

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

PL ISSN
0032-5422

POSTĘPY BIOCHEMII

Advances in Biochemistry

TOM 46, NR 1, 2000

Mitochondria a apoptoza.	2
Rearanżacje genomu.	17
Regulacja ekspresji genów <i>hsp70i</i>	24
Kwaśne białka rybosomowe.	38
Enzymy detoksykacyjne.	50
Receptory sprzężone z białkami G	60
Katepsyny i ich inhibitory	73
Kinazy zależne od Ca^{2+}	85
Budowa i regulacja NR	99

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

<http://rcin.org.pl>

WYDAWCA

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

REDAKTOR NACZELNY

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

ZASTĘPCA

REDAKTORA NACZELNEGO

Executive Editor
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
MAŁGORZATA BASAJ

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
ANNA BARAŃCZYK-KUŻMA
(Warszawa)
MAGDALENA BOGUTA
(Warszawa)
JAN FRONK (Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
BOŻENA KAMIŃSKA (Warszawa)
KATARZYNA NAŁĘCZ (Warszawa)
JERZY NOWAK (Łódź)
EWA SIKORA (Warszawa)
MAGDALENA STASZCZAK
(Lublin)
ANNA SZAKIEL (Warszawa)
ADAM SZEWCZYK (Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

- Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium**
Apoptosis: decision rests with the mitochondrion
IWONA GRĄDZKA 2
- Czy komórki projektują własny genom?**
Are cells engineering their own genomes?
ANNA PŁATEK, KRZYSZTOF FLIS, ELŻBIETA WYROBA 17
- Regulacja ekspresji genów szoku termicznego *hsp 70i***
Regulation of expression of the heat shock genes
hsp 70i
ZDZISŁAW KRAWCZYK, KATARZYNA LISOWSKA 24
- Kwaśne białka rybosomowe i ich udział w regulacji translacji**
Acidic ribosomal proteins and their role in regulation of translation
ANNA GRZYB, PIOTR ZIENI, MAREK PILECKI, RYSZARD SZYSZKA 38
- Polimorfizm enzymów detoksykacyjnych**
Polymorphisms in detoxifying enzymes
RENATA JASKUŁA-SZTUL 50
- Receptory sprzężone z białkami G (GPCR), metody badań oddziaływań ligand-receptor**
G Protein-coupled receptors (GPCR), ligand-receptor interaction studies
MAREK JASIONOWSKI, ZBIGNIEW GRZONKA, LESZEK ŁANKIEWICZ 60
- Rola katepsyn cysteinowych oraz ich inhibitorów w procesach fizjologicznych i nowotworowych**
The role of cysteine cathepsins and their inhibitors in physiological and neoplastic processes
IZABELA BERDOWSKA, MACIEJ SIEWIŃSKI 73
- Kinazy białkowe zależne od jonów wapnia**
Calcium dependent protein kinase
JADWIDA SZCZEGIELNIAK, GRAŻYNA MUSZYŃSKA 85
- Budowa i sposoby regulacji reduktazy azotanowej**
Structure and regulation of nitrate reductase
MAŁGORZATA REDA, GRAŻYNA KŁOBUS, JÓZEF BUCZEK 99

Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium

Apoptosis: decision rests with the mitochondrion

IWONA GRĄDZKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Potencjał transblonowy i megakanaly mitochondrialne
 - II-1. Znaczenie potencjału transblonowego
 - II-2. Budowa megakanalów mitochondrialnych
 - II-3. Czynniki wpływające na przemianę w przepuszczalności megakanalów mitochondrialnych
- III. Apoptoza
 - III-1. Różnorodność szlaków premitochondrialnych
 - III-2. Faza mitochondrialna — wzmocnienie sygnału śmierci
 - III-3. Faza postmitochondrialna
 - III-3.1. Białkowe czynniki aktywacji apoptozy: cytochrom c, AIF, kaspazy
- IV. Autofagia, apoptoza czy nekroza?
- V. Apoptoza a defekty mitochondrialne
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. A transmembrane potential and mitochondrial megachannels
 - II-1. The importance of the transmembrane potential
 - II-2. Molecular composition of the mitochondrial megachannels
 - II-3. Factors that affect mitochondrial permeability transition
- III. Apoptosis
 - III-1. A variety of the pre-mitochondrial pathways
 - III-2. The mitochondrial phase – amplification of the death signal
 - III-3. The post-mitochondrial phase
 - III-3.1. Proteinaceous factors activating apoptosis: cytochrome c, AIF, caspases
- IV. Autophagy, apoptosis or necrosis?
- V. Mitochondrial defects and apoptosis
- VI. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Acylo-CoA — acylo-koenzym A (*coenzyme A*) AIF — czynnik indukcji apoptozy (*apoptosis inducing factor*); ANT — translokaza nukleotydów adeninowych (*adenine nucleotide translocator*); Apaf-1 — czynnik 1-szy, aktywujący proteazy w apoptozie (*apoptosis protease activating factor-1*); Atr — atraktylozyd; BA — kwas bongkrekowy (*bongkrekic acid*); CARD — domena werbunku kaspazy (*caspase recruitment domain*); CK — kinaza kreatynowa (*creatine kinase*); CL-S — syntaza kardiolipiny (*cardiolipin synthase*); CSA — cyklosporyna A; DEX — deksametazon (*dexamethasone*); DFF — czynnik fragmentacji DNA (*DNA fragmentation factor*); Fas — receptor powierzchniowy z rodziny tzw. receptorów śmierci; Fas-L — ligand receptora Fas; F₀F₁ — podjednostki syntazy ATP; GK — kinaza glicerolowa (*glycerol kinase*); GPX4 — peroksydaza glutationowa 4-ta (*glutathione peroxidase 4*); GR — receptor glukokortykoidów (*glucocorticoid receptor*); GSH — glutation zredukowany; HK — heksokinaza (*hexokinase*); IAPs — białka z rodziny inhibitorów apoptozy (*inhibitors of apoptosis*

