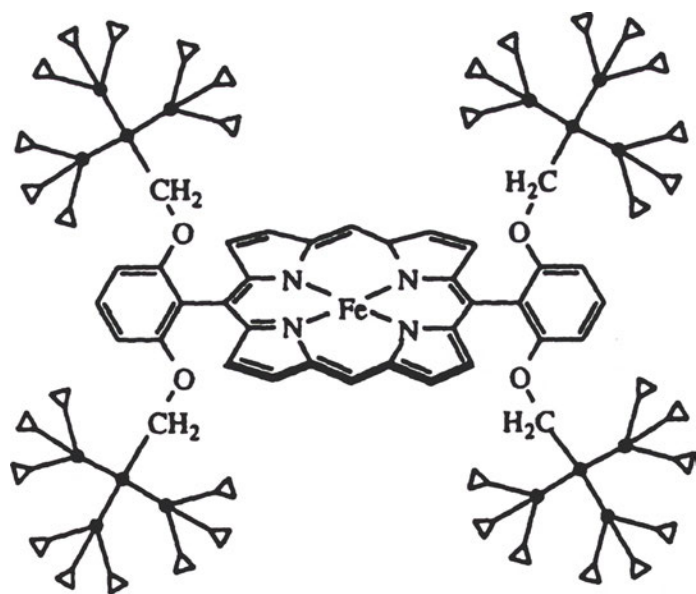
(Cu^{2+}), w wyniku czego obserwowano przyłączenie metalicznych domen o rozmiarach znacznie mniejszych od rozmiarów dendrymeru [21]. Nie ustalono jednak, czy domeny te tworzyły się na powierzchni, czy wewnątrz cząsteczki dendrymeru. Kompleks ten wykazywał niezwykle dużą trwałość, sięgającą w warunkach beztlenowych 90 dni, niezależnie od tego czy znajdował się on w roztworze metanolu czy wody. Badacze przewidują możliwość zastosowania metalicznych nanokompozytów dendrymerowych w optoelektronice, do budowy półprzewodników, w usuwaniu skażeń środowiska naturalnego lub jako katalizatorów.

Tilley i współautorzy poinformowali o syntezie metalodendrymerów polikationowych, powstałych przez zastąpienie podstawników benzyloowych dendrymeru węglorkrzemianowego przez jony rutenu (Ru^+) [22].



Ryc. 9. Możliwa jest konstrukcja dendrymeru optycznie czynnego, w którym źródłem chiralności są gałęzie pochodzące z różnych generacji dendrymeru.

Grupa Reinholdta przeprowadziła udaną syntezę dendrymeru zawierającego w swej strukturze jony dwuwartościowego palladu (Pd^{2+}). Opanowano tworzenie trzeciej generacji dendrymeru opie-



Ryc. 10. Dendrymery żelazoporfirynowe wykazują podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do związków hemowych pochodzenia naturalnego.

rając się o reakcje samoorganizacji monomerów [23].

Balzani i jego współpracownicy zsyntetyzowali metalodendrymery zawierające metale grup

przejściowych w każdej generacji, poprzez przyłączanie do metalicznego rdzenia kolejno blokowanych i aktywowanych ligandów [24].

VI-2. Dendrymery metaloporfirynowe

Odpowiednio modyfikowane metalodendrymery mogą pełnić funkcję syntetycznych, globularnych enzymów, naśladujących białka zawierające struktury hemowe, takie jak cytochrom c. Przyczynić się to może do lepszego zrozumienia funkcjonowania tych białek w układach biologicznych [25, 26, 27].

Gross i współpracownicy, w celu usystematyzowanego zbadania wpływu syntetycznej, peptydopodobnej struktury na potencjał redoks otaczanego rdzenia, zsyntetyzowali dendrymer żelazoporfirynowy pierwszej oraz drugiej generacji. Okazało się, że dendrymery generacji drugiej, dzięki gęściej upakowanym gałęziom ograniczającym kontakt struktury hemowej rdzenia z otaczającym go środowiskiem, posiadają bardziej dodatni potencjał redoks Fe^{3+}/Fe^{2+} niż dendrymery generacji pierwszej [28].

Zsyntetyzowany przez zespół Collmana dendrymer żelazoporfirynowy wykazywał w obecności 1,2-dimetyloimidazolu zdolność odwracalnego wiązania O_2 i CO, przy czym jego powinowactwo do cząsteczek tlenu było 1000 razy większe, niż hemoglobiny w stanie T (Ryc. 10) [29]

Suslick wraz z kolegami przygotowali nową klasę nie podatnych na utlenienie dendrymerów por-

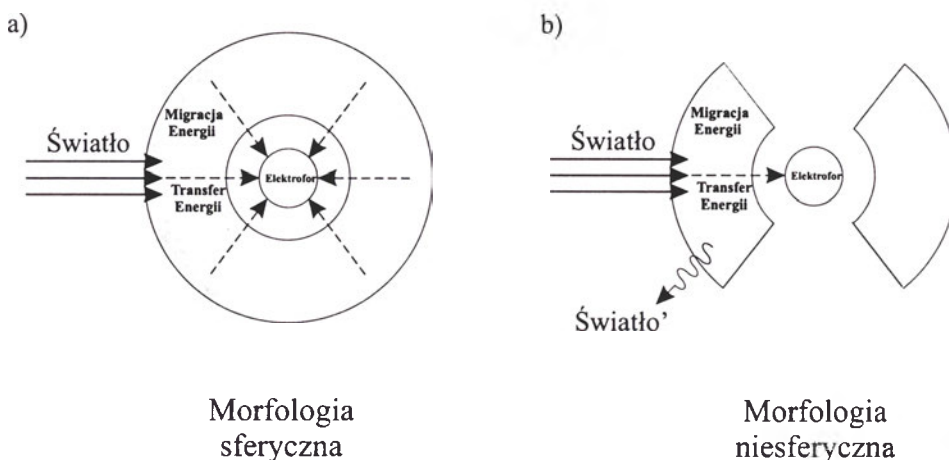
firynowych. Korzystając ze strategii syntezy zbieżnej, do rdzenia porfirynowego zawierającego w swym centrum jon manganu (Mn^{3+}) dołączali monodendrony poliestrowe, zabezpieczające metaliczne

centrum przed utlenieniem. Podczas reakcji epoksydacji olefin tak zbudowana cząsteczka dendrymeru katalizowała tworzenie 2-4 połączeń epoksydowych na sekundę, zużywając się w około 10% po utworzeniu 1000 połączeń [30].

Istnieje duże zainteresowanie systemami konwersji energii niesionej przez fotony na energię chemiczną. J i n g i A i d a stosowali niskoenergetyczne fotony promieniowania podczerwonego do zmiany

rakowych, transfer leukocytów do ognisk zapalnych oraz infekcje bakteryjne i wirusowe [34]. Opracowanie glikopeptydomimetyków, będących w stanie skutecznie rywalizować z glikopeptydami obecnymi w żywej komórce może wywołać przełom w profilaktyce i leczeniu wielu chorób [35].

Rezultaty wielu badań wspierają hipotezę, że poliwalencyjne oligosacharydy mogą służyć jako efektywne ligandy wiążące białka patogenne pochodzące



Morfologia sferyczna

Morfologia niesferyczna

Ryc.11. Struktura dendrymeru determinuje skuteczność transferu energii do jego wnętrza.

izomeryzacji przestrzennej dużych, sferycznych azodendrymerów eteru aryłowego [31]. Okazało się, że zmiana izomeryzacji przestrzennej obecnego w rdzeniu azobenzenu (Ryc. 7) z konformacji *cis* na *trans* ma miejsce wyłącznie w cząsteczkach o kształcie sferycznym, i tylko przy takim kształcie wszystkie 4 podjednostki (gałęzie) dendrymeru zachowują się jak jeden spójny chromofor, w którym energia wzbudzenia nie jest ściśle zlokalizowana przestrzennie, lecz migruje w trójwymiarowej strukturze zrębu, wokół rdzenia dendrymeru (Ryc. 11). Zwiększa to prawdopodobieństwo transferu energii z chromoforu do struktury porfirynej rdzenia. Mechanizm ten jest podobny do sposobu transdukcji energii z chromoforu do elektroforu u purpurowych bakterii fotosyntetyzujących, gdzie energia przekazywana jest w sposób równie szybki i skuteczny [32].

Również grupa pod kierownictwem K o p e l m a n a, analizując widma absorpcyjne stworzonych przez siebie azodendrymerów, wykryła zjawisko transferu energii ze struktur otaczających rdzeń wprost do elektroforu stanowiącego centrum cząsteczki [33].

VII. Glikodendrymery

Interakcje węglowodanów i białek są podstawą między innymi takich zjawisk jak przerzuty komórek

nia bakteryjnego. Kompleksy złożone z dendrymerów polipropyleniminowych i oligopeptydów MC1 wykazują wielokrotnie wyższy stopień inibicji adhezji holotoksyny cholery oraz enterotoksyny *E. coli* do powierzchni natywnej formy MC1 immobilizowanej na fazie stałej, niż wolne oligopeptydy MC1. Stężenie związanego z dendrymerem oligopeptydu MC1 wymagane do zaobserwowania zjawiska inibicji adhezji jest 1000 razy niższe niż stężenie wolnego MC1 [36, 37].

Użycie specjalnie znakowanych dendrymerów może służyć łatwiejszemu wykrywaniu tworzonych przez nie kompleksów z przeciwciałami. Q u a l m a n wraz ze współpracownikami wykorzystali zsyntetyzowany przez siebie dendrymer poli-a,e-L-lizynowy, którego grupy powierzchniowe zostały wysyczone borem do uzyskania w technice ESI (ang. *Electron Spectroscopic Imaging*) obrazu przeciwciał związanych na ich powierzchni [38].

VIII. Dendrymery kwasów nukleinowych

Grupa badaczy pod kierownictwem L i s k a m p a opracowała syntezę dendrymerów kwasów nukleinowych przy użyciu strategii syntezy zbieżnej opartej o monomery zbudowane z 3,5-bis(2-tert-butyloksykarbonyloaminoetoksy) benzoesu metylu [39].

Podobną w założeniach syntezę przeprowadzono także używając do konstrukcji cząsteczki dendryme-

ru monomerów zbudowanych z różnych kwasów hydroksybenzenowych i aminoalkoholi [40].

Synteza rozgałęzionych kwasów nukleinowych naśladujących naturalne introny zajęła się natomiast grupa pod kierownictwem J. D a m h y, która przy użyciu strategii rozbieżnej przeprowadziła reakcję na powierzchni płytki szklanej, stanowiącej fazę stałą. Biegła ona w niekonwencjonalnym kierunku 5'→3' [41].

Nielsen i współpracownicy donieśli o udanej syntezie siedmioramiennego dendrymeru DNA, w którym każda z nici DNA tworzących ramiona dendrymeru zawierała na pewnym swym odcinku fragment jednoniciowy o sekwencji zdolnej hybrydyzować z komplementarnymi sekwencjami kwasu nukleinowego [42].

Użycie biosensorów opartych o hybrydyzację DNA jest nowym, bardzo obiecującym narzędziem w badaniach chorób genetycznych. Immobilizowany, jednoniciowy oligonukleotyd o właściwie dobranej sekwencji, hybryduje z komplementarnym fragmentem poszukiwanej cząsteczki. Użycie dendrymeru DNA generacji czwartej, o odpowiednio zaprojektowanych gałęziach, immobilizowanego na płycie kwarcowej pokrytej cienką warstwą atomowego złota, zwiększa stopień hybrydyzacji patogenu pochodzącego od *Cryptosporidium parvum* około 10-krotnie w stosunku do pojedynczego oligonukleotydu. Teoretycznie możliwa jest również synteza dendrymeru DNA generacji dwunastej, który według przewidywań zawierałby 2 miliony ramion oligonukleotydowych komplementarnych do sekwencji badanego patogenu, co bardzo wydatnie zwiększałoby czułość tak zaprojektowanego biosensora [43].

IX. Transfer genów

Możliwość wpływania na metabolizm komórki poprzez modyfikowanie informacji zawartych w jej materiale genetycznym z pewnością stanie się w niedalekiej przyszłości podstawą wielu niezwykle skutecznych, specyficznym ukierunkowanych terapii. Terapie genowe, aby zagwarantować wymaganą skuteczność muszą opierać się na systemie efektywnie przenoszącym informację genetyczną do wnętrza komórki oraz zapewniającym możliwie najwyższy poziom ekspresji przenoszonych genów. Dobry przenośnik materiału genetycznego powinien także tworzyć z przenoszonym materiałem stabilne oraz dostatecznie małe oligomery, które mogłyby swobodnie wychodzić ze strumienia krwi płynącej w naczyniach krwionośnych i łatwo przenikać do wnętrza wybra-

nego typu komórek [44]. Dzięki spełnieniu tego warunku możliwy jest transfer genów do wnętrza komórek zwierzęcych za pośrednictwem dróg oddechowych lub też przez iniekcje domięśniowe [45].

Istniejące obecnie systemy stosowane w transfekcji, takie jak wektory wirusowe lub liposomy, posiadają wiele wad, między innymi charakteryzują się ograniczoną pojemnością, rekombinują, powodują mutagenezę, a także wywołują odpowiedź immunologiczną oraz stany zapalne [46]. Wektory wirusowe integrując się z genomem transfekowanej komórki mogą także przyczynić się do aktywacji protoonkogenów komórkowych lub inaktywować geny supresji nowotworowej [47].

Dendrymery poliamidoaminowe, podobnie jak wektory niewirusowe, wywołują kondensację DNA [48, 49]. Zachodzi ona dzięki obecności na powierzchni dendrymerów dodatnio naładowanych grup aminowych (NH₂), oddziałujących elektrostatycznie z obecnymi w kwasach nukleinowych, ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi [48]. Dzięki temu, w porównaniu do naturalnych poliamin, polilizyny i liposomów, dendrymery wykazują zwiększoną siłę oddziaływania jonowego z DNA oraz tworzą z kwasami nukleinowymi stabilniejsze i lepiej rozpuszczalne kompleksy. Siła oddziaływania kulombowskiego stabilizującego kompleks DNA-dendrymer jest w warunkach fizjologicznych na tyle duża, że nawet użycie silnego detergentu jonowego, jakim jest siarczan dodecylu sodu (SDS), nie powoduje rozpadu kompleksu na podjednostki [49]. Tak duża trwałość sprawia, że wolny kwas nukleinowy wprowadzony do wnętrza komórki nie ulega degradacji pod wpływem działania endosomów oraz wewnątrzkomórkowych nukleaz [50, 51]. Owinięcie kwasu nukleinowego wokół cząsteczki dendrymeru czyni tak powstały kompleks odpornym na restrykcyjne działanie endonukleazy i DNazy I. Materiał genetyczny pozostaje jednak dostępny dla polimerazy RNA II, co ma fundamentalne znaczenie dla przebiegu transkrypcji [46]. Oprócz modyfikacji topologicznych, wynikających ze zmiany 2 i 3 rzędowej struktury kwasów nukleinowych, pewną ochronną rolę odgrywają także zdolności buforowe dendrymeru w zakresie pH 5-7 [52]. Wynikają one z tego, że w fizjologicznym pH dendrymery PAMAM są tylko częściowo uprotonowane, zatem po endocytozie wykazują wewnątrz komórki cechy słabych zasad, buforując częściowo zakwaszenie endosomalne i chroniąc tym samym kompleks DNA-dendrymer przed degradacją (terminalne grupy aminowe charakteryzują się pK_a=6,9, wewnętrzne natomiast pK_a=3,9) [53].

X. Skuteczność transfekcji

Przeprowadzone dotychczas próby wykorzystania dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) do transferu materiału genetycznego wydają się być bardzo obiecujące.

B i e l i Ń s k a wraz ze swoją grupą w badaniach nad inhibicją ekspresji genu lucyferazy przez antysensowne oligonukleotydy lub antysensowne mRNA przenoszone przez dendrymery, osiągnęła efektywność transfekcji rzędu 30-60%. Wynik ten zależny był głównie od generacji użytego dendrymeru, ilości przenoszonego kwasu nukleinowego oraz wzajemnego stosunku ładunków DNA i dendrymeru w utworzonym kompleksie. Generalnie wyższą ekspresję obserwowano w przypadku użycia do transfekcji dendrymerów wyższych generacji, niezależnie od tego, czy rdzeń stanowiła cząsteczka EDA czy NH_3 . Nie obserwowano tworzenia się kompleksów DNA-dendrymer w przypadku użycia dendrymerów generacji niższych niż czwarta [49]. Korzystnie wpływał również około (5-20)-krotny nadmiar dodatnio naładowanego dendrymeru w stosunku do DNA, podnosząc wielokrotnie efektywność transfekcji oraz ekspresji przenoszonego materiału poprzez ułatwianie wiązania z fosfolipidami błon komórkowych, co wywoływało endocytozę. Badania wpływu inhibitora metabolizmu komórkowego, jakim jest azydek sodu oraz specyficznych inhibitorów endocytozy, takich jak cytochalazyna B i deoksyglukoza na przenikanie kompleksu przez błony komórkowe pozwoliły ustalić, że kompleksy DNA-dendrymer wnikają do wnętrza komórki na drodze endocytozy energozależnej [48].

Q i n i współpracownicy zajmowali się transferem genów inhibujących powstawanie interleukiny IL-10 uczestniczącej w aktywowaniu powstawania limfocytów T. Zahamowanie wytwarzania tej cytokiny miało na celu zablokowanie powstawania reakcji immunologicznej, prowadzącej do niszczenia komórek przeszczepionego mięśnia sercowego przez organizm biorcy [54].

W celu poprawy efektywności systemów transfekcyjnych opartych o wykorzystanie dendrymerów wprowadzano do nich różnego typu modyfikacje. W wyniku tego okazało się na przykład, że efektywność transfekcji wzrastała znacznie, gdy oprócz dendrymeru generacji dziewiątej (z NH_3 jako cząsteczką rdzeniową) stosowano także DEAE-dekstran, zapobiegający łączeniu się kompleksów DNA-dendrymer w olbrzymie agregaty o średnicach rzędu setek angstromów. Zabieg taki zwiększał cytotoksyczny wpływ układu na transfekowane komórki. Po 24-

godzinnej inkubacji obserwowano około 2-krotny wzrost śmiertelności komórek, sięgający poziomu około 5-8%. Mimo to układ zapewniał od 10 do 100 razy wyższą skuteczność transfekcji niż komercyjnie dostępne lipidy kationowe. Wysoki poziom ekspresji osiągnąć był także w przypadku opornych na klasyczne metody transfekcji fibroblastów człowieka oraz linii komórkowych Jurkat [49].