proteins); IP₃ — trifosforan inozytolu (*inositol 1,4,5-triphosphate*); mtDNA — DNA mitochondrialne; NGF-R — receptor czynnika wzrostu neuronów (*nerve growth factor – receptor*); PBR — obwodowy receptor benzodiazepiny (*peripheral benzodiazepine receptor*); P_i — jon ortofosforanowy (*orthophosphate ion*); PIGs — geny indukowane przez białko p53 (*p53 – induced genes*); RFT — reaktywne formy tlenu; TNF — czynnik nekrozy nowotworu (*tumor necrosis factor*); UQ — ubichinon (*ubiquinone*); VDAC — kanał anionowy zależny od napięcia, poryna mitochondrialna (*voltage dependent anion channel*); Z-VAD.fmk — N-benzyl-oksokarbonylo-Val-Ala-Asp-fluorometyloketon; 3βHSD/1 — dehydrogenaza/izomeraza 3β-hydroksysterydów (*3β-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase*); ΔΨ_m — potencjał transblonowy mitochondrium.

I. Wstęp

Po blisko 30 latach intensywnej badań nad apoptozą, jesteśmy obecnie świadkami rewolucji w poglądach na temat istoty tego zjawiska: przestano uważać rolę jądra komórkowego za pierwszoplanową [1] — zebrane fakty wskazują na mitochon-

*Dr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, 03-195 Warszawa, ul. Dorodna 16.

drium jako ośrodek decyzyjny procesu programowanej śmierci komórki [2].

Do śmierci programowanej dochodzi, gdy komórka, po zadziałaniu określonych bodźców, uruchamia mechanizmy prowadzące do samounicestwienia. Charakterystyczny obraz mikroskopowy końcowych etapów tej „śmierci samobójczej” — kondensacja chromatyny i oddzielanie się fragmentów komórki w postaci ciałek otoczonych błonami — skłonił Kerr’a i wsp. w 1972 r do utworzenia terminu apoptoza (z greckiego *apo ptosis* = odpadanie liści lub płatków kwiatowych) [3]. Określenia śmierć programowana i apoptoza są używane wymiennie, chociaż istnieją przypadki, gdy komórka w procesie śmierci programowanej nie wykazuje morfologicznych cech apoptozy [4].

Widoczne w jądrze komórkowym zmiany, jako wyróżnik apoptozy, nadały kierunek badaniom. Ich przedmiotem stała się degradacja DNA, prowadząca do powstawania fragmentów będących wielokrotnością odcinków nukleosomowych, oraz swoiste proteazy (kaspazy) i nukleazy. Jednocześnie odkryto zadziwiającą różnorodność bodźców wyzwających mechanizm śmierci programowanej [5-8]. Mitochondria bardzo długo pozostawały poza głównym nurtem badań – może dlatego, iż we wczesnych stadiach apoptozy nie dostrzegano w nich wyraźnych zmian morfologicznych [9] ani oznak trawienia DNA mitochondrialnego (mtDNA) [10, 11]. Ponadto, komórki pozbawione mtDNA wskutek długotrwałej inkubacji z bromkiem etydyny (komórki p^0) [12], okazały się tak samo podatne na apoptozę jak komórki prawidłowe [13, 14]. Jednak w nieobecności mitochondriów lub ekstraktów mitochondrialnych nie można było wywołać apoptozy w izolowanych jądrach komórkowych [15-18], podczas gdy komórki pozbawione jąder (cytoplasty) były zdolne do uruchomienia programu śmierci o przebiegu podobnym jak w całych komórkach [19]. Doświadczenia te wskazywały, że z mitochondriów wydostają się czynniki apoptogenne. Jeśli ten proces nie zależał od genomu mitochondrialnego, to jak był on regulowany?

Pod koniec lat 70-tych Hunter i wsp. [20-23] odkryli zjawisko gwałtownej przemiany w przepuszczalności mitochondriów pod wpływem jonów Ca^{2+} , czemu towarzyszyło rozprężenie energetyczne. Doniesienie to początkowo zostało przyjęte z niedowierzaniem, ponieważ przeczyło dogmatowi o wyjątkowo niskiej przepuszczalności mitochondrialnej błony wewnętrznej. Dopiero przeprowadzone w drugiej połowie lat 90-tych badania, głównie Kromera i wsp. [2, 18, 24-29], wykazały istnienie złożonych kompleksów porowych na styku zew-

nętrznej i wewnętrznej błony mitochondriów. Otwarcie tych porów, indukowane przez różnorodne bodźce zewnętrzne działające w obecności jonów Ca^{2+} , łączyło się ze spadkiem potencjału w poprzek wewnętrznej błony mitochondrium i uwolnieniem białek z przestrzeni międzybłonowej. Na podstawie licznych obserwacji uznano, iż załamanie się potencjału błonowego mitochondriów jest pierwszym objawem rozpoczynającej się w komórce apoptozy [2, 25, 27, 30-32].

Od 1994 roku *Postępy Biochemii* systematycznie zamieszczają artykuły przeglądowe dotyczące różnych aspektów apoptozy [33-37]. Obecna praca jest kolejną próbą uporządkowania ogromnej liczby nowych informacji z tej dziedziny. Przedstawia ona aktualne poglądy na temat mechanizmów przekształcania różnorodnych bodźców docierających do mitochondrium w sygnały kierujące komórkę na drogę śmierci.

Zaprezentowany tu schemat uruchamiania procesu apoptozy jest zgodny z obserwacjami zdecydowanej większości komórek. Istnieją jednakże szlaki prowadzące do apoptozy z pominięciem mitochondrium. Udział mitochondrium prawdopodobnie nie jest konieczny w przypadku aktywacji receptorów śmierci (Fas, TNF-R) oraz receptora glukokortykoidów (GR, patrz Ryc. 5), chociaż mitochondria znacznie wzmacniają tę odpowiedź gdy sygnał generowany przez receptory śmierci jest słaby [38, 39, 40].

II. Potencjał transbłonowy i megakanaly mitochondrialne

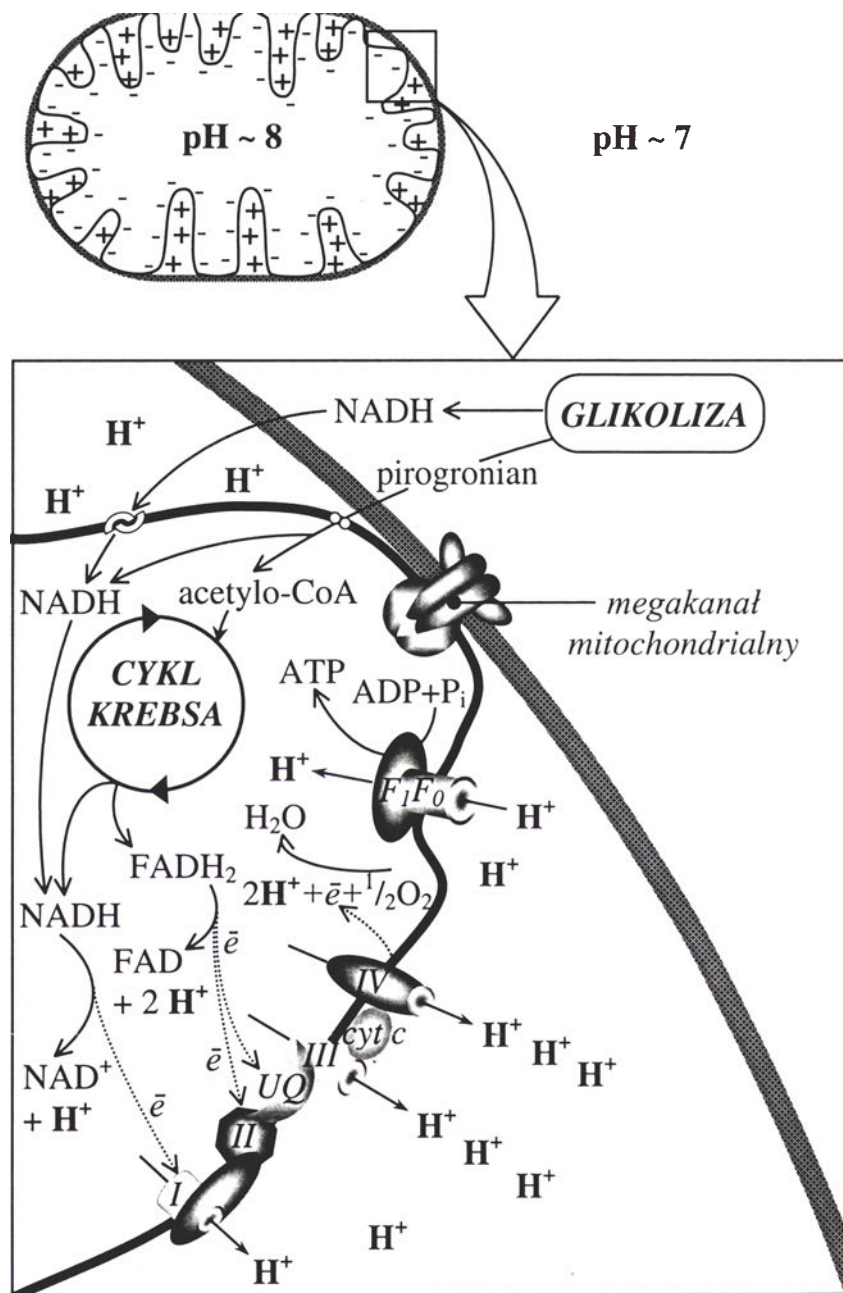
II-1. Znaczenie potencjału transbłonowego