H a e n s l e r i S z o k a stosując do transfekcji dendrymer PAMAM generacji piątej o rdzeniu NH_3 , do którego dołączono peptyd GALAcys destabilizujący błonę komórkową, zaobserwowali efekty ekspresji przenoszonych genów w 80% komórek linii CV-1 oraz mniej niż 1% u opornych na transfekcję linii komórkowych EL-4 i Jurkat [55].

T a n g i współautorzy, badając zdolności transfekcyjne częściowo zdegradowanych dendrymerów stwierdzili, że do skutecznej transfekcji niezbędny jest nie tylko duży nadmiar dodatniego ładunku pochodzącego od grup NH_2 obecnych na powierzchni cząsteczki, ale pewną rolę odgrywa także masa oraz elastyczność cząsteczki dendrymeru. Degradacja dendrymeru następuje podczas solwolizy wiązań amidowych obecnych w cząsteczce [5]. Wysoka skuteczność transferu genów za pomocą dendrymerów PAMAM wyższych generacji przypisywana jest ich sferycznemu kształtowi oraz średnicy zbliżonej do średnicy rdzenia histonowego obecnego w chromatinie, a także zdolności zaburzania struktury błony komórkowej, co ułatwia wnikanie kompleksu do wnętrza komórki [56].

Wymiana terminalnych grup aminowych na cukry, peptydy lub grupy karboksylowe wpływała hamująco na zdolność wiązania DNA w stopniu proporcjonalnym do ubytku powierzchniowych grup aminowych [46].

XI. Cytotoksyczność

R o b e r t s wraz z kolegami badali dendrymery PAMAM generacji trzeciej, piątej i siódmej pod kątem cytotoksyczności (*in vitro* i *in vivo*), zdolności wywoływania odpowiedzi immunologicznej oraz biodystrybucji w transfekowanych organizmach. Jako materiał biologiczny do badań *in vitro* posłużyły komórki linii V79, badania *in vivo* prowadzone były natomiast na myszach linii Swiss-Webster. Okazało się, że dendrymer generacji trzeciej znacząco wpływał na wzrost śmiertelności tylko w przypadku bardzo wysokiego stężenia wynoszącego 1 mM. Dendrymer generacji piątej wykazywał toksyczność już przy stężeniu 10 μM , natomiast PAMAM generacji siódmej powodował śmierć ko-

mórek w całym badanym zakresie stężeń (1 mM, 10 μ M, 100 nM). Generalnie stwierdzono, że dendrymery PAMAM niższych generacji są mało szkodliwe w badanym zakresie stężeń *in vitro* oraz nie powodują żadnych problemów przy zastosowaniu ich *in vivo*. Szkodliwe działanie wyższych generacji przypisują badacze polikationowemu charakterowi dendrymerów poliamidoaminowych, uważając, że bardzo wysoki nadmiar dodatniego ładunku pochodzącego z terminalnych grup aminowych jest przyczyną obserwowanej cytotoksyczności. Również nadmiarem dodatniego ładunku na powierzchni dendrymerów tłumaczą autorzy sposób ich biodystrybucji wewnątrz organizmów myszy. Zastanawiają się jednocześnie w jaki sposób dendrymery o stosunkowo dużej średnicy przenikają przez kanaliki nerkowe, podczas gdy białka o porównywalnej do dendrymerów wielkości nie są w stanie [57].

XII. Perspektywy badań nad dendrymerami

Możliwość precyzyjnego zaprojektowania położenia każdego z atomów budujących cząsteczkę dendrymeru daje nowe, nieznane dotąd w chemii możliwości, które coraz chętniej eksplorowane są przez badaczy tematu. Owocuje to zwiększającą się z dnia na dzień liczbą publikacji traktujących o syntezie różnego rodzaju dendrymerów oraz ich zastosowaniach praktycznych. Uzasadnionym optymizmem napawają pierwsze doniesienia o udanym użyciu dendrymerów w praktyce medycznej. Dendrymery jako przenośniki leków przeciwnowotworowych takich jak cisplatyna. Dendrymery jako kontenery transportujące fotouczulacze z grupy ftalocyjanin. Dendrymery jako nowoczesne kontrasty w tomografii komputerowej czy rezonansie magnetycznym. Dendrymery jako warstwa pokrywająca baloniki używane w angioplastyce. Dendrymery jako czynnik poprawiający czułość immunoblotingu. Dendrymery jako ...

Artykuł otrzymano 6 maja 1999 r.

Zaakceptowano do druku 30 marca 2000 r.

Piśmiennictwo

- Tomalia DA, Naylor AM, Goddard WA III (1990) *Angew Chem Int Ed Engl* **29**: 138-175
- Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Smith P (1985) *Polymer J* **17**: 117-132
- Newkome GR, Yao ZQ, Baker GR, Gupta VK (1985) *J Org Chem* **50**: 2003
- Woolley KL, Klug CA, Tasaki K, Schaefer J (1997) *J Am Chem Soc* **119**: 53-58
- Tang M, Redemann, Szoka F Jr (1996) *Bioconjugate Chem* **7**: 703-714
- Chow HF, Mong TTK, Nongrum MF, Wan CH (1998) *Tetrahedron* **54**: 8543-8660
- Jahromi S, Coussens B, Meijerink N, Braam AWM (1998) *J Am Chem Soc* **120**: 9753-9762
- Yin R, Zhu Y, Tomalia DA (1998) *J Am Chem Soc* **120**: 2678-2679
- Haddleton DM, Sahota HS, Taylor PC, Yeates SG (1996) *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 649-656
- Balagurasamy VSK, Ungar G, Percec V, Johansson G (1997) *J Am Chem Soc* **119**: 1539-1555
- Naylor AM, Goddard WA III, Kiefer GE, Tomalia DA (1989) *J Am Chem Soc* **111**: 2341
- Jansen JFGA, de Brabander-van den Berg EMM, Meijer EW (1994) *Science* **266**: 1226-1229
- Jansen JFGA, de Brabander-van den Berg EMM, Meijer EW (1995) *J Am Chem Soc* **117**: 4417-4418
- Seebach D, Herrmann GF, Langweiler UG, Bachmann BM, Amrein W (1996) *Angew Chem Int Engl* **23/24**: 2795-2797
- Arcut A, Azzellini GC, Balzani V, De Cola L, Vogtle F (1998) *J Am Chem Soc* **120**: 12187-12191
- Cooper AJ, Londono JD, Wignall G, McClain JB, Samulski ET, Lin JS, Dobrynin A, Rubinstein M, Burke ALC, Frechet MJM, DeSimone JM (1997) *Nature* **389**: 368-371
- Perrlings HWI, Meijer EW (1997) *Chem Eur J* **3**: 1563-1570
- Peerlings HWI, Struijk MP, Meijer EW (1998) *Chirality* **10**: 46-52
- Thomas CW, Thor Y (1998) *Chirality* **10**: 53-59
- Seebach D, Lapierre JM, Skobridis K, Greiveldinger G (1994) *Angew Chem Int Ed Engl* **33**: 440-442
- Balogh L, Tomalia DA (1998) *J Am Chem Soc* **120**: 7355-7356
- Kriesel JW, König S, Freitas MA, Marshall AG, Leary JA, Tilley TD (1998) *J Am Chem Soc* **120**: 12207-12215
- Huck WTS, van Veggel FCJM, Reinhoudt DN (1996) *Angew Chem Int Ed Engl* **35**: 1213-1215
- Campagna S, Denti G, Serroni S, Juris A, Venturi M, Ricevuto V, Balzani V (1995) *Chem Eur J* **1**: 211-221
- Daido T, Akaike T (1993) *J Electroanal Chem* **344**: 91-106
- Yagi T (1994) *Meth Enzym* **242**: 104-118-
- Zhou HX (1994) *J Am Chem Soc* **116**: 10362-10365
- Dandliker PJ, Diederich F, Gisselbrecht JP, Louati A, Gross M (1995) *Angew Chem Int Ed Engl* **34**: 2725
- Collman JP, Fu L, Zingg A, Diederich F (1997) *Chem Commun*: 193-194
- Bhyrappa P, Young JK, Moore JS, Suslick KS (1996) *J Am Chem Soc* **118**: 5708-5711
- Jiang DL, Aida T (1997) *Nature* **6641**: 454-456
- Jiang DL, Aida T (1998) *J Am Chem Soc* **120**: 10895-10901
- Bar-Haim A, Klafter J, Kopelman R (1997) *J Am Chem Soc* **119**: 6197-6198
- Lindhorst TH, Kieburg C (1996) *Angew Chem Int Ed Engl* **35**: 1953-1956
- Zanini D, Roy R (1996) *J Org Chem* **61**: 7348-7354
- Thompson JP, Schengrund CL (1997) *Glycoconjugate Journal* **14**: 837-845
- Thompson JP, Schengrund CL (1998) *Biochemical Pharmacology* **56**: 591-597
- Qualmann B, Kessels MM, Klobasa F, Jungblut PW, Sierrlata WD (1996) *Journal of Microscopy* **183**: 69-77
- Mulders SJE, Brouwer AJ, van der Meer PGJ, Liskamp RM (1997) *Tetrahedron Letters* **38**: 631-634
- Mulders SJE, Brouwer AJ, Liskamp RM (1997) *Tetrahedron Letters* **38**: 3085-3088
- Hudson HE, Robidoux S, Damha MJ (1998) *Tetrahedron Letters* **39**: 1299-1302

42. Nielsen TW, Grayzel J, Prensky W (1997) *J Theor Biol* **187**: 273-284
43. Wang J, Jiang M (1998) *J Am Chem Soc* **120**: 8281-8282
44. De Long R, Stephenson K, Loftus T, Fischer M, Alhani S, Nolting N, Juliano RL (1997) *Journal of Pharmaceutical Sciences* **6**: 3334-3341
45. Manthrope M, Cornefert-Jansen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dvarki V (1993) *Hum Gene Ther* **4**: 419-431
46. Bielinska AU, Kukowska-Latalo JF, Baker JR (1997) *Biochimica et Biophysica Acta* **1353**: 180-190
47. Tomlinson E, Rolland AP (1996) *Journal of Controlled Release* **39**: 357-372
48. Bielinska AU, Kukowska-Latalo JF, Johnson J, Tomalia DA, Baker JR (1996) *Nucleic Acids Research* **11**: 2176-2182
49. Kukowska-Latalo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4897-4902
50. Gareis M, Harrer P, Bertling WM (1991) *Cell Mol Biol* **37**: 191-203
51. Wagner RW, Matteucci MD, Levis JG, Gutierrez AJ, Moulds C, Froehler BC (1993) *Science* **260**: 1510-1513
52. Tang M, Szoka F jr (1997) *Gene Therapy* **4**: 823-832
53. Stenseth K, Thyberg J (1989) *Eur J Cell Biol* **49**: 326-333
54. Qin L, Pahud DR, Ding Y, Bielinska AU, Kukowska-Latalo JF, Baker JR, Bromberg JS (1998) *Human Gene Therapy* **9**: 553-560
55. Haensler J, Szoka FC jr (1993) *Bioconjugate Chem* **5**: 372-379
56. Richmond TJ, Fink JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A (1984) *Nature* **311**: 532-537
57. Roberts JC, Bhalgat MK, R T Zera (1996) *Journal of Biomedical Materials Research* **30**: 53-56

Współzależność funkcjonalna mitochondriów oraz siateczki śródplazmatycznej a sygnał wapniowy

Cross-talk between mitochondria and endoplasmic reticulum, and calcium signalling

MAGDALENA WAŚNIEWSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Pomiar stężenia jonów wewnątrzkomórkowego wapnia
- III. Odbieranie sygnału wapniowego przez mitochondria
- IV. Współzależność funkcjonalna mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: $[Ca^{2+}]_c$ — stężenie jonów wapniowych w cytosolu; $[Ca^{2+}]_m$ — stężenie jonów wapniowych w macierzy mitochondrialnej; $[Ca^{2+}]_n$ — stężenie jonów wapniowych w jądrze komórkowym; ER — siateczka śródplazmatyczna; Fura-2 — sonda fluorescencyjna służąca do pomiaru stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie; GFP — (ang. *green fluorescent protein*); IP_3 — 1,4,5-trisfosfoinozytol; mimsAEQ — akworyna zaopatrzona w sekwencję kierującą białko do przestrzeni międzybłonowej mitochondrium; mitoAEQ — akworyna zaopatrzona w mitochondrialną sekwencję kierującą; SOC — (ang. *store operated channel*) kanał wapniowy w błonie komórkowej; SR — siateczka sarkoplazmatyczna;

1. Wstęp

Zmiany stężenia jonów wapniowych $[Ca^{2+}]$ w cytosolu mogą być odpowiedzią na szereg różnych bodźców. Dzieje się tak w większości typów komórek. Wzrost $[Ca^{2+}]$ w cytosolu może być zarówno wynikiem wpływu jonów wapniowych z siateczki śródplazmatycznej (ER), jak i napływu tego jonu ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Oba te procesy transportowe zachodzą przez wyspecjalizowane kanały: w błonie siateczki śród-

Contents:

- I. Introduction
- II. Intracellular calcium measurements
- III. Mitochondria as sensors of calcium signal
- IV. Cross-talk between endoplasmic reticulum and mitochondria
- V. Summary

plazmatycznej w transporcie jonów wapniowych uczestniczy kanał — receptor 1,4,5-trisfosfoinozytolu (IP_3), zaś na błonie komórkowej kanał aktywowany w wyniku opróżnienia siateczki śródplazmatycznej z jonów wapniowych [1] tzw. SOC — ang. *store operated channel* znany też jako CRAC — ang. *calcium release activated calcium channel*.

Stężenie jonów wapniowych w poszczególnych przedziałach komórkowych jest różne. W cytosolu i w jądrze komórki w stanie spoczynku stężenie jonów wapniowych wynosi kilkadziesiąt nM, w macierzy mitochondrialnej zaś i wewnątrz siateczki śródplazmatycznej — kilka μM [2]. Pobudzenie komórki prowadzi do zmian $[Ca^{2+}]$ we wszystkich tych przedziałach komórki. W pobudzonej komórce dochodzi do produkcji trisfosfoinozytolu i jego oddziaływania na wrażliwe kanały — receptory IP_3 , przez co następuje opróżnienie siateczki śródplazmatycznej z jonów wapniowych. Ten proces aktywuje wrażliwe na opróżnienie siateczki śródplazmatycznej z jonów wapniowych kanały wapniowe w błonie komórkowej (SOC). W wyniku pobudzenia komórki, $[Ca^{2+}]$ w cytosolu wzrasta do wartości 1-2 μM . Zmiany stężenia jonów wapniowych zachodzące w jądrze naśladują zmiany $[Ca^{2+}]$ cytosolowego [3].

*Mgr, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Zakład Biochemii Komórki, Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel. 659 85 71 w. 313, e-mail: mariaw@nencki.gov.pl

W ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie udziałem mitochondriów w metabolizmie jonów wapniowych. Do niedawna uważano, że mitochondria służą za swoisty „zawór bezpieczeństwa”, tzn. wychwytyją jedynie nadmiar jonów wapniowych, gdy ich stężenie osiągnie wartość kilku μM , co mogłoby być toksyczne dla komórki. Ponieważ stężenie jonów wapniowych przekraczało próg wrażliwości uniportu Ca^{2+} w mitochondriach niezmiernie rzadko i tylko w warunkach patologii, sądzono, że ich rola w metabolizmie jonów wapniowych jest marginalna. Wiadomo, że mitochondria pobierają jony wapniowe, gdy zostaną spełnione dwa warunki: po pierwsze gdy na wewnętrznej błonie mitochondrialnej jest wysoki potencjał elektryczny z ładunkiem ujemnym po stronie macierzy mitochondrialnej, po drugie, gdy stężenie jonów Ca^{2+} w cytosolu osiągnie poziom kilku μM . Napływ jonów wapniowych do mitochondriów następuje przez działający jednokierunkowo (z cytosolu do macierzy) nośnik, selektywny dla jonów wapnia określany jako uniport wapniowy [4]. Z kolei wypływ jonów wapniowych z mitochondrium odbywa się przez elektroneutralne (nie generujące i nie zużywające potencjału) wymienniki i jest sprzężony z transportem H^+ lub Na^+ [5]. Niskie powinowactwo nośnika katalizującego uniport, w stosunku do jonów Ca^{2+} sprawiło, że długo nie przypisywano mitochondriom istotnej roli w regulacji homeostazy wapniowej w prawidłowej komórce ($K_d = 10\text{M}$, powinowactwo określono w badaniach na izolowanych mitochondriach). Od kilku lat nowe techniki pomiarowe, wykorzystujące między innymi białka (takie jak akworyna) lub syntetyczne sondy fluorescencyjne wiążące Ca^{2+} (takie jak Fura-2 czy Fluo-3) pozwalają na precyzyjne oznaczanie stężenia jonów wapniowych nie tylko w pojedynczych komórkach, ale nawet w organellach.