W warunkach fizjologicznych, w poprzek wewnętrznej, wysoce nieprzepuszczalnej błony mitochondrium, tworzy się elektrochemiczny gradient protonów: stężenie H^+ po stronie cytoplazmatycznej jest znacznie wyższe niż po stronie macierzy (Ryc. 1). Związany z gradientem potencjał transbłonowy mitochondrium ($\Delta\Psi_m$) ma wartość ok. —180 mV, zaś mierzone w macierzy pH jest o ok. 1 jednostkę wyższe niż w cytoplazmie. $\Delta\Psi_m$ powstaje dzięki wieloenzymatycznym kompleksom I, III, i IV zlokalizowanym w błonie wewnętrznej. Działają one jako pompy wyrzucające protony do przestrzeni międzybłonowej, wykorzystując energię uwalnianą podczas przenoszenia elektronów z NADH i $FADH_2$ na tlen cząsteczkowy.

$\Delta\Psi_m$ ma zasadnicze znaczenie dla funkcjonowania mitochondrium: wchodzi on w skład siły proto-

nomotorycznej, $\Delta p = \Delta \Psi_m - 60 \Delta pH$ ($\Delta pH = pH$ w macierzy — pH w cytosolu). Warunkuje ona przekształcenie ADP w ATP dokonywane przez syntazę ATP (fosforylację oksydacyjną). Ponadto należy pamiętać, że większość białek mitochondrialnych syn-

scach styku błony zewnętrznej i wewnętrznej, jednak dotychczas nie wiadomo czy i jaką rolę odgrywają tu, opisane dalej, megakanaly mitochondrialne [24, 41, 42]. $\Delta \Psi_m$, ujemny wewnątrz mitochondrium, napędza pobieranie Ca^{2+} przez tę organelę. Dzięki



Ryc. 1. Powstawanie potencjału transbłonowego mitochondrium ($\Delta \Psi_m$). Potencjał w poprzek wewnętrznej błony mitochondrium (ujemny od strony macierzy) tworzy się dzięki kompleksom enzymatycznym, które pompują protony do przestrzeni międzybłonowej, wykorzystując przy tym energię elektronów przenoszonych z NADH i $FADH_2$ na tlen cząsteczkowy. Kompleksy mitochondrialnego łańcucha przenośników elektronów: I — reduktaza NADH-UQ, II — reduktaza bursztynian-UQ, III — reduktaza cytochromowa, IV — oksydaza cytochromowa; cyt *c* — cytochrom *c*, UQ — ubichinon, F_1F_0 — podjednostki syntazy ATP.

tetyzowana jest w cytoplazmie. Ich import do macierzy, a także niektórych z nich do błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej, wymaga obecności ładunków dodatnich na zewnątrz błony i hydrolizy ATP w przestrzeni międzybłonowej [41]. Przenoszenie białek do mitochondrium odbywa się w miej-

temu, zależnie od szybkości napływu tych jonów z cytoplazmy, mitochondria mogą działać jako bufory wapniowe, stacje przekaznikowe na drodze sygnałów wapniowych lub przełączniki kierujące komórkę na drogę apoptozy (patrz rozdział II-3) [43-45].

Spadek $\Delta\Psi_m$ poniżej krytycznej wartości — tzw. potencjału bramkującego — sprzyja otwieraniu megakanałów mitochondrialnych na styku błon (Ryc. 1) [44, 46]. Przy dostatecznie wysokim stężeniu Ca^{2+} w cytoplazmie, otwarta konformacja megakanałów może zostać utrwalona [47]. W skrajnych przypadkach prowadzi to do pęcznienia organelli (wskutek napływu wody do macierzy), rozrywania błony zewnętrznej [48] i uwalniania z przestrzeni międzybłonowej białkowych czynników apoptozy [17, 18]. Nadmiernie wysoki $\Delta\Psi_m$ również może powodować pęcznienie mitochondriów (przy zamkniętych megakanałach) i rozrywanie błony zewnętrznej [49, 50].

Podczas gdy przyczyny hiperpolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej nie są dotychczas jasne, znanych jest szereg czynników, które działają w kierunku depolaryzacji błony. Z jednej strony są to czynniki zaburzające proces powstawania gradientu protonów (np. inhibitory łańcucha oddechowego [24]) lub go neutralizujące (np. gwałtowny wzrost stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondrium [24, 43]), z drugiej strony — czynniki zwiększające przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrium, jak wbudowujące się w błonę związki tworzące pory [24], utleniacze i wolne rodniki (działające m.in. na lipidy błonowe) [24, 43, 51], enzymy lityczne, takie jak kaspazy (proteazy aktywne w procesie apoptozy) [8, 31] czy fosfolipaza A₂ (jej produkty — lizofosfolipidy i kwasy tłuszczowe gromadzą się w wewnętrznej błonie zaburzając jej strukturę) [24].