II. Pomiar stężenia jonów wapniowych w komórce

Sondy fluorescencyjne są stosunkowo łatwe w użyciu. Na przykład wprowadzona do komórki estrowa pochodna sondy Fura-2 (Fura-2 /AM) ulega wewnątrz komórki enzymatycznej hydrolizie, co zapobiega jej wypłynięciu z komórki i nadaje jej odpowiednie właściwości fluorescencyjne i wrażliwość na jony wapniowe. Zarówno Fura-2 związana z jonami wapniowymi, jak i wolna, wzbudzone promieniowaniem UV o różnej długości fali, emitują promieniowanie elektromagnetyczne o

maksymalnym natężeniu przy długości fali $\lambda=510\text{nm}$. Fura-2 związana z Ca^{2+} jest wzbudzana promieniowaniem o maksymalnym natężeniu przy długości fali $\lambda=340\text{ nm}$, zaś wolna o $\lambda=380\text{nm}$. Iloraz natężenia fluorescencji Fura-2 wzbudzonej promieniowaniem o długości fali $\lambda=340\text{ nm}$ oraz $\lambda=380\text{ nm}$ jest miarą stężenia jonów wapniowych. Zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_c$ sprawiają, że większa lub mniejsza ilość sondy wiąże się z jonami wapnia, co wpływa na stosunek fluorescencji 340/380nm [6]. Fluorymetryczne badania z użyciem tej sondy mogą być prowadzone zarówno na zawiesinie [7] lub pojedynczej warstwie (ang. *monolayer*) komórek jak i na poszczególnych komórkach [8]. Obserwacje pojedynczych komórek doprowadziły do odkrycia zjawisk zwanych oscylacjami i falami wapniowymi [9]. Jednak dotychczasowe metody badawcze, choć umożliwiały dokładną obserwację zmian $[\text{Ca}^{2+}]_c$ i pozwalały na stwierdzenie, że stężenie jonów wapniowych nie jest równe w całym cytosolu, to nie umożliwiały zbadania zmian $[\text{Ca}^{2+}]$ w poszczególnych przedziałach komórki.

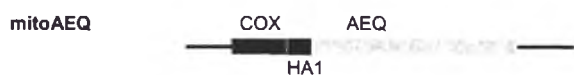
III. Odbieranie sygnału wapniowego przez mitochondria

Od kilku lat wiadomo, że w prawidłowej komórce mitochondria są wrażliwe na wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Aktywność niektórych enzymów mitochondrialnych, jak na przykład trzech wrażliwych na stężenie jonów wapniowych dehydrogenaz (pirogronianowej, izocytrynianowej i 2-oksogluutaranowej), wzrasta jako odpowiedź komórki na oscylacje $[\text{Ca}^{2+}]$ [10]. Jednakże pomiary aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych, choć jedynie w pośredni sposób mówiły o zmianach stężenia jonów wapniowych w macierzy mitochondrialnej ($[\text{Ca}^{2+}]_m$), wskazywały, że wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$ powinien być znacznie wyższy, niż wynikałoby to z doświadczeń.

W 1992 roku w laboratorium T. P o z z a n a w Padwie, przeprowadzono doświadczenia obrazujące zmiany stężenia jonów Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej [11]. Metoda opierała się na wykorzystaniu akworyny, białka pochodzącego z meduzy *Aequorea victoria* i reagującego luminescencją (emisją fal elektromagnetycznych w zakresie długości fal około 500nm) na obecność jonów Ca^{2+} [12]. Białko to stosowano już wcześniej do pomiaru stężenia jonów wapniowych, z tym, że podawano je do komórek metodą mikroiniekcji. Zespół P o z z a n a zastosował technikę rekombinacji cDNA, konstruując wektor zawierający cDNA akworyny i cDNA sekwencji kodującej VIII podjednostkę oksydazy cytochromowej.

Ten fragment peptydu miał stanowić sekwencję kierującą akworynę do mitochondrium [13]. Komórki zawierające wektor produkowały akworynę, która była następnie transportowana do wnętrza mitochondriów. Zastosowanie tej metody umożliwiło precyzyjną obserwację zmian stężenia jonów wapniowych w mitochondriach i skorelowanie ich ze zmianami stężenia jonów wapniowych w cytosolu. W ten sposób badania nad czasowo-przestrzenną regulacją aktywności mitochondriów przez sygnał wapniowy w pobudzonej komórce wkroczyły w nową fazę.

W 1993 roku Rizzuto i wsp. przedstawili hipotezę [14], zgodnie z którą w cytosolu występują niewielkie obszary o znacznie wyższym $[Ca^{2+}]_i$ niż średnie $[Ca^{2+}]_c$. Na skutek pobudzenia komórek powstaje w nich inozytolotrisfosforan (IP_3), który aktywuje wrażliwe na IP_3 kanały wapniowe w siateczce śródplazmatycznej. Prowadzi to do miejscowego uwalniania jonów wapniowych, wychwytywanych przez mitochondria. Badania grupy Pozzana z 1999 roku dotyczyły mikrodomen wapniowych — czyli obszarów cytosolu o podwyższonym stężeniu jonów wapniowych [15]. Skonstruowano wektor cDNA (Ryc. 1) zawierający cDNA akworyny, cDNA sekwencji kierującej, dzięki której białko trafiało do



Ryc. 1. Schemat fragmentu wektora kodującego mitochondrialną akworynę związaną z sekwencją kierującą do mitochondrium (COX) oraz obszarem HA1 umożliwiającym immunolokalizację

mitochondrium i cDNA obszaru umożliwiającego immunolokalizację białka zwanego HA1. W innym wektorze zawarto cDNA sekwencji kierującej, która powodowała transport nowopowstałego białka do światła ER [16]. W komórkach HeLa transfekowanych wektorami, powstawały fuzyjne białka — chimery akworynowe, które gromadziły się w przedziałach komórkowych specyficznych dla sekwencji kierujących i reagowały świeceniem po związaniu jonów wapniowych. Zaobserwowano w tych komórkach, że część mitochondriów i pewne obszary siateczki śródplazmatycznej występują w bardzo bliskim sąsiedztwie. Analizując obrazy otrzymane z mikroskopu sprzężonego z kamerą, zauważono, że mitochondria i siateczka śródplaz-

matyczna tworzą funkcjonalną sieć współdziałającą w przekazywaniu sygnału wapniowego. Konstrukcja „mitochondrialnej” akworyny (mito AEQ) umożliwiła bezpośrednie badanie zmian stężenia jonów wapniowych w macierzy mitochondrialnej. Gdy komórki HeLa poddano działaniu histaminy — agonisty receptora błonowego, następowała inicjacja wapniowej kaskady sygnałowej na drodze syntezy IP_3 i wyrzut jonów wapniowych z magazynów ER (Ryc. 2). Wówczas w komórkach obserwowano wzrost $[Ca^{2+}]_m$ w macierzy mitochondrialnej, pięciokrotnie wyższy niż w cytosolu. Napływ jonów wapniowych do mitochondriów był ściśle zależny od potencjału na błonie mitochondrialnej, uprzednie podanie rozprzęgacza (CCCP) hamowało ten napływ. Już dziś wiadomo, że taki paradoksalnie wysoki wzrost $[Ca^{2+}]_m$ występuje w mitochondriach wielu różnych komórek, np. nabłonkowych, śródbłonkowych [17], fibroblastach [18], komórkach mięśni szkieletowych [19] czy komórkach B wysp Langerhansa [20].

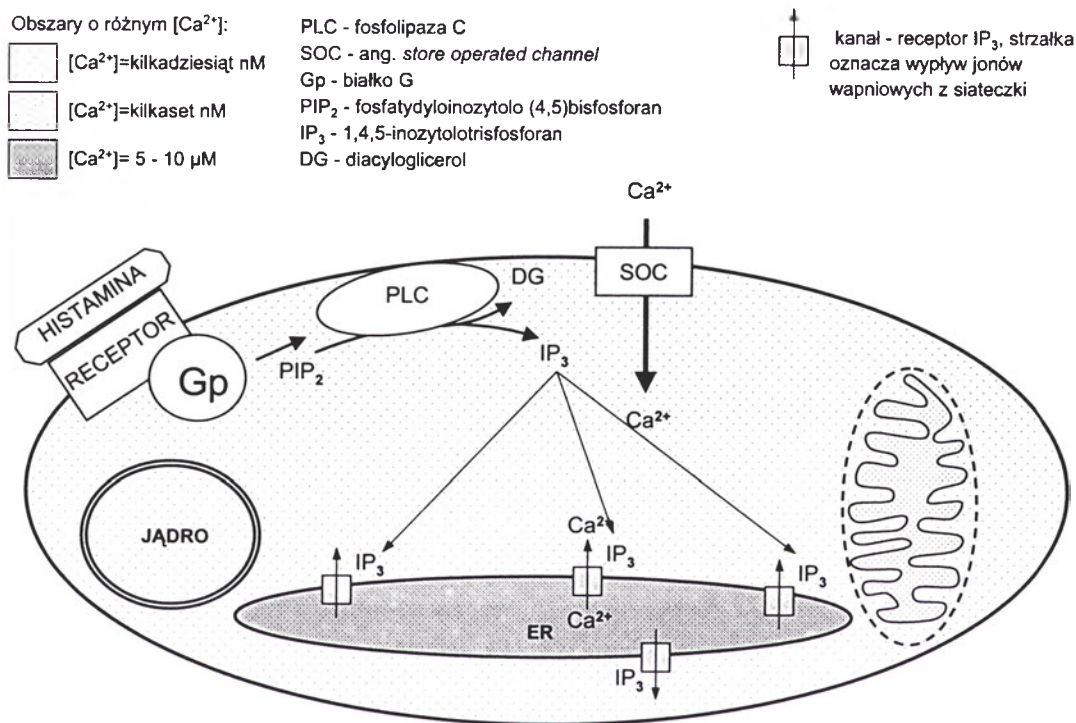
IV. Współzależność funkcjonalna mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej

Nie było jasne, w jaki sposób mitochondria pobierają jony wapniowe podczas krótkotrwałego (< 1 min) i niezbyt dużego ($< 2 \mu M$) wzrostu ich stężenia w cytosolu. Badając uprzepuszczalne komórki wykazano całkowitą niewrażliwość mitochondriów na podwyższenie stężenia jonów wapniowych w cytosolu do poziomu $2 \mu M$ — a taki właśnie poziom obserwowano w cytosolu pobudzonych komórek używając sondy Fura-2. Zaś perfuzja uprzepuszczalnych komórek roztworem IP_3 powodowała wzrost stężenia jonów wapniowych w mitochondriach — jak to ma miejsce w nieuszkodzonych i pobudzonych komórkach. W normalnych zdrowych komórkach na skutek generacji sygnału wapniowego i uwalniania jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych przez zależne od IP_3 kanały, powstają obszary o przejściowo podwyższonym $[Ca^{2+}]_c$ „wyczuwane” przez mitochondria [14]. Można więc założyć, że bliskie sąsiedztwo pewnych obszarów siateczki śródplazmatycznej bogatych w wapniowe kanały — receptory IP_3 , i mitochondriów wyjaśnia mechanizm odpowiedzi mitochondrialnej na pobudzenie komórki. Potwierdzają to wyniki Rizzuto i wsp. z 1998 roku [16], którzy wykorzystując wrażliwe na jony wapniowe białka GFP (ang. *green fluorescent protein*), badali wzajemne oddziaływanie ER-mitochondria. Zaobserwowali oni, że w

przypadku bliskiego sąsiedztwa siateczki śródplazmatycznej, mitochondrium jest wystawione na działanie znacznie wyższego stężenia Ca^{2+} uwalnianego z ER, niż wykazano to badając średnie stężenie jonów wapniowych w cytosolu. Badacze uznali na podstawie otrzymanych wyników, że przestrzenne rozmieszczenie struktur wewnątrz-

wzajemnym oddziaływaniu ER i blisko położonych mitochondriów (Ryc. 3).

Funkcjonalne sprzężenie mitochondriów z obszarami siateczki śródplazmatycznej bogatymi w wapniowe kanały — receptory IP_3 ma kluczowe znaczenie dla funkcjonowania mitochondriów i aktywacji zależnych od jonów wapniowych dehy-

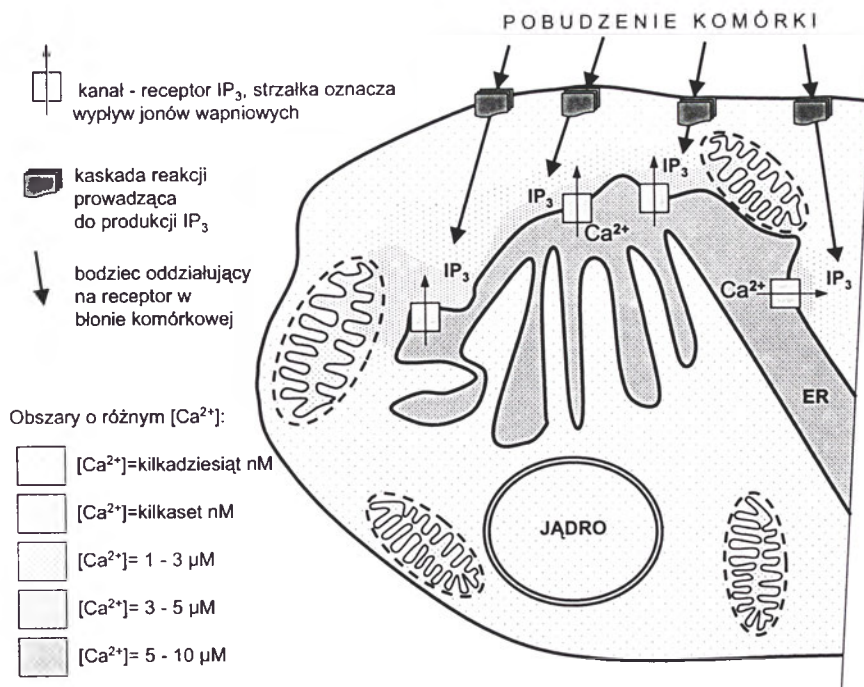


Ryc. 2. Pobudzenie komórki rozpoczyna kaskadę sygnałową prowadzącą do syntezy IP_3 , który pobudza kanały — receptory IP_3 w błonie siateczki śródplazmatycznej, co prowadzi do wypływu jonów wapniowych do cytosolu i indukcji wapniowego kanału SOC na błonie plazmatycznej

komórkowych może mieć duże znaczenie w regulacji sygnału wapniowego w mitochondriach.

Kolejnym krokiem było zbadanie zmian stężenia jonów wapniowych w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Skonstruowano białko chimeryczne mimsAEQ (od ang. *mitochondrial intermembrane space aequorin*) zawierające sekwencję kierującą z dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanowej, enzymu zakotwiczonego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. C-koniec białka, związany z akworyną, był ekspozycyjny do przestrzeni międzybłonowej. Badając pobudzone histaminą komórki produkujące mimsAEQ wykazano wyższy wzrost stężenia jonów wapniowych w przestrzeni międzybłonowej (wzrost do poziomu $3.5 \mu\text{M}$) niż w cytosolu (wzrost do poziomu $2.5 \mu\text{M}$) [15]. Potwierdza to hipotezę o

drogenaz mitochondrialnych. Szybki i efektywny pobór jonów wapniowych przez mitochondria wspomaga tworzenie fal wapniowych w oocytach *Xenopus* [21]. W pobudliwych komórkach mięśni szkieletowych występuje podobne zjawisko. Stwierdzono, że mitochondria położone w bliskim sąsiedztwie obszarów siateczki sarkoplazmatycznej silniej odpowiadają na sygnał wapniowy z niej wychodzący [15]. Podobny efekt zaobserwowano w komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy, gdzie po pobudzeniu komórki w niektórych mitochondriach $[\text{Ca}^{2+}]_m$ dochodzi wręcz do wartości milimolowych. W komórkach chromochłonnych mitochondria biorą udział w mechanizmie kontrolującym egzocytozę pęcherzyków sekrecyjnych, a tym samym wydzielanie katecholamin [22].



Ryc. 3. Współzależność funkcjonalna mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej — schemat przekazywania sygnału wapniowego

V. Podsumowanie

Badania nad udziałem mitochondriów w utrzymaniu homeostazy wapniowej w komórce i przekazywaniu sygnału wapniowego zaowocowały nowym spojrzeniem na wzajemną zależność funkcjonalną siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów. Analiza obrazów komórki otrzymanych dzięki wykorzystaniu chimer akworyny jako sond wapniowych pozwoliła dostrzec przestrzenną kolokalizację tych organelli. Bliskie sąsiedztwo zależnych od IP_3 kanałów wapniowych w błonie siateczki śródplazmatycznej i części mitochondriów sprawia, że w przestrzeni między tymi strukturami wzrost stężenia jonów wapniowych w cytosolu był znacznie (do kilkudziesięciu razy) wyższy niż obserwowany średni wzrost stężenia jonów wapniowych w cytosolu. Mitochondria silnie reagowały na tak wysokie stężenie jonów wapniowych i przez uniport wapniowy na wewnętrznej błonie mitochondrialnej mogły intensywnie pobierać jony wapniowe. Wyniki prac doświadczalnych cytowanych w tym opracowaniu świadczą dobitnie nie tylko o zróżnicowaniu cytosolu pod względem stężenia Ca^{2+} , ale też o istnieniu subpopulacji mitochondriów, bardziej niż inne odpowiedzialnej za odbieranie sygnału wapniowego. Dalszym krokiem w badaniach nad tym zagadnieniem może być sprawdzenie, czy nie istnieją w komórce wyspecjali-

zowane mitochondria różniące się między sobą nie tylko położeniem względem siateczki śródplazmatycznej ale i strukturą.

Artykuł otrzymano 28 lutego 2000 r.
Zaakceptowano do druku 11 maja 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Putney JW Jr (1990) *Cell Calcium* **11**: 611 – 624
2. Humes D (1984) *Sem Nephrol* **4**: 117 – 133
3. Badminton MN, Kendall JM, Rembold CM, Campbell AK (1998) *Cell Calcium* **23**: 79 – 86
4. Pozzan T, Rizzuto R (2000) *Nat Cell Biol* **2**: E25 – E27
5. Crompton M, Kunzi M, Carafoli E (1977) *Eur J Biochem* **79**: 549 – 558
6. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) *J Biol Chem* **260**: 3440 – 3450
7. Makowska A, Zabłocki K, Duszyński J (2000) *Eur J Biochem* **267**: 877 – 884
8. Nadal A, Sul JY, Valdeolillos M, McNaughton PA (1998) *J Physiol* **509**: 711 – 716
9. Dupont G, Goldbeter A (1992) *BioEssays* **14**: 485 – 493
10. Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995) *Cell* **82**: 415 – 424
11. Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, Pozzan T (1992) *Nature* **358**: 325 – 327
12. Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Miyata T, Tsuji FI (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3154 – 3158
13. Rizzuto R, Brini M, De Giorgi F, Rossi R, Heim R, Tsien RY, Pozzan T (1996) *Curr Biol* **6**: 183 – 188
14. Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) *Science* **262**: 744 – 747
15. Rizzuto R, Pinton P, Brini M, Chiesa A, Filippin L, Pozzan T (1999) *Cell Calcium* **26**: 193 – 199

16. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T (1998) *Science* **280**: 1763 – 1766
17. Brini M, Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R (1999) *Microsc Res Tech* **46**: 380 – 389
18. Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1994) *J Cell Biol* **126**: 1183 – 1194
19. Brini M, De Giorgi F, Murgia M, Marsault R, Massimino ML, Cantini M, Rizzuto R, Pozzan T (1997) *Mol Biol Cell* **8**: 129 – 143
20. Rutter GA, Theler JM, Murgia M, Wollheim CB, Pozzan T, Rizzuto R (1993) *J Biol Chem* **268**: 22385 – 22390
21. Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD (1995) *Nature* **377**: 438 – 441
22. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Alvarez J (2000) *Nat Cell Biol* **2**: 57 – 61

Aneksynopatie — choroby związane z nieprawidłowym poziomem aneksyn w komórkach

Annexinopathies — annexin-related diseases

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA *

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Zaburzenia homeostazy Ca^{2+} w mięśniu sercowym
- III. Aneksyny w układzie krwionośnym
- IV. Aneksyny — tarcza ochronna w łożysku
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Disturbances in Ca^{2+} homeostasis in heart muscle
- III. Annexins in blood circulation
- IV. Annexins — a protective shield in placenta
- V. Concluding remarks

I. Wstęp

Aneksyny¹, białka wiążące jony wapnia i fosfolipidy, tworzą rodzinę rozpuszczalnych makrocząsteczek o budowie domenowej, w określonych warunkach łączących się z błonami komórkowymi [1-3]. Podobna struktura cząsteczkowa wszystkich aneksyn, oraz ich niskie powinowactwo do Ca^{2+} , ugruntowały we wczesnym etapie badań przekonanie, że rola jaką aneksyny odgrywają w organizmach ssaków nie jest kluczowa. Współczesne badania nad tymi białkami zmieniły takie przekonanie, wskazując na udział aneksyn w regulacji wielu procesów, zachodzących w komórkach. Wśród odkrytych dotąd 45 podrodzin aneksyn, skupiających ponad 200 przedstawicieli [4], 12 podrodzin zidentyfikowano u człowieka [5, 6]. Badacze wyróżniają trzy podstawowe typy tych białek. Najliczniejszym są aneksyny o krótkim rejonie N-końcowym i rdzeniu składającym się z czterech, niemal identycznych domen tworzących miejsca wiązania Ca^{2+} i fosfolipidów. Drugi typ reprezentuje aneksyna VII, która oprócz czterech powtarzających się domen, ma długi (około 200 reszt aminokwasowych) rejon N-końcowy. Do trzeciego typu zakwalifikowano największą z aneksyn, aneksynę VI (o m.c.z. 67-68 kDa), której rdzeń

zbudowany jest z ośmiu powtarzających się domen. Aneksyny są symetrycznymi cząsteczkami, o wyodrębnionych dwóch powierzchniach, wklęsłej i wypukłej. Na powierzchni wypukłej zlokalizowane są miejsca wiązania jonów wapnia i fosfolipidów [7, 8].

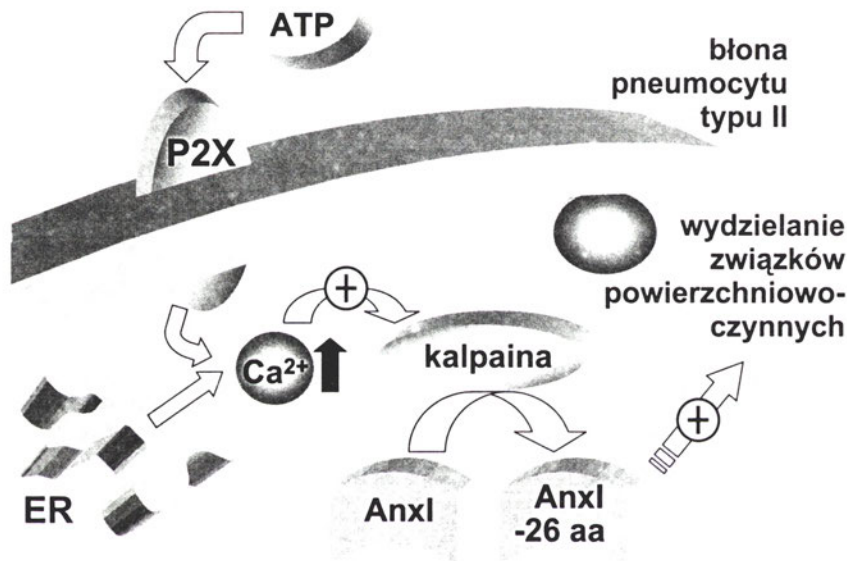
Aneksyny ulegają ekspresji w komórkach wszystkich typów tkanek człowieka, z wyjątkiem erytrocytów. Szczególnie bogate w aneksyny są komórki nabłonkowe [2, 3]. Białka te zidentyfikowano również we wszystkich organach, gdzie ich zawartość i kombinacje, w jakich występują, zależą od typu tkanki [9]. Rozmaitość cechuje również wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie aneksyn. Aneksyny, jako białka rozpuszczalne, występują w cytosolu. Jednocześnie wykazują zdolność wiązania się z cząsteczkami fosfolipidów i białek błonowych, dlatego też spotyka się je na powierzchni błon organelli komórkowych i błony plazmatycznej [3]. Aneksyny są także wydzielane na zewnątrz komórek i do płynów ustrojowych, gdzie ich stężenie jest jednak bardzo niskie. Wzrost pozakomórkowego stężenia aneksyn w różnych stanach patologicznych może zatem stanowić wskaźnik diagnostyczny [10-14].

Niedawno zaobserwowano, że niektóre choroby człowieka są związane z zaburzeniami syntezy i funkcji aneksyn. Choroby te określono wspólnym terminem „aneksynopatie”², po raz pierwszy użytym w 1999 roku przez J a c o b a H . R a n d a z Mount Sinai School of Medicine w Nowym Jorku [1]. Badacz ten zauważył, że udział aneksyn w pewnych stanach chorobowych może wynikać z funkcji tych

*Dr, Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

białek w wielu procesach komórkowych oraz ich zdolności do wiązania się z różnorodnymi ligandami, takimi jak jony, lipidy, nukleotydy, enzymy hydrolityczne, kinazy białkowe, kanały jonowe i białka cytoszkieletu. Z wyjątkiem aneksyny XIII, która wybiórczo oddziałuje także z fosfatydyloetanoloaminą [15], inne aneksyny w obecności jonów wapnia wiążą się przede wszystkim z fosfolipidami anionowymi (fosfatydyloseryną i kwasem fosfatydydowym), oraz kwasami tłuszczowymi (np. kwasem arachidonowym) [2]. Aneksyny oddziałują również z białkami, m.in. z

pośrednictwem receptorów purynergicznymi (P2X), komórek nabłonka wyściełającego pęcherzyki płucne, wzrasta wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} . Dzięki temu ulega aktywacji kalpaina — proteaza zależna od Ca^{2+} , która odcina 26 reszt aminokwasowych od N-końca aneksyny I. Modyfikacja ta wywołuje 10-krotny wzrost powinowactwa aneksyny do Ca^{2+} i stymuluje wydzielanie związków powierzchniowo czynnych w płucach w procesie egzocytozy, w którym uczestniczy zmodyfikowana aneksyna I [25] (Ryc. 1). Zaobserwowano również, że fosforylacji aneksyny I towarzyszy wzrost



Ryc. 1. Wpływ proteolizy na aktywność aneksyny I w komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych (pneumocytach typu II). Aneksyna I (AnxI) bierze udział w zależnym od Ca^{2+} wydzielaniu związków powierzchniowo czynnych przez komórki nabłonka płuc w procesie egzocytozy. Znak “+” oznacza aktywację. Inne wyjaśnienia zamieszczono w tekście pracy.

przedstawicielami własnej rodziny. Na przykład, aneksyna II występuje w komórkach w formie heterotetrameru zbudowanego z dwóch cząsteczek aneksyny i dwóch cząsteczek białka p11, należącego do rodziny białek S100 [16]. Ponadto, aneksyny wiążą się z białkiem pęcherzyków synaptycznych, synapsyną I [17], oddziałują z białkami G, np. dynaminą [18] i białkami regulującymi aktywność białek G, np. białkiem $p120^{GAP}$ [19, 20], oraz wiążą się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej [11] i czynnikami krzepnięcia krwi [12, 21]. Aneksyny oddziałując z białkami cytoszkieletu fodryną [22] i F-aktyną [23], modulując aktywność specyficznych proteaz [24, 25] i będąc substratami kinaz białkowych [26, 27], mogą wpływać na procesy endo- i egzocytozy, co ilustrują następujące przykłady. W wyniku pobudzenia przez ATP, za

wydzielania insuliny przez komórki beta wysepek Langerhansa trzustki [26]. Zarówno w opisanym przypadku aneksyny I, jak i aneksyny V z płytek krwi [27], fosforylacja tych białek prowadzi do wzrostu powinowactwa aneksyn w stosunku do specyficznego dla tych białek receptora błonowego i aktywacji transportu pęcherzykowego. W procesie endocytozy cząsteczek LDL w fibroblastach stwierdzono, że aneksyna VI aktywuje proteazę cysteinową, która trawi spektrynę, przyczyniając się do reorganizacji szkieletu podbłonowego tych komórek. W wyniku tej reorganizacji pęcherzyki opłaszczone klatryną, zawierające cząsteczki LDL, mogą oderwać się od błony plazmatycznej [24] (Ryc. 2).

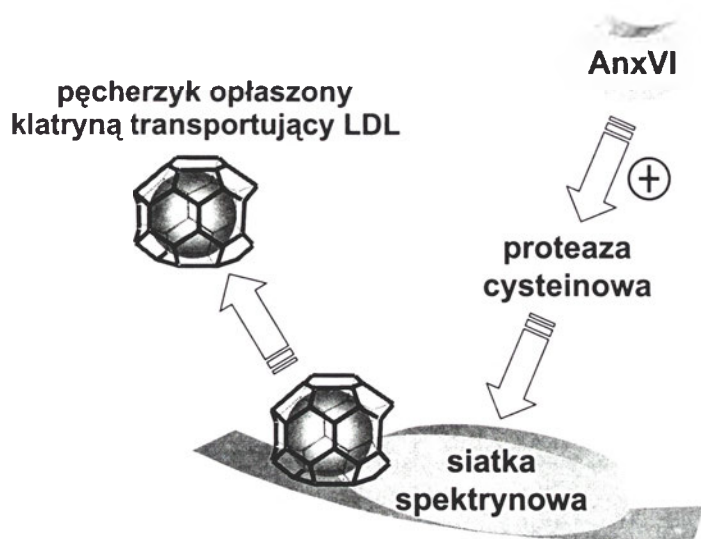
Wpływ aneksyn na błonę komórkową nie ogranicza się tylko do oddziaływania z cyto-

¹Aneksynom poświęcone były następujące artykuły, które ukazały się dotychczas w *Postęпах Biochemii*: Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1998) *Post Biochem* 44: 237-244, Danieluk M, Bandorowicz-Pikuła J (1999) *Post Biochem* 45: 177-181

²Od słów: aneksyny — białka wiążące jony wapnia i fosfolipidy i patheia (gr.) — choroba lub sposób jej leczenia

szkieletem lub określonymi cząsteczkami białek i lipidów błonowych. Oblicza się, że gdyby wszystkie aneksyny w komórce związały się z błonami, to pokryłyby połowę wszystkich cząsteczek fosfolipidów. Efekt adsorpcji cząsteczek aneksyn w

[35]. ATP i GTP, wiążąc się z aneksynami V i VI, wpływają prawdopodobnie na udział tych białek w homeostazie jonów wapnia w mięśniu sercowym [36]. Wreszcie, GTP stymuluje zdolność aneksyny VII do wywoływania fuzji błon [37, 38]. Do



Ryc. 2. Udział aneksyny VI w procesie endocytozy cząsteczek LDL w fibroblastach. Pęcherzyki transportujące cząsteczki LDL (na rycinie jako szare kule) są opłaszczone siatką klatrynową (czarne linie). Aneksyna VI aktywuje (+) proteazę cysteinową, która trawi siatkę spektrynową (siatka spektrynowa). Dzięki temu szkielet podbłonowy ulega reorganizacji i pęcherzyki transportujące cząsteczki LDL odłączają się od błony plazmatycznej.

określonym miejscu na powierzchni błony plazmatycznej, bogatym w fosfatydyloserynę, przenosi się na inne rejony błony, co zapobiega oddziaływaniu fosfolipaz lub izoform białkowej kinazy C z lipidami [28]. Dzięki tej właściwości aneksyny wpływają na metabolizm lipidów, wytwarzanie lipidowych przekaźników informacji i regulację różnych dróg przekazywania sygnałów w komórkach (np. poprzez kinazy białkowe MAPK/ERK) [29, 30]. Aneksyny oddziałują również z błonami organelli komórkowych. Aneksyna VI tworzy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanały wapniowe [31], dzięki czemu prawdopodobnie reguluje stężenie jonów wapnia w tych organellach i wpływa na ich metabolizm. Aneksyna VI, wiążąc się z błoną endosomów, uczestniczy również w transporcie pęcherzykowym [32], zaś aneksyna XIIIb, wiążąc się z błonami aparatu Golgiego, wpływa na transport białek i ich glikozylację [15].

Coraz więcej obserwacji sugeruje, że aktywność aneksyn jest regulowana przez nukleotydy. ATP i cAMP, po związaniu z aneksyną I, wpływają na zdolność tego białka do agregacji ziarnistości wydzielniczych wyizolowanych z komórek chromochłonnych rdzenia nadnerczy i do wywoływania fuzji liposomów [33, 34]. GTP, modulując aktywność aneksyny V jako kanału wapniowego w chondrocytach, reguluje skład chemiczny pęcherzyków wydzielniczych, zawierających fosforany wapnia niezbędne w mineralizacji tkanki łącznej

zakończenia stymulacji dochodzi w wyniku hydrolizy GTP, katalizowanej przez aneksynę VII i regulowanej przez jony wapnia [37, 38].

II. Zaburzenia homeostazy Ca^{2+} w mięśniu sercowym

Jak już wspomniano, wśród najważniejszych funkcji aneksyn wymienia się ich udział w homeostazie jonów wapnia, w transporcie pęcherzykowym w endo- i egzocytozie oraz w procesach obronnych organizmu. Czy w związku z tym, nieprawidłowości w funkcjonowaniu aneksyn mogą stanowić podłoże niektórych chorób? Wydaje się, że jest to możliwe. Opisano np. zależność pomiędzy rozwojem pewnych stanów chorobowych (dystrofia mięśniowa Duchenna [39]), a nieprawidłowym poziomem aneksyn w komórkach. W niniejszym artykule zostaną omówione trzy przykłady: zaburzenia homeostazy jonów wapnia w niedokrwionym mięśniu sercowym, krwawienie w niektórych typach białaczek oraz zmiany martwicze w łożysku wywołujące poronienie.

W prawidłowych komórkach serca ssaków ulegają ekspresji trzy aneksyny: aneksyna II, związana z błoną kardiomiocytu i błonami ziarn wydzielniczych, aneksyna V, występująca w cytosolu, związana z białkami linii Z, ze wstawkami, błoną plazmatyczną, jądrową i kanalików T, oraz izoformy aneksyny VI a i b, zidentyfikowane w cytosolu oraz związane z sarkolemma, z siateczką

sarkoplazmatyczną (SR) i ze wstawkami [40, 41]. W wyniku zawału mięśnia sercowego dochodzi do zmian wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia aneksyn [42]. Wzrasta stężenie tych białek w cytoplazmie, by po 24 do 48 godzinach powrócić do normalnego poziomu [36]. Zmiany poziomu aneksyn zaobserwowano również w przerosniętym mięśniu sercowym [36], w wyniku zaburzeń krążenia wieńcowego [41], a także w związku z zaburzeniami homeostazy jonów wapnia w komórce [36].

Myszy transgeniczne, u których wywołano 10-krotny wzrost syntezy aneksyny VI w kardiomiocytach (ang. *targeted expression*), charakteryzowały się przerostem mięśnia sercowego, zaburzeniami cyklu skurczowo-rozkurczowego w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi i niskim stężeniem jonów wapnia w komórkach serca [36]. U wielu tych zwierząt, w kilka tygodni po narodzinach, dochodziło nawet do zawału serca. Odwrotnie niż u myszy, którym zablokowano ekspresję aneksyny VI (ang. *null mutant*), i u których czynność serca pozostawała niezmienną [43]. Zatem w jaki sposób nadprodukcja aneksyny VI może wpływać na zaburzenia homeostazy jonów wapnia w komórkach mięśnia sercowego? Na podstawie wyników badań *in vitro*, wydaje się, że istnieją co najmniej trzy mechanizmy. Po pierwsze, aneksyny, w tym aneksyna VI, odgrywają w komórce rolę białek buforujących jony wapnia, po drugie, tworzą w błonie kanały jonowe, a po trzecie, aneksyny wpływają na inne systemy transportu Ca^{2+} w kardiomiocytach, bezpośrednio wiążąc się z tymi białkami, wpływając na te białka poprzez zmianę dynamiki błon lub modulując wytwarzanie lipidowych przekaźników informacji [29, 44, 45].

Zdolność aneksyn do wiązania Ca^{2+} i wysokie stężenie tych białek w komórkach sprawiają, że aneksyny odgrywają w komórkach rolę białek buforujących jony wapnia. Na przykład w komórkach makrofażów poddanych stresowi oksydacyjnemu, zaobserwowano wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [46]. Wzrost ten wynikał z zahamowania aktywności ATPazy wapniowej, która nie usuwała jonów wapnia z cytosolu, uszkodzenia mitochondriów, z których jony wapnia wypływały do cytoplazmy, oraz uszkodzenia błony komórkowej, na skutek czego związane z błoną cząsteczki aneksyn dysocjowywały do cytosolu, uwalniając jony wapnia [46].