Związek przyczynowo-skutkowy między obniżeniem $\Delta\Psi_m$ i przemianą w przepuszczalności mitochondrium spowodowaną otwarciem megakanałów jest bardzo skomplikowany. Czynniki wpływające na obniżenie $\Delta\Psi_m$, jak np. wzrost stężenia Ca^{2+} lub utleniacze, mogą jednocześnie powodować otwarcie megakanałów mitochondrialnych działając poprzez zmianę konformacji ich składników białkowych [24].

Obecnie stosowane metody pomiaru $\Delta\Psi_m$ wykorzystują właściwość gromadzenia się w macierzy lipofilowych (łatwo przechodzących przez błonę wewnętrzną), kationowych barwników fluorescencyjnych, takich jak: rodamina 123, jodek 3,3'-diheksylooksokarbocyjanku (DiOC6I3), jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzoimidazolokarbocyjanku (JC-1) i chlorometylorozamina-X (CMX-Ros) [24, 46, 52]. W sprzężonych mitochondriach stężenie tych barwników osiąga poziomy 10²-10³ razy wyższe niż w cytoplazmie [46, 52].

Załamanie się $\Delta\Psi_m$ w większości mitochondriów danej komórki może być pierwszym sygnałem wejścia na drogę programowanej śmierci [25].

II-2. Budowa megakanałów mitochondrialnych

Megakanały mitochondrialne (pory przemiany przepuszczalności) tworzą się prawdopodobnie w miejscach styku zewnętrznej i wewnętrznej błony [2, 24, 53]. Technika elektrofizjologiczna zwana „*patch clamp*” (docisk wycinka lub łatki [54]), została wykorzystana do zbadania fragmentów błon mitoplastów (mitochondriów pozbawionych błony zewnętrznej poza miejscami styku z błoną wewnętrzną) [48, 55]. Zaobserwowano wiele pośrednich stanów przewodnictwa odpowiadających różnym stopniom otwarcia megakanałów. Przy maksymalnym otwarciu osiągały one średnicę 2-3 nm, co umożliwiałało przenikanie cząsteczek o masie do 1,5 kDa [24]. Inne badania wykazały, że liczba miejsc styku błon mitochondrialnych może ulegać zmianom: rosła ona pod wpływem jonów Ca^{2+} , ADP, atraktylozydu (Atr) i w wyniku fosforylacji białek, malała zaś po traktowaniu dinitrofenolem, kwasami tłuszczowymi i glicerolem [24].

Po serii doświadczeń z oczyszczaniem i rekonstrukcją *in vitro* [28, 29] zaproponowano skład i budowę megakanału (Ryc. 2) [24, 31, 50, 53, 56]. Za jego podstawowy element przyjęto translokazę nukleotydów adeninowych (ANT), zakotwiczoną w błonie wewnętrznej. Tworzy ona kompleksy z białkami błony zewnętrznej: poryną mitochondrialną (zależnym od potencjału kanałem anionowym, VDAC) i obwodowym receptorem benzodiazepiny (PBR). Oktamer mitochondrialnej kinazy kreatynowej (CK) uczestniczy niekiedy w tworzeniu tego miejsca styku, być może jako pomost łączący ANT i porynę. W kompleksie znajdowano również inne białka, którym przypisuje się funkcje regulacyjne: endogenne ligandy PBR — endozepinę — wiążącą acylo-koenzym A (acylo-CoA) [31], Bcl-2 — również w połączeniu z PBR [57-59], heksokinazę (HK) i kinazę glicerolową (GK) — oddziałujące z poryną [31, 53], Bax — wiążące się z ANT od strony cytoplazmatycznej [60] i cyklofilinę D — od strony macierzy [24, 50], jak również peroksydazę glutationową 4 (GPX4), dehydrogenazę/izomerazę 3 β -hydroksysteroidów (3 β -HSD/I) i syntazę kardiolipiny (CL-S) — sąsiadujące z ANT [31, 53]. Na podstawie badań przewodnictwa sugeruje się, że główny

kanal, przebiegający przez obie błony mitochondrium, tworzony jest przez dimer poryny, zaś jego otwieranie reguluje ANT [24]. Nie jest jednak wykluczone, że również inne składniki kompleksu są zdolne do tworzenia kanałów, np. Bax współdziałające z ANT [60].