Badacze niemieccy odkryli, że aneksyny są zdolne do tworzenia w błonach kanałów wapniowych zależnych od potencjału błonowego i regulowanych przez nukleotydy oraz cząsteczki

fosfolipidów. Badacze ci zidentyfikowali w cząsteczce aneksyny V, będącej najlepiej scharakteryzowanym pod tym względem przedstawicielem rodziny aneksyn, reszty aminokwasowe wrażliwe na zmiany potencjału błonowego, oraz odpowiedzialne za otwieranie lub zamykanie kanału. Określili również, które reszty aminokwasowe wyznaczają specyficzność kanału wobec Ca^{2+} [47, 48].

Stosując metodę *patch-clamp* badacze amerykańscy wykryli inny mechanizm regulacji homeostazy jonów wapnia przez aneksyny. Odkryli oni, że *in vitro* aneksyna VI wpływa na aktywność kanału uwalniającego jony wapnia z SR, wiążąc się z jego częścią eksponowaną do wnętrza cystern SR. Kanał ten będący receptorem rianodyny (RyR), to białko zbudowane z czterech identycznych podjednostek o m.c. ok. 500 kDa każda [49]. Aktywność kanału regulowana jest przez fosforylację, nukleotydy i ich pochodne, jedno- i dwuwartościowe kationy oraz białka (kalmodulinę, FKBP12 i kaleksycytnę) [50, 51].

Innym białkiem transportującym jony wapnia, z którym mogłyby oddziaływać aneksyny, jest wymienniacz sól/wapń. Białko to występuje w trzech izoformach. Izofорма NCX1 ulega ekspresji w mięśniu sercowym [52]. Aktywność tej izoformy jest regulowana przez zmiany potencjału błonowego, hormony, fosforylację, nukleotydy, a także przez białka (SCPR i aneksynę VI) [36, 52, 53]. Ponieważ aktywność wymiennicza zależy od asymetrycznego rozmieszczenia aminofosfolipidów w błonie, utrzymywanego przez translokację aminofosfolipidów, przypuszcza się, że aneksyna VI, mająca zdolność oddziaływania z anionowymi fosfolipidami, wpływa pośrednio na aktywność wymiennicza, zmieniając strukturę błon [36]. W podobny sposób aneksyny mogłyby regulować aktywność ATPazy wapniowej z błony plazmatycznej. Jest to białko aktywnie usuwające jony wapnia z cytosolu. Aktywność ATPazy jest regulowana przez fosforylację, oligomeryzację, nukleotydy, fosfolipidy, a także przez białka (np. kalmodulinę) [54, 55].

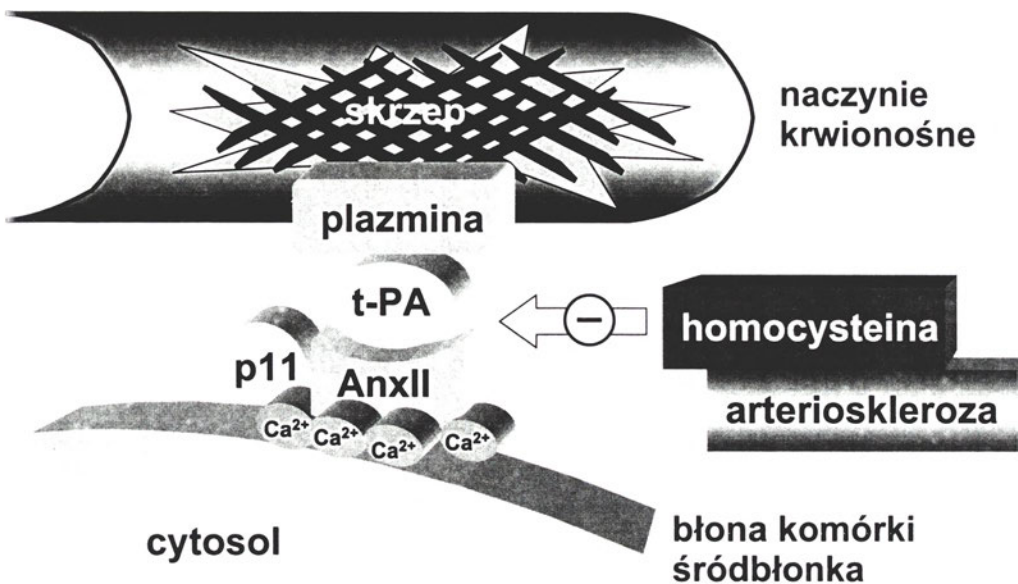
III. Aneksyny w układzie krwionośnym

Na podstawie dotychczas zebranych informacji można wysunąć przypuszczenie, że niektóre aneksyny funkcjonują w komórce nie tylko jako białka buforujące, ale także jako białka regulacyjne. Potwierdzeniem takiej funkcji aneksyn są właściwości aneksyny II, która odgrywa ważną rolę w hemostazie, mechanizmie kontrolującym prawidłowy przepływ krwi przez naczynia krwionośne,

krzepnięcie krwi i rozpuszczanie skrzepu (fibrinoliza) [12, 56].

W powstawaniu skrzepu bierze udział ponad 30 rodzajów makrocząsteczek. Podstawową rolę w tym procesie odgrywają czynniki krzepnięcia, proteazy, które ulegają aktywacji w wyniku proteolizy, oraz

śródbłonna poprzez aneksynę II w kompleksie z białkiem p11 (Ryc. 3). AnxII zapobiega także oddziaływaniu t-PA i powstającej z plazminogenu plazminy z ich fizjologicznymi inhibitorami, PAI-1 i α_2 -antyplazminą [63]. Jednym z czynników, który hamuje powstawanie kompleksu AnxII-t-PA i w



Ryc. 3. Udział aneksyny II w procesie fibrinolizy. Rycina przedstawia schematycznie, w jaki sposób aneksyna II (AnxII) w kompleksie z białkiem p11 i jonami wapnia bierze udział w zakotwiczeniu plazminy i tkankowo-specyficznego aktywatora plazminogenu (t-PA) na powierzchni błony komórki śródbłonna wyściełającego naczynia krwionośne. Homocysteina zapobiega powstawaniu tego kompleksu (-), co może prowadzić do arteriosklerozy. Inne objaśnienia w tekście pracy.

ich naturalne inhibitory [57-59]. Dzięki współdziałaniu proteaz protrombina jest trawiona do trombiny, która z kolei hydrolizuje fibrynogen, przekształcając go w fibrynę. Cząsteczki fibryny polimeryzują w długie łańcuchy, tworząc osnowę skrzepu. W osnowie tej zostają uwięzione krwinki oraz płytki krwi. Jednocześnie dochodzi do skurczu ścian naczynia krwionośnego, żeby zredukować przepływ krwi przez uszkodzone miejsce. Równie ważnym procesem jest następnie rozpuszczenie skrzepu, czyli fibrinoliza, która zapewnia drożność naczyń krwionośnych. Produkty degradacji skrzepu są transportowane do wątroby, gdzie zachodzi m.in. resynteza czynników krzepnięcia krwi [60].

Aneksyny występują w komórkach śródbłonna wyściełającego naczynia krwionośne w stężeniu 2,5 mg/ml. W osoczu stężenie aneksyn jest 50 tysięcy razy niższe [61]. Komórki śródbłonna wydzielają hormony i peptydy, a ich błony komórkowe zawierają cząsteczki fosfatydyloseryny, które sprzyjają powstawaniu skrzepu. W procesie krzepnięcia biorą udział także płytki krwi, wydzielające ADP; ADP stanowi ważną cząsteczką sygnałową [62]. Z komórek śródbłonna pochodzi tkankowo-specyficzny aktywator plazminogenu (t-PA), który stymuluje przekształcenie plazminogenu w plazminę. Plazmina trawi polimery fibryny. W procesie fibrinolizy kluczowym etapem jest związanie t-PA i plazminogenu z błoną komórki

konsekwencji fibrinolizę jest homocysteina, produkt demetylacji metioniny. Wzrost stężenia homocysteiny w cytosolu jest uważany za czynnik wzmożonego ryzyka w chorobie wieńcowej [61].

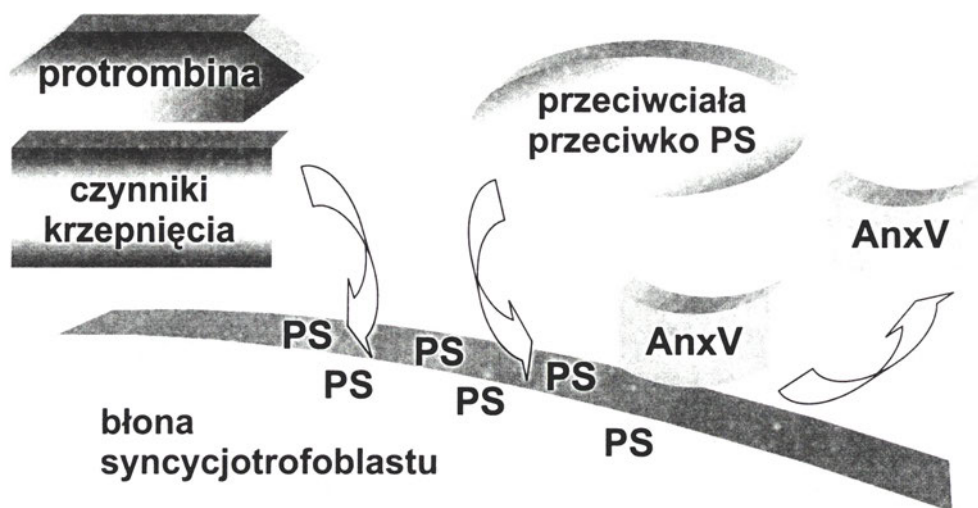
IV. Aneksyny — tarcza ochronna w łożysku

Aneksyny przeciwdziałają powstawaniu skrzepów, oddziałując z czynnikami krzepnięcia krwi i tworząc mechaniczną barierę zapobiegającą wiązaniu się tych czynników z błoną. Ta właściwość aneksyn jest bardzo istotna w łożysku. Łožysko rozwija się z kosmówki zarodkowej i błony śluzowej macicy w 3 miesiącu ciąży. Powierzchnia łożyska od strony macicy jest bardzo rozbudowana. Tworzą ją kosmki, które kontaktują się z krwią matki, ale dzięki nim krew matki i krew płodu nie mieszają się. W łożysku występują wszystkie rodzaje aneksyn spotykane w organizmie człowieka, w tym aneksyna V, łącznie stanowiąc 2% wszystkich białek [1, 2, 64].

Obraz mikroskopowy kosmka łożyskowego uwidacznia warstwę trofoblastów oraz powstałych z nich syncycjotrofoblastów. Błona syncycjotrofoblastu omywana jest krwią matki. Na jej powierzchni zlokalizowana jest aneksyna V, która tworzy barierę przeciwdziałającą kontaktowi czynników krzepnięcia krwi z fosfatydyloseryną, a więc zapobiegającą powstawaniu skrzepu (Ryc. 4). W chorobie Hughesa, w której organizm wytwarza przeciwciała przeciwko

cząsteczkom fosfatydyloseryny, dochodzi do powstawania skrzepów w łożysku, co prowadzi do martwicy płodu i poronienia. Stwierdzono, że jedną z przyczyn tych zmian patologicznych jest 4-krotne obniżenie poziomu syntezy aneksyny V i zaburzenia wewnątrzkomórkowego transportu białka, czego

prostaty wzrostowi syntezy aneksyny I towarzyszył rozwój fenotypu MDR, czyli oporności wielolekowej. Tylko w nielicznych przypadkach, jak np. czerniaka, wzrost stężenia aneksyny VI był skorelowany z zahamowaniem rozwoju nowotworu [68]. Niewątpliwym przełomem będzie prowadzenie



Ryc. 4. Aneksyna V pełni funkcję ochronną, zapobiegając powstawaniu skrzepów w łożysku. Na rycinie pokazano, w jaki sposób przeciwciała przeciwko fosfatydyloserynie (PS) niszczą warstwę ochronną, utworzoną przez cząsteczki aneksyny V (AnxV) na powierzchni błon syncycjotrofoblastów w łożysku. W wyniku zniszczenia warstwy ochronnej czynniki krzepnięcia krwi (protrombina i inne) mogą wiązać się z błonami, co prowadzi do powstawania skrzepów, rozwoju martwicy i w konsekwencji poronienia. Inne objaśnienia w tekście pracy.

wynikiem jest 1000-krotny spadek liczby cząsteczek aneksyny V na powierzchni błony syncycjotrofoblastu w porównaniu z normą [1, 65]. Dodatkowo, przeciwciała przeciwko fosfatydyloserynie zapobiegają wiązaniu się aneksyny V z błoną [1, 65].

Aneksyny, wydzielane na zewnątrz komórki, mają również związek z pewnymi stanami chorobowymi, np. biorą udział w infekcji wirusowej, uczestnicząc w procesie endocytozy cząsteczek cytomegalowirusa [66] lub stanowiąc receptory dla wirusa żółtaczkowego typu B [2].

V. Uwagi końcowe

W niniejszym artykule omówiono przykłady stanów patologicznych, którym towarzyszą zmiany funkcji lub tempa syntezy i degradacji aneksyn. Wydaje się, że przykłady te usprawiedliwiają wyróżnienie nowego rodzaju chorób — aneksynopatii. Aneksyny, wpływając na metabolizm lipidów i powstawanie lipidowych przekaźników informacji, mogą przyczyniać się do rozwoju astmy [67]. Dobrym przykładem związku aneksyn z pewnymi schorzeniami są zmiany ekspresji genów kodujących aneksyny w nowotworach niektórych typów. W przypadku raka wątroby, trzustki i piersi zaobserwowano zbieżność zjawisk rozwoju nowotworu i wzmożonej syntezy aneksyn I i II. W przypadku raka

badań nad wykorzystaniem aneksyn dla celów diagnostycznych, np. rozwoju nowotworu, anemii sierpowatej i w transplantologii. Szczególnie w tym ostatnim przypadku, aneksyny znakowane technetem⁹⁹ mogą być użyte do rozpoznawania komórek ulegających apoptozie w przeszczepionym organie, a więc przyczynić się do oceny możliwości odrzucenia przeszczepu. Jest to metoda mniej inwazyjna, niż dotąd stosowane biopsje [69, 70].

Podsumowując, wypada zadać pytanie: czy będzie możliwe zapobieganie lub leczenie aneksynopatii? Wiadomo już, że przy pomocy związków farmakologicznych, pochodnych benzodiazepiny, można wpływać *in vitro* na aktywność aneksyn jako kanałów jonowych [71, 72]. Ze względu na właściwość aneksyn polegającą na zapobieganiu powstawania skrzepów i stymulacji fibrynolizy, można przewidywać zastosowanie aneksyn jako szczepionek. Ostatecznym rozwiązaniem może okazać się zmiana poziomu aneksyn w określonych typach komórek, z zastosowaniem glikokortykoidów lub metod inżynierii genetycznej. Jednak bez dogłębnego zrozumienia właściwości i funkcji aneksyn wszystkie wymienione metody będą obarczone ryzykiem powstania efektu ubocznego, który może zniweczyć wysiłki lekarzy zmierzające do wyeliminowania aneksynopatii ze spisu chorób trapiących ludzkość.

Podziękowanie

Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego nr 6 P04A 027 14 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Artykuł otrzymano 24 stycznia 2000 r.

Zaakceptowano do druku 4 maja 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Rand JH (1999) *N Engl J Med* **340**: 1035-1036
2. Raynal P, Pollard HB (1994) *Biochim Biophys Acta* **1197**: 63-93
3. Gerke V, Moss SE (1997) *Biochim Biophys Acta* **1357**: 129-154
4. Morgan RO, Bell DW, Testa JR, Fernandez MP (1998) *Genomics* **48**: 100-110
5. Morgan RO, Bell DW, Testa JR, Fernandez MP (1999) *Gene* **227**: 33-38
6. Morgan RO, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Balsara BR, Testa JR, Fernandez MP (1999) *Genomics* **60**: 40-49
7. Benz J, Hofmann A (1997) *Biol Chem* **378**: 177-183
8. Liemann S, Huber R (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**: 516-521
9. Bandorowicz-Pikuła J (1997) *Kosmos* **46**: 625-633
10. Thorin B, Gache G, Dubois T, Grataroli R, Domingo N, Russo-Marie F, Lafont H (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 1039-1045
11. Siever DA, Erickson HP (1997) *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1219-1223
12. Kassam G, Choi KS, Ghuman J, Kang HM, Fitzpatrick SL, Zackson T, Toba M, Shinomiya A, Waisman DM (1998) *J Biol Chem* **273**: 4790-4799
13. Hall SE, Lim S, Witherden IR, Tetley TD, Barnes PJ, Kamal AM, Smith SF (1999) *Am J Physiol* **276**: L114-L121
14. Wang X, Campos B, Kaetzel MA, Dedman JR (1999) *Am J Obstet Gynecol* **180**: 1008-1016
15. Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K (1998) *J Cell Biol* **142**: 1413-1427
16. Hajjar KA, Menell JS (1997) *Ann N Y Acad Sci* **811**: 337-349
17. Inui M, Watanabe T, Sobue K (1994) *J Neurochem* **63**: 1917-1923
18. Turpin E, Russo-Marie F, Dubois T, de Paillerets C, Alfsen A, Bomsel M (1998) *Biochim Biophys Acta* **1402**: 115-130
19. Davis AJ, Butt JT, Walker JH, Moss SE, Gawler DJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 24333-24336
20. Chow A, Davis AJ, Gawler DJ (1999) *Cell Signal* **11**: 443-451
21. Hajjar KA, Jacovina AT (1998) *J Investig Med* **46**: 364-369
22. Watanabe T, Inui M, Chen B Y, Iga M, Sobue K (1994) *J Biol Chem* **269**: 17656-17662
23. Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH (1999) *Exp Cell Res* **251**: 185-193
24. Kamal A, Ying Y, Anderson RG (1998) *J Cell Biol* **142**: 937-947
25. Liu L, Fisher AB, Zimmerman UJ (1995) *Biochem Mol Biol Int* **36**: 373-381
26. Ohnishi M, Tokuda M, Masaki T, Fujimura T, Tai Y, Itano T, Matsui H, Ishida T, Konishi R, Takahara J i inni (1995) *Endocrinology* **136**: 2421-2426
27. Trotter J, Orchard MA, Walker JH (1997) *Biochem J* **328**: 447-452
28. Kaetzel MA, Dedman JR (1995) *News Physiol Sci* **10**: 171-176
29. Russo-Marie F (1999) *Clin Chem Lab Med* **37**: 287-291
30. Alldridge LC, Harris HJ, Plevin R, Hannon R, Bryant CE (1999) *J Biol Chem* **274**: 37620-37628
31. Diakonova M, Gerke V, Ernst J, Liautard JP, van der Vusse G, Griffiths G (1997) *J Cell Sci* **110**: 1199-1213
32. Pol A, Ortega D, Enrich C (1997) *Biochem J* **327**: 741-746
33. Cohen BE, Lee G, Arispe N, Pollard HB (1995) *FEBS Lett* **377**: 444-450
34. Han H-Y, Lee Y-H, Oh J-Y, Na B-S, Lee B-J (1998) *FEBS Lett* **425**: 523-527
35. Arispe N, Rojas E, Genge BR, Wu LN, Wuthier RE (1996) *Biophys J* **71**: 1764-1775
36. Guntjeski-Hamblin A-M, Song G, Walsh RA, Frenzke M, Boivin GP, Doorn 2nd GV, Kaetzel MA, Horseman ND, Dedman JR (1996) *Am J Physiol* **270**: H1091-H1100
37. Caohuy H, Srivastava M, Pollard HB (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10797-10802
38. Pollard HB, Caohuy H, Minton AP, Srivastava M (1998) *Adv Pharmacol* **42**: 81-87
39. Selbert S, Fischer P, Menke A, Jockusch H, Pongratz D, Noegel AA (1996) *Exp Cell Res* **222**: 199-208
40. Luckcuck T, Trotter PJ, Walker JH (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 622-628
41. Trouve P, Legot S, Belikova I, Marotte F, Benevolensky D, Russo-Marie F, Samuel JL, Charlemagne D (1999) *Am J Physiol* **276**: H1159-H1166
42. Matteo RG, Schomisch-Moravec C (2000) *Cardiovasc Res* **45**: 961-970
43. Hawkins TE, Roes J, Rees D, Monkhouse J, Moss SE (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 8028-8032
44. Frey B M, Reber B F X, Vishwanath B S, Escher G, Frey F J (1999) *FASEB J* **13**: 2235-2245
45. Srivastava M, Atwater I, Glasman M, Leighton X, Goping G, Caohuy H, Miller G, Pichel J, Westphal H, Mears D, Rojas E, Pollard HB (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13783-13788
46. Hoyal CR, Thomas AP, Forman HJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 29205-29210
47. Demange P, Voges D, Benz J, Liemann S, Göttig P, Berendes R, Burger A, Huber R (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 272-276
48. Burger A, Voges D, Demange P, Perez CR, Huber R, Berendes R (1994) *J Mol Biol* **237**: 479-499
49. Diaz-Muñoz M, Hamilton SL, Kaetzel MA, Hazarika P, Dedman JR (1990) *J Biol Chem* **265**: 15894-15899
50. Szewczyk A, Pikuła S (1998) *Biochim Biophys Acta* **1365**: 333-353
51. Nelson TJ, Cavallaro S, Yi CL, McPhie D, Schreurs BG, Gusev PA, Favit A, Zohar O, Kim J, Beushausen S, Ascoli G, Olds J, Neve R, Alkon DL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13808-13813
52. Wrzosek A (1999) *Pol J Pharmacol* **51**: 187-200
53. Jones PG, Fitzpatrick S, Waisman DM (1994) *Biochemistry* **33**: 8180-8187
54. Carafoli E (1997) *Basic Res Cardiol* **92**: 59-61
55. Guerini D, Garcia-Martin E, Zecca A, Guidi F, Carafoli E (1998) *Acta Physiol Scand Suppl* **643**: 265-273
56. Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA (1999) *N Engl J Med* **340**: 994-1004
57. Coughlin SR (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11023-11027
58. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G (1999) *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 741-746
59. Huisman MV, Rosendaal F (1999) *Curr Opin Hematol* **6**: 291-297
60. Hajjar KA (1995) *Curr Opin Hematol* **2**: 345-350
61. Hajjar KA, Jacovina AT (1998) *J Investig Med* **46**: 364-369

62. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Kim YB, Kunapuli S P (1999) *Tromb Haemost* **82**: 1322-1326
63. Kassam G, Le BH, Choi KS, Kang HM, Fitzpatrick SL, Louie P, Waisman D M (1998) *Biochemistry* **37**: 16958-16966
64. Rote NS, Vogt E, De Vere G, Obringer AR, Ng AK (1998) *Am J Reprod Immunol* **39**: 125-136
65. Levy RA, Avvad E, Oliveira J, Porto LC (1998) *Lupus* **7**: S81-S85
66. Raynor CM, Wright J F, Waisman DM, Pryzdial EL (1999) *Biochemistry* **38**: 5089-5095
67. Van Hal PT, Overbeek S E, Hoogsteden HC, Zijstra FJ, Murphy K, Oosterhoff Y, Postma DS, Guz A, Smith SF (1996) *J Appl Physiol* **8**: 548-555
68. Bastian B C (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**: 554-556
69. Vriens PW, Blankenberg FG, Stoot JH, Ohtsuki K, Berry GJ, Tait JF, Strauss HW, Robbins RC (1998) *J Thorac Cardiovasc Surg* **116**: 844-853
70. Blankenberg F, Narula J, Strauss HW (1999) *J Nucl Cardiol* **6**: 531-539
71. Kaneko N, Ago H, Matsuda R, Inagaki E, Miyano M (1997) *J Mol Biol* **274**: 16-20
72. Hofmann A, Escherich A, Lewit-Bentley A, Benz J, Raguene-Nicol C, Russo-Marie F, Gerke V, Moroder L, Huber R (1998) *J Biol Chem* **273**: 2885-2894

Rola urokinazowego układu aktywacji plazminogenu w angiogenezie

Role of urokinase plasminogen activation system in angiogenesis

BEATA SMOLARZ¹, JANUSZ BŁASIAK², ANDRZEJ KULIG³

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Mechanizmy angiogenezy
- III. Angiogeneza w nowotworach złośliwych
- IV. Urokinazowy szlak aktywacji plazminogenu
- V. Aktywacja plazminogenu a angiogeneza
 - V-1. Znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w nowotworach złośliwych
 - V-2. Regulacja ekspresji genów
 - V-3. Hamowanie angiogenezy
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Mechanisms of angiogenesis
- III. Angiogenesis in cancer
- IV. Urokinase pathway of plasminogen activation
- V. Plasminogen activation and angiogenesis
 - V-1. Diagnostic and prognostic potential in cancer
 - V-2. Gene expression regulation
 - V-3. Angiogenesis inhibition
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; ECM — macierz zewnątrzkomórkowa; HGF — czynnik wzrostu hepatocytów; *HoxD3* — gen z rodziny genów *Hox* kodujących czynniki transkrypcyjne; IL — interleukiny; IMD — gęstość mikronaczyń; LTBP — białko wiążące utajoną formę transformującego czynnika wzrostowego β ; MMP — metaloproteazy macierzowe; PAI-1, PAI-2 i PAI-3 — inhibitory aktywatorów plazminogenu typu 1, 2 i 3; PEX — C-końcowy fragment MMP-2; PIGF — czynnik wzrostu łożyska; PPAR γ — receptor czynnika aktywującego proliferację peroksisomów typu γ ; Src — kinaza tyrozynowa o M_{cz} 60kDa; TGF β — transformujący czynnik wzrostowy β ; tPA — aktywator plazminogenu typu tkankowego; uPA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego, urokinaza; uPAR — receptor urokinazy; VEGF — naczyniowy czynnik wzrostowy śródbłonna; *VHL* — gen supresorowy kodujący białka biorące udział w adhezji komórek, jego inaktywacja powoduje zwiększenie migracji komórek rakowych.

I. Wprowadzenie

Formowanie naczyń krwionośnych obejmuje dwa rozdzielone w czasie procesy: różnicowanie *in situ* prekursorowych komórek mezodermalnych do

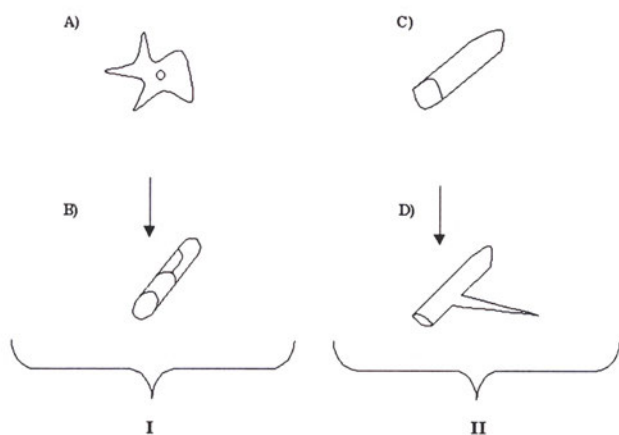
komórek śródbłonna, które stopniowo formują pierwotne naczynia kapilarne, oraz ich wydłużeniowy wzrost, w wyniku którego powstają charakterystyczne kielkowane struktury (Ryc. 1). Wszystkie komórki śródbłonna biorące udział w tworzeniu naczyń są pochodzenia mezodermalnego i wywodzą się albo z angioblastów, albo z hemangioblastów [1, 2].

Tworzenie naczyń pierwotnych jest ograniczone do fazy wczesnego rozwoju embrionalnego, podczas gdy angiogeneza zachodzi zarówno w rozwoju zarodkowym jak i w późniejszych etapach. W okresie zarodkowym angiogeneza rozpoczyna się wówczas, gdy dyfuzja substancji odżywczych do wnętrza zarodka przestaje funkcjonować. Narządy pochodzenia endodermalnego, takie jak trzustka i płuca, podlegają unaczynieniu pierwotnemu, podczas gdy w nerkach i ośrodkowym układzie nerwowym oprócz naczyń pierwotnych rozwijają się także naczynia procesu angiogenezy [1, 2].

W rozwoju postembrionalnym angiogeneza przyczynia się do utrzymania strukturalnej integralności organizmu. Cykliczny charakter wzrostu naczyń jest konieczny w jajnikach, endometrium, czy też łożysku i gruczołach mlekowych podczas ciąży. W warunkach prawidłowych proces angiogenezy trwa około 1000 dni, jednakże w pewnych

¹Mgr, ²dr hab., Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Banacha 12/16, 90-237 Łódź; ³prof. dr hab., Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź.

przypadkach, na przykład podczas gojenia ran, tworzenie naczyń postępuje bardzo szybko — około



Ryc. 1. Główne etapy formowania nowych naczyń krwionośnych.

- I. Formowanie naczyń pierwotnych obejmujące wytworzenie komórek śródbłonna (B) z komórek mezodermalnych (A).
 II. Angiogeneza: komórki śródbłonna rosną wydłużają się (C) i tworzą odgałęzienia przybierające formę kielków (D).

5 dni [3]. Proces ten zachodzi w wyniku oddziaływań elementów znajdujących się na powierzchni komórek śródbłonkowych ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM): fibronektyną, fibryną i witronektyną. Ważną rolę podczas odbudowy uszkodzonych tkanek w miejscu zranienia odgrywa receptor integrynowy $\alpha_v\beta_3$ wiążący białka adhezyjne [4].

Tabela 1

Angiogeneza w warunkach fizjologicznych i patologicznych

Warunki fizjologiczne	Warunki patologiczne
A) Rozwój:	— Wzrost i progresja nowotworów
— układu sercowo-naczyniowego	— Postępująca arterioskleroza
— unaczynienia organów: mózgu, nerek, narządów miękkich	— Dolegliwości reumatyczne
B) Regulacja fizjologiczna:	— Choroby gałki ocznej
— cykli hormonalnych	
— ciąży: tworzenie łożyska i gruczołów mlecznych	
— gojenie ran, naprawa uszkodzonych tkanek	

Oprócz udziału w prawidłowym rozwoju, angiogeneza występuje w wielu stanach patologicznych organizmu (Tabela 1). Podczas transformacji nowotworowej proces angiogenezy uwalnia się spod mechanizmów kontrolnych, a powstające naczynia umożliwiają przemieszczanie komórek transformowanych, co prowadzi do przejścia nowotworu z formy łagodnej w złośliwą [5]. Angiogeneza nowotworowa uruchamia kaskadę oddziaływań pomiędzy składnikami różnych układów biologicznych.

II. Mechanizmy angiogenezy

Rozwojowi nowych struktur naczyniowych z kapilar pierwotnych towarzyszą zmiany procesów adhezyjnych i proteolitycznych. Przed rozpoczęciem angiogenezy komórki śródbłonna muszą ulec aktywacji, po której zaczynają oddziaływać z ECM. W oddziaływaniu tym biorą udział głównie receptory integrynowe, umożliwiające wytworzenie połączeń pomiędzy ECM i cytoszkieletem [6]¹. Uznany marker stopnia unaczynienia tkanek jest receptor integrynowy $\alpha_v\beta_3$. Przeciwciała monoklonalne anty- $\alpha_v\beta_3$ mogą hamować tworzenie naczyń stymulowane przez czynniki angiogenne bFGF oraz TNF α [7]. Nie zaobserwowano natomiast hamującego wpływu tych przeciwciał na proces formowania naczyń pierwotnych. Receptor $\alpha_v\beta_3$ może być zatem celem terapii w chorobach przebiegających z tworzeniem nowych naczyń [7]. Podczas angiogenezy receptory integrynowe współdziałają z proteazami, które umożliwiają degradację elemen-

¹Udział receptorów integrynowych w adhezji komórek został omówiony w *Postęпах Biochemii* 45(2)1999

tów błony podstawnej i ECM. Po miejscowym strawieniu błony podstawnej, komórki śródbłonna przemieszczają się i dopasowują swe wzajemne położenia, tworząc strukturę o kształcie kielka, która ze stanu spoczynku szybko przechodzi w stan wzrostu [5]. Zahamowanie proteolizy i dojrzewanie nowego naczynia następuje w wyniku współdziałania integryny $\alpha_v\beta_3$ i domeny PEX (domeny przypominającej hemopeksynę) obejmującej C-końcowy fragment metaloproteazy macierzowej MMP-2. W nowotworach złośliwych forma PEX może występować w kompleksie z integryną $\alpha_v\beta_3$. PEX podczas rozwoju nowotworu oddziałuje z integrynami $\alpha_v\beta_3$ znajdującymi się na powierzchni komórek śródbłonna, regulując formowanie naczyń wzrastającego guza [8].

III. Angiogeneza w nowotworach złośliwych

Istotnym etapem w progresji nowotworów złośliwych jest wytworzenie nowych naczyń krwionośnych, zaopatrujących komórki nowotworowe w substancje odżywcze i odprowadzających produkty przemian metabolicznych [9]. Wzrost nowych naczyń postępuje równolegle z rozwojem nowotworu i skupia się w jego częściach peryferyjnych. Podobnie jak w rozwoju embrionalnym, w rosnącym guzie nowotworowym zaopatrywanie komórek w substancje odżywcze na drodze dyfuzji staje się z czasem niewystarczające i pojawia się konieczność stworzenia przez guz własnej sieci naczyń krwionośnych. Badania mysich i szczurzych linii komórkowych raka sutka wykazały, że już guz nowotworowy wielkości 60-80 komórek wykazuje unaczynienie pierwotne. Po przekroczeniu przez rosnącą populację komórek rakowych takiego rozmiaru, jej rozwój wymaga udziału sąsiednich komórek śródbłonna, które stają się głównymi elementami uczestniczącymi w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych. Poszczególne komórki rakowe wydzielając substancje chemotaktyczne stymulują komórki śródbłonna do migracji. W przypadku guza, który obejmuje skupisko 100-300 komórek obserwuje się obecność w pełni ukształtowanych mikrokapilar naczyniowych [10]. W procesie wzrostu guza wyróżnić zatem można dwie fazy: przednaczyniową oraz naczyniową, obejmującą formowanie naczyń pierwotnych i etap powstawania w pełni ukształtowanych dojrzałych kapilar. Faza przednaczyniowa ma charakter ograniczony ze względu na barierę, jaką stanowi powierzchnia guza dla dyfuzji składników odżywczych i katabolitów, natomiast faza naczyniowa jest

fazą szybkiego wzrostu o charakterze eksponencyjnym [11, 12].

Komórki nowotworowe i śródbłonkowe mogą uwalniać wiele czynników regulujących angiogenezę. Podczas rozwoju nowotworu dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy aktywatorami i inhibitorami angiogenezy, wywołującego wzrost aktywności komórek nowotworowych, komórek zmienionych zapalnie i składników ECM. Zmiany te są następstwem oddziaływania parakrynnego substancji angiogennych. Ich oddziaływanie endokrynnie przejawia się zmianą w poziomie czynników regulujących angiogenezę, natomiast działanie autokrynnie powoduje wzrost aktywności komórek śródbłonna podczas rozwoju nowotworu [13].