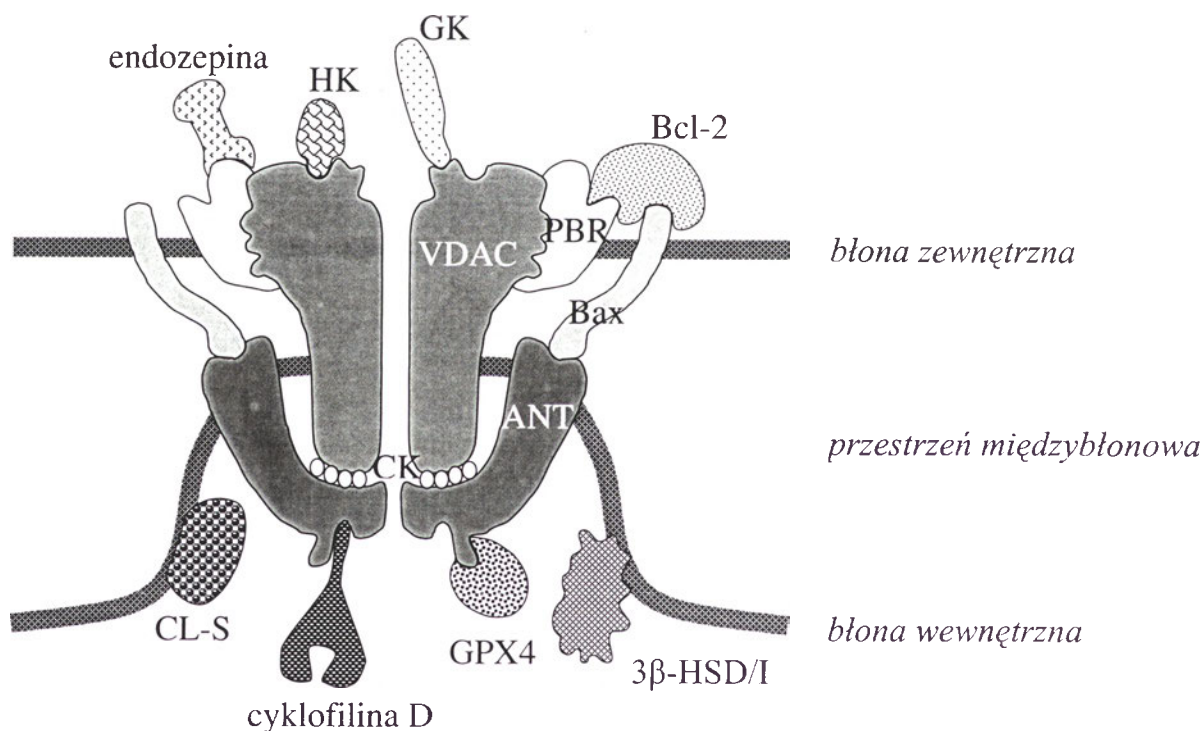
Opisany model budowy megakanalu mitochondrialnego należy uważać za hipotetyczny — jego natura pozostaje nadal nieznana.

II-3. Czynniki wpływające na przemianę w przepuszczalności megakanalów mitochondrialnych

Wielobiałkowe kompleksy porowe mitochondriów reagują zmianą konformacji na różnorodne bodźce. Wypadkowe tych oddziaływań uwidaczniają

puszczalności odwrotnie — sprawiają, że pory nie otwierają się nawet przy $\Delta\Psi_m$ znacznie niższym od fizjologicznego (potencjał bramkujący jest obniżony) [24, 31, 42].

Silnym induktorem przemiany przepuszczalności mitochondriów jest stres oksydacyjny, oddziałujący na dwa różne (bliżej nieznane) miejsca w kompleksach porowych: miejsce „P” — wrażliwe na stopień utlenienia nukleotydów pirydynowych NAD(P)/NAD(P)H, oraz miejsce „S” — reagujące w zależności od stopnia utlenienia grup tiolowych (czego wskaźnikiem jest mitochondrialny poziom zredukowanego glutationu) [53, 61, 62]. Otwieranie megakanalów jest ułatwione przy wzroście stężenia Ca^{2+} w macierzy (szczególnie w obecności P_i) [20, 24, 31, 42, 45], przy czym związenie Ca^{2+} z ANT od strony macierzy utrwała w pełni otwartą konformację poru



Ryc. 2. Hipotetyczna budowa megakanalu mitochondrialnego (na podstawie schematów zamieszczonych w: [50, 53, 56] i danych literaturowych [24, 31, 50, 53, 56]). ANT — translokaza nukleotydów adeninowych, CL-S — syntaza kardiolipiny, CK — kinaza kreatynowa, GK — kinaza glicerolowa, GPX4 — peroksydaza glutationowa 4-ta, HK — heksokinaza, PBR — obwodowy receptor benzodiazepiny, VDAC — poryna mitochondrialna, 3βHSD/I — dehydrogenaza/izomeraza 3β-hydroksysterydów.

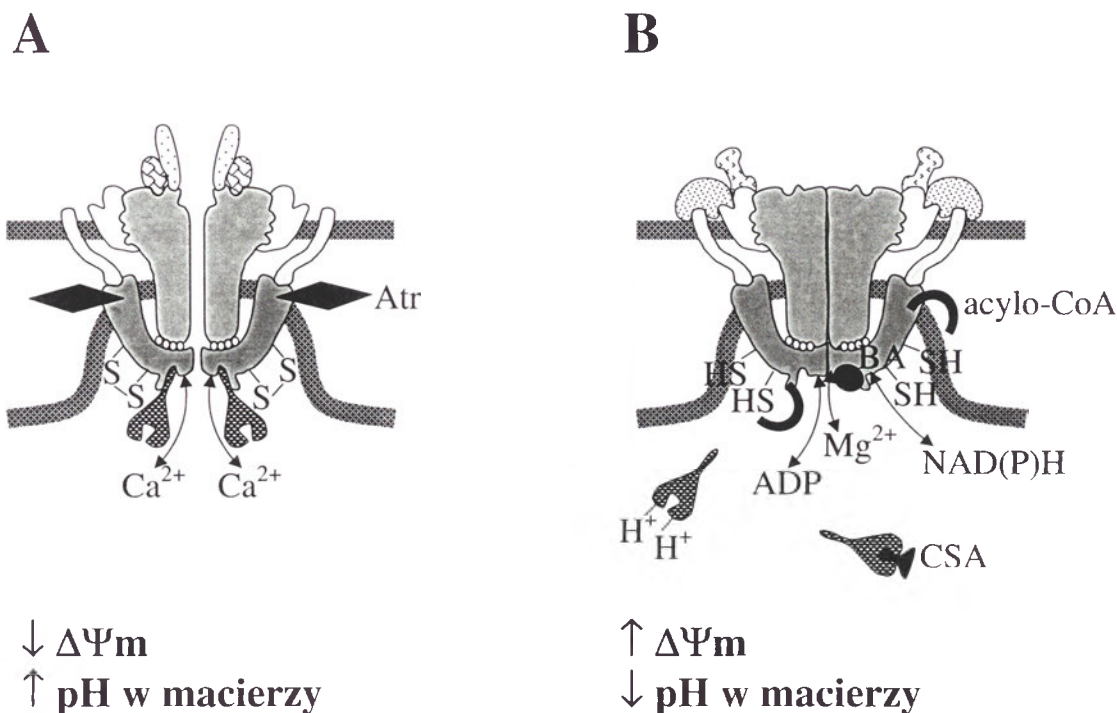
się w postaci otwarcia (niekoniecznie całkowitego) lub zamknięcia poru (Ryc. 3). Poniżej krytycznej wartości $\Delta\Psi_m$ — potencjału bramkującego — znacznie wzrasta prawdopodobieństwo otwarcia poru. Induktory przemiany przepuszczalności tak zmieniają właściwości porów, że wymagają one znacznie większej różnicy potencjałów na błonie aby pozostać zamknięte (potencjał bramkujący jest podwyższony) i mogą się otwierać już przy fizjologicznych wartościach $\Delta\Psi_m$. Inhibitory przemiany prze-

[10, 24]. Przemianie przepuszczalności sprzyja również Atr — łącząc się z ANT od strony cytoplazmatycznej [21, 24], oraz enzymy: HK i GK, które wiążą się z VDAC [24, 53] (Ryc. 3a).

Z drugiej strony, wzrost stężenia jonów wodorowych w macierzy mitochondriów (spadek pH poniżej 7,3) sprzyja zamykaniu porów nawet przy niskim $\Delta\Psi_m$. Jest to związane z protonacją reszt histydyny w białku macierzy — cyklofilinie D — w wyniku czego traci ona zdolność wiązania się z ANT. Podob-

nie działa cyklosporyna A (CSA) — swoisty inhibitor cyklofiliny D [24, 42, 53, 63, 64]. Otwieranie megakanałów jest ponadto hamowane przez przyłączenie Bcl-2 lub/i endozepiny do PBR [24, 53], zaś kwasu bongkrekowego (BA), acylo-CoA i ADP (w mniejszym stopniu ATP) do ANT od strony macierzy

do macierzy kationy są zobojętniane przez aniony nieorganiczne (głównie P_i) i organiczne (głównie białka), a ponadto wypompowywane przez nośniki antyportowe Na^+/Ca^{2+} i H^+/Ca^{2+} . W tym przypadku nie dochodzi do otwarcia megakanałów, zaś mitochondria zachowują się jak swoiste bufory wapniowe



Ryc. 3. Induktory (A) i inhibitory (B) przemiany w przepuszczalności mitochondriów. Układ białek tworzących kanał mitochondrialny — jak na Ryc. 2. Acylo-CoA — acylo-koenzym A, Atr — atraktylozyd, BA — kwas bongkrekowy, CSA — cyklosporyna A.

rzy [21, 24, 42]. ADP(ATP) zapobiega wiązaniu jonów Ca^{2+} do ANT (prawdopodobnie poprzez zmianę konformacji tego białka). Ponadto, jony metali dwuwartościowych, takie jak Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} lub Ba^{2+} , współzawodniczą z jonami Ca^{2+} o miejsce wiązania z ANT [21, 24, 45] (Ryc. 3b).