Czynniki angiogenne, oprócz czynników wzrostowych o działaniu naczyniotwórczym, wywierają działanie mitogenne na komórki śródbłonna oraz niektóre komórki nowotworowe (Tabela 2). Wśród substancji, wywierających wpływ na aktywację komórek śródbłonna, są zarówno aktywatory i inhibitory wytwarzane przez komórki prawidłowe i nowotworowe. Niektóre czynniki angiogenne mogą pobudzać komórki śródbłonna w sposób pośredni przez stymulację komórek gospodarza i makrofagów do produkcji i uwalniania czynników wzrostowych takich jak: transformujący czynnik wzrostowy (TGF), płytkowy czynnik wzrostowy (PDGF), czy też czynnik martwicy nowotworów (TNF). Ruchliwość komórek jest stymulowana przez angiogenne czynniki wzrostu — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) i naczyniowy czynnik wzrostowy śródbłonna (VEGF) [14]. Oprócz VEGF wykryto dwa inne czynniki wzrostowe śródbłonna — VEGF-B i VEGF-C [15], stymulujące angiogenezę w procesie formowania łożyska. Czynniki VEGF i bFGF działają synergistycznie w indukowaniu angiogenezy zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. [14]. Wiadomo, że wzrost komórek syntetyzujących VEGF podczas angiogenezy nowotworowej może zostać zahamowany w wyniku inaktywacji kinazy Src, będącej produktem onkogenu *Src* (ang. *sarcoma*, lub *chicken sarcoma*), która ochrania komórki śródbłonna przed apoptozą [16]. Aktywność czynnika angiogennego VEGF jest regulowana przez jego receptor Flt-1 [17].

W przeciwieństwie do VEGF i FGF, transformujący czynnik wzrostowy β (TGF β) i czynnik martwicy nowotworów α (TNF α) hamują wzrost komórek śródbłonna *in vitro*, dlatego określane są one jako negatywne regulatory angiogenezy [18]. Mogą one jednak stymulować angiogenezę

pośrednio, a to przez pobudzenie wytwarzania aktywatorów w komórkach zmienionych zapalnie. Dlatego też czynniki TGF β i TNF α można uznać za aktywatory i inhibitory angiogenezy (Tabela 2). Co więcej, także takie cytokiny jak czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), interleukiny IL-1, IL-6 i IL-12, interferon oraz czynnik wzrostu łożyska (PIGF) w

Spośród czynników stymulujących angiogenezę nowotworową istotne znaczenie mają składniki układu aktywacji plazminogenu, wytwarzane zarówno przez komórki rakowe jak i śródbłonkowe [20]. Składniki tego układu odgrywają szczególną rolę w pierwszych etapach angiogenezy, w których następuje degradacja elementów ECM i błony

Tabela 2

Czynniki regulujące angiogenezę

Aktywatory	Inhibitory
1. Czynniki wzrostowe — kwaśny fibroblastyczny czynnik wzrostowy (aFGF) — zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostowy (bFGF) — czynnik wzrostowy hepatocytów (HGF) — czynnik wzrostowy łożyska (PGF) — naczyniowy czynnik wzrostowy śródbłonka (VEGF) — płytkowy czynnik wzrostowy śródbłonka (PDEGF) — transformujący czynnik wzrostowy α (TGF α) — transformujący czynnik wzrostowy β (TGF β) 2. Cytokiny — czynnik martwicy nowotworów α (TNF α) — IL-1, IL-6, IL-12 — czynnik stymulujący granulocyty G-CSF — czynnik wzrostu łożyska PIGF — proliferyna 3. Enzymy — angiogenina — heparynaza 4. Inne czynniki — pleotropina — prostaglandyny E1, E2 — czynnik przepuszczalności naczyń (VPF) — składniki układu aktywacji plazminogenu (uPA, uPAR, PAI-1) — hialuronian	1. Hamujące proliferację i chemotaksję — angiostatyna — trombospondyna-1 — czynnik płytkowy 4 — tkankowy inhibitor metaloproteiny-2 (TIMP-2) — prolaktyna — transformujący czynnik wzrostowy b — interferon α (IFN α) 2. Hamujące chemotaksję — TIMP-1 — chemokiny C-X-C a) interleukina 8 (IL-8) b) IP-10, gro- β 3. Inne — TNF α — inhibitor chrząstkowy (CDI) — heparynaza — interferon β (IFN β) — protamina — TIMP-3 — receptor czynnika aktywującego proliferację peroksydomów γ (PPAR γ) — hialuronian

określonych warunkach regulują angiogenezę. Podobnie chemokiny, takie jak czynnik płytkowy IV, białko IP-10 indukujące produkcję interferonu i białka gro- β mogą kontrolować angiogenezę, prawdopodobnie przez jej hamowanie przez zwiększenie ekspresji IL-12, która z kolei obniża ekspresję bFGF [18].

W regulacji procesu angiogenezy uczestniczą także substancje nie będące ani cytokinami ani chemokinami, takie jak: składniki ECM, czynniki fibrynolityczne, fragmenty trombospondyny, angiostatyny, hialuronianu, prostaglandyny, angiogenina oraz inhibitory metaloproteaz macierzowych [19].

podstawnej, co umożliwia migrację komórek śródbłonka i formowanie naczyń. Białka układu aktywacji plazminogenu uważa się za czynniki angiogenne, a ich rola szczególnie dobrze została udokumentowana w przypadku nowotworu gruczołu piersiowego [21].

IV. Urokinazowy szlak aktywacji plazminogenu

Głównymi składnikami układu aktywacji plazminogenu są: aktywatory plazminogenu typu urokinazowego (uPA, urokinaza) i tkankowego

(tPA), receptor urokinazy, uPAR oraz inhibitory aktywatorów typu 1 (PAI-1) i 2 (PAI-2) [22-26]².

Urokinaza jest proteazą serynową o masie 55 kDa, zbudowaną z 411 reszt aminokwasowych. Centrum aktywne znajduje we fragmencie C-końcowym cząsteczki, natomiast fragment N-końcowy zawiera domenę *kringle* i domenę o strukturze nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) [27-29]. uPA może łączyć się ze swym receptorem powierzchniowym, uPAR. uPAR jest białkiem syntetyzowanym jako cząsteczka zbudowana z 355 aminokwasów, która w toku dojrzewania ulega przekształceniu do łańcucha zawierającego 283 aminokwasy [30]. Jest on zbudowany jest z trzech domen o podobnej strukturze; struktura domenowa ma zasadnicze znaczenie dla wiązania uPA [31].

Aktywność uPA jest regulowana przez inhibitory aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1), typu 2 (PAI-2), typu 3 (PAI-3) oraz proteazę neksynową. Kompleksy uPA-inhibitor są internalizowane przez komórki w procesie zależnym także od uPAR. Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 jest glikoproteiną o masie 50 kDa [32]. Cząsteczka jednołańcuchowa PAI-1 zawiera 379 reszt aminokwasowych. PAI-1 syntetyzowany jest głównie przez komórki śródbłonna, megakariocyty, komórki naczyniowe mięśni gładkich i komórki wątroby.

Geny kodujące białka układu aktywacji plazminogenu są polimorficzne; znanych jest obecnie 9 form polimorficznych *PAI-1* [33, 34], dwie formy polimorficzne *uPA* [35] oraz trzy *uPAR* [36-38].

Podczas angiogenezy nowotworowej składniki układu aktywacji plazminogenu skupiają się na powierzchni komórek śródbłonna, otaczających populację komórek rakowych. Powoduje to lokalną proteolizę i przemieszczanie komórek śródbłonna, co umożliwia wytwarzanie nowych naczyń niezbędnych dla rozwoju nowotworu. Zwiększenie ilości aktywnych enzymów proteolitycznych na powierzchni komórek śródbłonna może być wynikiem zwiększonej ekspresji receptorów aktywatorów plazminogenu.

V. Aktywacja plazminogenu a angiogeneza

Proteoliza zachodząca przy udziale różnych enzymów proteolitycznych: 1) metaloproteaz (kolagenaz, żelatynaz, stromielizyn) 2) proteaz cysteino-

wych (katepsyn B, D, H i L) 3) proteaz aspartylo-wych oraz 4) proteaz serynowych (białka układu aktywacji plazminogenu i plazmina) jest jednym z pierwszych mechanizmów aktywowanych podczas inwazji i metastazy nowotworu [39]. Spośród enzymów proteolitycznych wszystkich czterech klas najlepiej poznana w transformacji nowotworowej jest rola metaloproteinaz macierzowych (MMP) i składników układu aktywacji plazminogenu. W wyniku ich skoordynowanego działania dochodzi do degradacji elementów błony podstawnej i ECM, co umożliwia inwazję komórkom nowotworowym. Głównym czynnikiem bezpośrednio trawiącym proteoglikany macierzowe, fibronektynę, lamininę oraz kolagen typu IV jest plazmina. Proces trawienia może zachodzić także w sposób pośredni w wyniku aktywacji przez plazminę niektórych proenzymatycznych form metaloproteaz (pro-MMP) [40], takich jak MMP-2 (żelatynaza A) i MMP-9 (żelatynaza B), które degradują znajdujący się w błonie podstawnej kolagen typu IV. W procesach fizjologicznych i patologicznych aktywność dojrzałych metaloproteaz jest kontrolowana przez ich inhibitory tkankowe (TIMP) [40]. Aktywowane przez plazminę metaloproteazy stymulują proliferację komórek śródbłonna i ich migrację. Aktywacja metaloproteaz zależy od składników układu aktywacji plazminogenu. uPA, uPAR i PAI-1 współdziałając z innymi proteazami: metaloproteazami oraz katepsynami B, L i D, umożliwiają komórkom nowotworowym pokonanie barier, sprzyjają ich skupianiu się i progresji nowotworu; wymaga to wytworzenia własnej sieci naczyń krwionośnych. Także w procesie angiogenezy konieczna jest proteoliza pozwalająca na przemieszczanie się komórek śródbłonna tworzących nowe naczynia [41]. Składniki układu aktywacji plazminogenu są zatem czynnikami aktywującymi zarówno angiogenezę jak i inwazję nowotworów.

Formowanie nowych naczyń w trakcie wzrostu nowotworu jest możliwe dzięki oddziaływaniom pomiędzy składnikami układu aktywacji plazminogenu a czynnikami wzrostowymi, które stymulują syntezę składników układu aktywacji plazminogenu w różnych komórkach, natomiast czynniki wzrostowe w formie utajonej, to jest w formie nieaktywnych prekursorów aktywowanych przez strawienie wiązania peptydowego, ulegają aktywacji w wyniku

²Problem aktywacji plazminogenu był poruszany w *Postęпах Biochemii* 36(3-4)1990, 37(3-4)1991, 45(1)1999.

działania uPA [42]. Udział układu aktywacji plazminogenu w aktywowaniu substancji angiogennych można zilustrować na przykładzie aktywacji transformującego czynnika wzrostowego typu β . Czynniki ten jest uwalniany w postaci kompleksu utajonego, który nie ma zdolności oddziaływania ze swoim receptorem i w którym aktywny homodimer o masie 25 kDa jest związany ze swoim prebiałkiem i zakotwiczony w ECM [42]. Podczas aktywacji czynnik zostaje uwolniony z kompleksu z białkiem LTBP. W pierwszym etapie aktywacji transglutaminaza TGF β umożliwia uwolnienie kompleksu TGF β /LTBP z ECM, który staje się następnie celem działania plazminy, poczynając od C-końca zawierającego zmodyfikowaną glutaminę. Transglutaminaza TGF β , uwalnia w podobny sposób także bFGF, który może powodować wzrost poziomu syntezy uPA i PAI-1 w komórkach śródbłonka.

Także czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) wymaga urokinazy dla osiągnięcia aktywności angiogennej — urokinaza katalizuje aktywację HGF w wyniku proteolitycznego trawienia jego prekursora. W pełni aktywny HGF stymuluje ekspresję uPA, PAI-1 i receptora uPAR w komórkach śródbłonka, umożliwiając wzmożoną degradację nici kolagenowych i fibrynowych ECM [43].

Regulacja aktywności kompleksu uPA/uPAR jest kontrolowana przez naczyniowy czynnik wzrostowy śródbłonka, VEGF, powodujący zwiększenie ekspresji kompleksu. Uwalnianie VEGF z miejsc wiązania w ECM jest zależne od plazminy oraz czynników wzrostowych, które zwiększają ekspresję urokinazy, prowadzącą do powstawania plazminy trawiącej VEGF i powodujące jego uwalnianie z miejsc wiązania do proteoglikanu siarczanu heparanu w ECM. Podwyższona ekspresja VEGF w guzach nowotworowych może być sygnałem regulacyjnym wywołującym zwiększoną ekspresję genów *uPA* i *PAI-1*, prawdopodobnie przez czynniki transkrypcyjne indukowane przez VEGF [44-46]. Ekspresja uPA/uPAR może być także indukowana synergistycznie przez VEGF i bFGF [5, 45-47]. bFGF stymuluje komórki śródbłonka do zwiększonej produkcji uPA, integryny $\alpha_v\beta_3$ i białka HoxD3, będącego czynnikiem transkrypcyjnym. Hamowanie ekspresji genu *HoxD3* blokuje zdolność bFGF do indukowania syntezy uPA i $\alpha_v\beta_3$ [48]. Pod wpływem bFGF i VEGF wzrasta poziom mRNA zarówno uPA jak i uPAR; w przypadku PAI-1 nie obserwowano podobnego efektu [49]. Poziom PAI-1 jak również aktywatorów plazminogenu wzrasta w obecności czynnika VEGF-C, należącego do rodziny angiogennych cytokin VEGF [50].

V-1. Znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w nowotworach złośliwych

Związki pomiędzy angiogenezą nowotworową i aktywacją plazminogenu najczęściej badano w raku piersi. W zmienionej nowotworowo tkance obserwowano podwyższoną ekspresję PAI-1 i uPA, wraz ze zwiększonym poziomem VEGF [21].

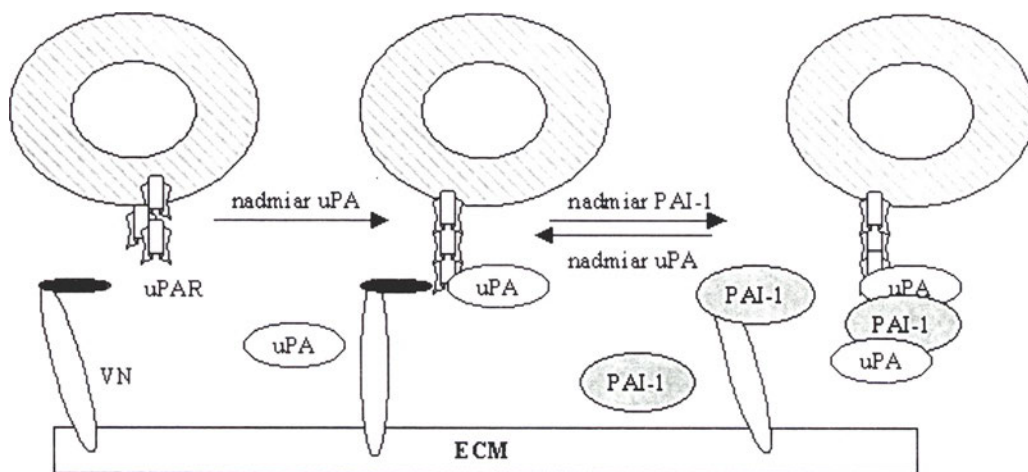
Gęstość mikronaczyń (IMD) w tkance nowotworowej pochodzącej z guza piersi bez przerzutów może być silniejszym czynnikiem prognostycznym od tradycyjnych markerów, takich jak rozmiar guza, stopień zróżnicowania histologicznego czy stan receptorów steroidowych [51]. Wzrostowi gęstości mikronaczyń towarzyszy wzrost poziomu ekspresji czynników angiogennych, zwiększenie tempa wzrostu nowotworu i zdolności do tworzenia przerzutów oraz podwyższona ekspresja uPA, uPAR i PAI-1 [21, 52]. Poziom uPA/PAI-1 w komórkach pochodzących z peryferyjnych obszarów guza piersi był wyższy niż w komórkach z obszarów centralnych; podobna relacja miała miejsce dla IMD [53].

W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych stwierdzono, że inhibitory uPAR hamują ruchliwość komórek śródbłonka, a przeciwciała anty-uPA — formowanie naczyń przez komórki poddane działaniu bFGF [54].

Przedstawione wyniki badań wskazują, że podczas angiogenezy może następować podwyższona ekspresja genu *PAI-1*, a w konsekwencji wzmożona synteza białka PAI-1 przez komórki śródbłonka. Pozwala to przypuszczać, że PAI-1 jest jednym z istotnych czynników biorących udział w procesie tworzenia nowych naczyń. Badania z zastosowaniem nowotworowych keratynocytów wszczepionych myszom z zablokowaną ekspresją genu *PAI-1* (myszy PAI^{-/-}) oraz myszom szczepu dzikiego pozwalają stwierdzić, że komórki rakowe syntetyzujące zarówno aktywatory plazminogenu jak i PAI-1 wykazywały inwazyjność tylko u myszy szczepu dzikiego [55, 56]. Rozwój nowotworu u tych myszy był możliwy dzięki formowaniu naczyń w procesie angiogenezy. U myszy PAI^{-/-} obserwowano zahamowanie procesu rozwoju i unaczynienia nowotworu. Wprowadzenie ludzkiego genu *PAI-1* powodowało przywrócenie rozwoju transformacji nowotworowej i angiogenezy [57]. PAI-1 oraz uPAR są białkami wielofunkcyjnymi biorącymi udział nie tylko w proteolizie ECM, lecz także w adhezji komórkowej i migracji [57, 58]. uPA oddziałuje ze swoim receptorem na powierzchni komórek śródbłonkowych, co umożliwia ich migrację. Indukcja ekspresji kompleksu uPA/uPAR

przez czynniki wzrostu i estry forbolu jest konieczna dla zależnej od witronektyny migracji komórek rakowych. Migrację komórek na witronektynie można blokować przez zastosowanie przeciwciał anty-uPA, hamujących wiązanie aktywatora do receptora. PAI-1 może blokować wiązania między witronektyną i uPAR obecnym na powierzchni komórek śródbłonna i uniemożliwiać oddziaływanie witronektyna-receptor integrynowy (Ryc. 2) [59]³.

Zawiera on cztery miejsca wiązania AP-1: sekwencję TGAGTTCA w pozycji od -58 do -50, sekwencję TGAGTGA w pozycji -79 do -72, sekwencję TGACACA w pozycji -721 do -714 oraz sekwencję TGTATCA w pozycji -662 do -656 [32]. AP-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym wpływającym na regulację ekspresji genu *PAI-1* przez aktywatory kinazy białkowej C, takie jak sole forbolu lub czynniki wzrostu.



Ryc. 2. Schemat regulacji procesu adhezji komórkowej przez aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPA) i inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1). PAI-1 współzawodniczy z uPA o wiązanie z receptorem uPAR, znajdującym się na powierzchni komórki (obszar zakresowany), blokując połączenie receptor-witronektyna.

PAI-1 wytwarzany przez komórki prawidłowe i nowotworowe, może wpływać na adhezję i promować lub hamować ukierunkowaną migrację komórek nowotworowych [60].

V-2. Regulacja ekspresji genów

Czynniki biorące udział w transformacji nowotworowej mogą wpływać na składniki układu aktywacji plazminogenu podczas angiogenezy. Ekspresja genów układu aktywacji plazminogenu może być regulowana przez onkogeny i ich produkty. Duży wpływ na zmiany ekspresji tych genów mogą mieć onkogeny kodujące białka o charakterze czynników transkrypcyjnych. Onkogen *jun* koduje białko, które w formie homodimeru lub heterodimeru z produktem onkogeny *fos* tworzy czynnik transkrypcyjny AP-1 [61]. AP-1 może być aktywatorem transkrypcji genów zawierających w obszarze promotorowym sekwencję TGAg/cTCA, na przykład *PAI-1* [62].

Onkogeny mogą regulować ekspresję czynników układu aktywacji plazminogenu pośrednio, poprzez stymulację niektórych wzrostowych czynników angiogennych. Indukcja ekspresji VEGF przez onkogen *K-ras* podobnie jak *v-src*, czy też *v-raf* w komórkach śródbłonna wpływają na inne regulatory angiogenezy, takie jak cytokiny TGFβ i TGFα [63, 64]. Być może w podobny sposób dochodzi do regulacji poziomu czynników układu aktywacji plazminogenu podczas angiogenezy. Aktywność innego onkogeny *c-fms* wpływa w sposób pośredni na zwiększenie poziomu uPA [65]. Regulacja ekspresji *uPA* przez ten onkogen odbywa się przy udziale czynnika angiogennego CSF-1. Aktywność *c-fms* obserwuje się w różnych nowotworach: raku piersi, jajników, endometrium, płuc, jelita grubego [66-69]. Onkogen *c-fms* koduje białko o charakterze receptora kinazy tyrozynowej. Czynniki CSF-1 łącząc się z receptorem ulega aktywacji, co z kolei wpływa na zmianę ekspresji *uPA*.

³Współdziałanie receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu z integrynami podczas adhezji i migracji komórek zostało przedstawione w *Postęпах Biochemii* 45(3)1999.

Obok onkogenów także geny supresorowe mogą kontrolować ekspresję składników układu aktywacji plazminogenu podczas transformacji nowotworowej. Do tej grupy genów należy *DPC4* położony w 18q21.1, obszarze, który charakteryzuje się wysoką częstością utraty heterozygotyczności w rakach trzustki i jelita grubego [70, 71]. *DPC4* odgrywa główną rolę w przekazywaniu sygnałów cząsteczkom z rodziny TGF, a obserwowanej w raku jelita grubego delecji tego genu towarzyszą zmiany adhezji komórkowej oraz wzrost poziomu ekspresji *uPA* oraz *PAI-1* [72]. Prawdopodobnie ekspresja obu genów jest regulowana pośrednio poprzez czynnik TGF, który z kolei wymaga obecności plazminy dla osiągnięcia optymalnej aktywności. W regulacji układu aktywacji plazminogenu uczestniczą także produkty innego genu supresorowego, *VHL*, znajdującego się w 3p25-25 [73], kodującego dwa białka pVHL30 i pVHL19, o masach cząsteczkowych odpowiednio 30 i 19 kDa [74-76]. W raku nerki inaktywacja *VHL* koreluje z obniżeniem poziomu ekspresji genu *uPA* i zwiększeniem ekspresji *PAI-1* [77].

Poziom ekspresji genu *PAI-1* może być zależny od czynnika transkrypcyjnego Sp1 [78]. W *PAI-1* zidentyfikowano 8 sekwencji wykazujących 90% homologię z sekwencjami *cis* oddziałującymi z czynnikiem Sp1. Produkty *VHL* mogą oddziaływać z Sp1 i hamować jego aktywność, obniżając poziom ekspresji *PAI-1*. W transformacji nowotworowej inaktywacja *VHL* wywołuje wzrost aktywności Sp1 i zwiększenie ekspresji *PAI-1*. W regulacji *uPA* przez *VHL* bierze udział kinaza białka C, która stymuluje estry forbolu, co powoduje podwyższenie poziomu mRNA *uPA* [79,80]. Obserwowana w chorobach nowotworowych delecja *VHL* może powodować obniżenie poziomu ekspresji urokinazy.

V-3. Hamowanie angiogenezy

Gęstość naczyń krwionośnych w pierwotnym guzie nowotworowym jest wskaźnikiem prognostycznym rozwoju choroby, w szczególności zdolności do tworzenia przerzutów. Gęstość naczyń można oceniać histologicznie z immunocytochemiczną identyfikacją komórek śródbłonkowych. W guzie nowotworowym można oznaczać poziom składników układu aktywacji plazminogenu, dodatkowo skorelowany z gęstością drobnych naczyń krwionośnych. Wysoka gęstość naczyń w powiązaniu z wysokim poziomem *uPA*, *uPAR* i *PAI-1* wskazuje na krótszy okres nawrotu choroby i krótszy czas przeżycia [81]. Składniki układu

aktywacji plazminogenu mogą być zaten rozważane jako cel terapii przeciwrakowej, skierowanej na hamowanie rozwoju sieci naczyń krwionośnych guza.

Składniki układu aktywacji plazminogenu mogą hamować angiogenezę przez wytwarzanie jej inhibitorów, takich jak angiostatyna, zawierająca pierwsze cztery domeny *kringle* plazminogenu, lub jego domena 5 [82-86]. Systemowe podawanie angiostatyny, względnie odpowiedniego fragmentu mysiego lub ludzkiego plazminogenu hamuje wytwarzanie nowych naczyń i ogranicza przerzuty [86]. Również fragment plazminogenu zawierający miejsce wiązania lizyny 1 może hamować angiogenezę [87]. Ostatnio doniesiono również o nowym elemencie hamującym angiogenezę — receptorze czynnika aktywującego proliferację peroksisomów typu g (PPARg) [88]. Aktywacja PPARg hamuje ekspresję genów *VEGF* i *uPA*, co także podkreśla związek pomiędzy angiogenezą i układem aktywacji plazminogenu.

VI. Uwagi końcowe

Angiogeneza jest bezpośrednio powiązana z hydrolizą macierzy zewnątrzkomórkowej, w której zasadniczą rolę odgrywają proteazy, w tym składniki układu aktywacji plazminogenu. Aktywatory plazminogenu mogą wpływać na rozwój procesu angiogenezy także pośrednio poprzez trawienie błony podstawnej, umożliwiające ekspozycję komórek śródbłonka na czynniki angiogenne. W wielu guzach nowotworowych zwiększonemu poziomowi ekspresji czynników wzrostowych, mających zasadnicze znaczenie dla angiogenezy, towarzyszy zwiększony poziom składników układu aktywacji plazminogenu. Korelacja ta pozwala na rozszerzenie zakresu molekularnych wyznaczników chorób nowotworowych (markerów) o czynniki aktywacji plazminogenu. Podwyższona ekspresja czynników angiogennych w guzach nowotworowych może być sygnałem regulacyjnym, wywołującym zwiększoną ekspresję genów układu aktywacji plazminogenu. Obserwuje się to przede wszystkim na poziomie transkrypcji, co może zostać wykorzystane w antysensowych strategiach przeciwnowotworowych.

Podziękowanie

Praca wykonana przy wsparciu Komitetu Nadań Naukowych, KBN 4 P05B 013 17.

Piśmiennictwo

1. Dieterlen-Lievre F, Godin I, Pardenaut L (1996) *Curr Top Microbiol Immunol* **212**: 119-128
2. Wilting J, Brand-Saberi B, Kurz H, Christ B (1995) *Cell Mol Biol Res* **41**: 219-232
3. Wynendaele W, Oosterom AT, Pawinski EA, Buijn EA, Maes RA (1998) *Pharm World Sci* **20**: 225-235
4. Clark RA, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresh DA (1996) *Am J Pathol* **148**: 1407-1421
5. Pepper S (1996) *Vascular Medicine* **1**: 259-266
6. Eliceiri BP, Cheresh DA (1999) *J Clin Invest* **103**: 1227-1230.
7. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994) *Science* **264**: 569-571.
8. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M., Cheresch DA (1998) *Cell* **92**: 391-400
9. Folkman J (1990) *J Natl Cancer Inst* **82**: 4-6
10. Li CY, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K, Lin P, Dewhirst MW (2000) *J Natl Cancer Inst* **92**: 143-147
11. Folkman J, Watson K, Ingber D (1989) *Nature* **339**: 58-61
12. Folkman J (1995) *N Engl J Med* **333**: 1757-1763
13. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB (1996) *EJC* **32**: 2474-2484
14. Goto F, Goto K, Weindel K (1993) *Lab Invest* **69**: 508-517
15. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M., Cheresch DA (1998) *Cell* **92**: 391-400
16. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA (1999) *Mol Cell* **4**: 915-924.
17. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS (1998) *Biol Reprod* **59**: 1540-1548.
18. Pepper MS, Mandriota S, Vassali JD, Orci L, Montesano R (1996) *Curr Top Microbiol Immunol* **213**: 31-67
19. Klagsbrun M, D'Amore PA (1991) *Annu Rev Physiol* **53**: 217-239
20. Carroll V, Berndt R, Binder MD (1999) *Semin Thromb Haemost* **25**: 183-197
21. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roessel J (1998) *J Clin Oncol* **16**: 3129-3136
22. Błasiak J, Smolarz B, Piestrzeniewicz D (1999) *Post Biochem* **45**: 42-50
23. Smolarz B, Błasiak J (1999) *Nowotwory* **49**: 323-328
24. Smolarz B, Błasiak J, Piestrzeniewicz D, Pytel J (1998) *Cell Mol Biol Lett* **3**: 49-56
25. Smolarz B, Błasiak J (1999) *Biomed Lett* **60**: 97-105
26. Smolarz B, Błasiak J, Pytel J (1999) *Med Sci Mon* **5**: 833-837
27. Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Dano K, Skriver L (1988) *J Biol Chem* **263**: 11189-11195
28. Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J (1985) *Adv Cancer Res* **44**: 136-266
29. Schmitt M., Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Hjoefler H, Janicke F, Graeff H (1997) *Thromb Haemost* **78**: 285-296
30. Ploug M., Ronne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Dano K (1991) *J Biol Chem* **266**: 1926-1933
31. Plessner T, Behrendt N, Ploug M (1997) *Stem Cells* **15**: 398-408
32. Bosma PJ, Van den Berg EA, Koistra T, Siemieniak DR, Slightom L (1988) *J Biol Chem* **263**: 9129-9141
33. Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Poirier O, Cambien F, Juhan-Vague I (1997) *Arterioscler Thromb Vascular Biol* **17**: 851-858
34. Henry M, Tregouet MC, Alessi MC, Aillaud S, Visvikis S, Siest G, Tiret L, Juhan-Vague I (1998) *Arterioscler Thromb Vascular Biol* **18**: 84-91
35. Conne B, Berczy M, Belin D (1997) *Thromb Haemost* **77**: 434-435
36. Kohonen-Corish MR, Wang Y, Doc WF (1996) *Human Genet* **97**: 124-125
37. Borglum AD, Byskov A, Ragno P, Roldan AL, Triputti P, Cassani G, Dano K, Blasi F, Bolund L, Kruse TA (1992) *Am J Hum Genet* **50**: 492-497
38. Borglum AD, Byskov A, Cubellis MV, Kruse TA (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 6661
39. Dano K, Romer J, Nielsen B, Bjorn S, Pyke Ch, Rygaard J, Lund L (1999) *APMIS* **107**: 120-127
40. Murphy G, Atkinson S, Ward R, Gavrilovic J, Reynolds JJ (1992) *Ann Acad Sci* **667**: i-12
41. Pepper M, Montesano R, Mandriota S (1996) *Enzyme Protein* **49**: 138-162
42. Blasi F, Stoppelli P (1998) *Biochim Biophys Acta* **1423**: 35-44.
43. Wojta J, Kaun Ch, Breuss J, Koshelnick Y (1999) *Lab Invest* **79**: 427-438
44. Pepper MS, Mandriota S (1998) *Exp Cell Res* **241**: 414-425
45. Pepper MS, Ferrara N (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 902-906
46. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD (1995) *J Biol Chem* **270**: 9709-9716
47. Pepper MS, Ferrara N, Orci L (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 824-831
48. Boudreau N, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A, Cheresh DA (1997) *J Cell Biol* **139**: 257-264
49. Pepper M, Mandriota S (1998) *Exp Cell Res* **241**: 414-425
50. Pepper M, Mandriota S, Jeltsch M (1998) *J Cell Physiol* **177**: 439-452
51. Bewilaqua P, Barbareschi M., Verderio P, Boracchi P, Caffo O, Dalla P, Meli S, Weidner N, Gaspardini G (1995) *Breast Cancer Res Treat* **36**: 205-217
52. Weidner N (1996) *Eur J Cancer* **32**: 2506-2512
53. Hildebrand R, Dilger I, Horlin A (1995) *Br J Cancer* **72**: 818-823
54. Min HY, Doyle LV, Vitt CR (1996) *Cancer Res* **56**: 2428-2433
55. Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, van Nuffelen A, Prendergast G, Cole M, Bronson R, Collen D, Mulligan RC (1993) *J Clin Invest* **92**: 2746-2755
56. Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, Ream B, van den Oord JJ, De Mol M., Mulligan RC, Collen D (1993) *J Clin Invest* **92**: 2756-2760
57. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansten C, Skobe M, Fusening NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM (1998) *Nat Med* **4**: 923-928.
58. Cierniewski CS, Cierniewska-Cieślak A, Pawłowska Z (1999) *Post Biochem* **45**: 109-116
59. Stefansson S, Lawrence DA (1996) *Nature* **383**: 441-443
60. Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM (1997) *J Clin Invest* **100**: 58-67
61. Descheemaeker KA, Wyns S, Nelles L, Auverx J, Ny T, Collen D (1992) *J Biol Chem* **267**: 49-56
62. Angel P, Imagawa M., Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M (1987) *Cell* **49**: 729-739
63. Kolch W, Martiny-Baron G, Kieser A, Marme D (1995) *Breast Cancer Res Treat* **36**: 139-155
64. Rak J, Filmus J, Finkenzeller D (1995) *Cancer Metastasis Rev* **14**: 263-277
65. Chambers K, Wang Y, Gertz R (1995) *Cancer Res* **55**: 1578-1585

66. Bruckner A, Filderman AE, Kirchheimer JC, Binder BR, Remold HG (1992) *Cancer Res* **52**: 3043-3047
67. Kacinski BM, Carter D, Mittal K, Yee L, Scata KA, Donofrio L, Chambers SK, Wang K, Yang-Feng T (1998) *Am J Pathol* **137**: 135-147
68. Kacinski BM, Scata KA, Carter D, Yee LD, Sapi E, King BL, Jones MA (1991) *Oncogene* **6**: 941-952
69. Filderman AE, Bruckner A, Kacinski BM, Deng N, Remold HG (1996) *Cancer Res* **52**: 3661-3666
70. Hahn S.A., Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Schutte M., Rozenblum E, Seymour AB, Weinstein CL, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996) *Cancer Res* **56**: 490-494
71. Hahn S.A., Bartsch D, Schroes A, Galehdari H, Becker M., Ramaswamy A, Schwarte-Waldhoff I, Maschek H, Schmiegel W (1998) *Cancer Res* **58**: 1124-1126
72. Schwarte-Waldhoff I, Klein S, Blass-Kampmann S (1999) *Oncogene* **18**: 3152-3158
73. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M., Duh F, Orcutt M., Stackhouse T (1993) *Science* **260**: 1317-1320
74. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG (1995) *Nature Med* **1**: 822-826
75. Iliopoulos O, Ohh M., Kaelin WG (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11661-11666
76. Schoenfeld A, Dawidowitz EJ, Burk RD (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8817-8822
77. Los M, Zeamari S, Foekens JA (1999) *Cancer Res* **59**: 4440-4445
78. Johnson MR, Bruzdziński CJ, Winograd SS, Gelehrter TD (1992) *J Biol Chem* **267**: 12202-12210
79. Stoppelli MP, Verde P, Grimaldi G, Locatelli EK, Blasi F (1996) *J Cell Biol* **102**: 1235-1241
80. Pal S, Claffey KP, Dvorak HF, Mukhopadhyay D (1997) *J Biol Chem* **272**: 27509-27512
82. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C (1997) *Thromb Haemost* **78**: 285-296
83. Taniguchi T, Rigg A, Lemoine ? (1998) *Gene Therapy* **5**: 1011-1013
84. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y (1994) *Cell* **79**: 315-328
85. Cao Y, Ji RW, Davidson D (1996) *J Biol Chem* **271**: 29461-29467
86. Cao Y, Chen A, Seong S (1997) *J Biol Chem* **272**: 22924-22928
87. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen Y (1996) *Nature Med* **2**: 689-692
88. Barendsz-Janson A, Griffioen A, Muller A (1998) *J Vasc Res* **35**: 109-114
89. Xiaohua X, Yang S, Kowalski J (1999) *J Biol Chem* **274**: 9116-9121

Wskazówki dla Autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako *.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny (około 30 wierszy na stronie i około 60 znaków w wierszu), z lewym marginesem około 4 cm. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ołówkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

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

korespondencji, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska Autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

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

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

ILUSTRACJE: ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: *.tif, lub *.cdr, lub *.psd, lub *.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

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

Prenumerata P O S T Ę P Ó W B I O C H E M I I rok 2000	
dla nie zrzeszonych w PTBioch	40,00 zł
dla członków PTBioch	20,00 zł
dla zakładów i bibliotek	70,00 zł

Składka P.T.Bioch. za rok 2000	30,00 zł
studenci	10,00 zł

KOMUNIKAT

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