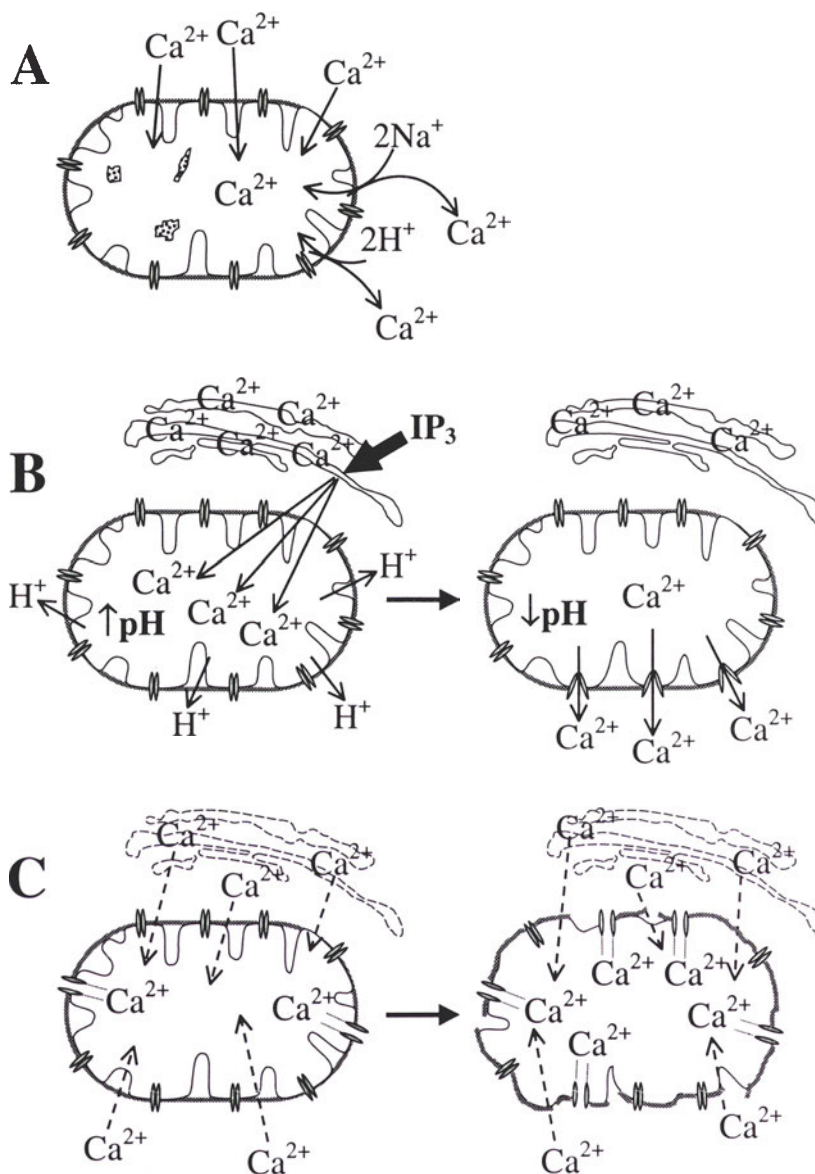
Wobec tak różnorodnych możliwości regulacji nasuwa się pytanie: kiedy w żywej komórce przemiana w przepuszczalności mitochondriów może doprowadzić do apoptozy, oraz czy istnieje swoisty czynnik warunkujący taką przemianę?

Ostatnio I c h a s i M a z a t [45] zaproponowali hipotezę, według której stopień otwarcia (stan przewodnictwa) megakanałów mitochondrialnych zależy od szybkości napływu jonów Ca^{2+} do macierzy mitochondrium (Ryc. 4). Mitochondria są zdolne do szybkiego pobierania Ca^{2+} , gdy jego stężenie w środowisku otaczającym nieznacznie tylko przekracza poziom utrzymywany w cytosolu, tzn. 0,5-1,0 μM . Zachodzi to dzięki nośnikowi uniportowemu o dużej pojemności, napędzanemu przez $\Delta\Psi_m$ — ujemny wewnątrz mitochondrium [42, 45, 65]. Przy niewielkich wzrostach stężenia Ca^{2+} w cytosolu, pobierane

we [42, 45] (Ryc. 4a). Z kolei mitochondria zlokalizowane w pobliżu siateczki śródplazmatycznej lub błony cytoplazmatycznej wystawione są na krótkotrwałe wyrzuty jonów Ca^{2+} o dużym stężeniu, co indukowane jest np. przez trifosforan inozytoli (IP_3) [42, 45, 66] (Ryc. 4b). Wskutek również szybkiego pobierania przez uniport wapniowy, stężenie Ca^{2+} w macierzy rośnie zbyt gwałtownie, aby mogły zadziałać wspomniane wyżej mechanizmy buforujące. Szybki spadek $\Delta\Psi_m$ jest wyrównywany przez wzmożone oddychanie mitochondrialne i, co z tym związane, wzmożone wypompowywanie H^+ do przestrzeni międzybłonowej. Następuje wzrost pH w macierzy i otwarcie megakanału. Stopień otwarcia nie jest w tym przypadku maksymalny i pozwala jedynie na przechodzenie związków o masie cząsteczkowej do 300 kDa, co określa się jako stan niskiego przewodnictwa. Wystarcza to jednak, aby do cytosolu uwolnił się nadmiar jonów Ca^{2+} , a równocześnie stężenia protonów po obu stronach błony wyrównały się do takiej wartości pH w macierzy, która sprzyja zamknięciu megakanału (Ryc. 4b). Naprzemienne, zależne od pH otwieranie się i zamykanie porów mi-

tochondrialnych (tzw. „migotanie” lub „mrganie” porów) obserwowano wielokrotnie. Nie następowało przy tym pęcznienie ani upośledzenie funkcji mitochondriów. Według omawianej hipotezy zjawisko to

śródpłazmatycznej) lub stymulacji glutaminianem (oddziałującym z receptorami N-metylo-D-asparagininowymi w błonie cytoplazmatycznej, co przyczynia się do stałego napływu Ca^{2+} do cytosolu): powol-



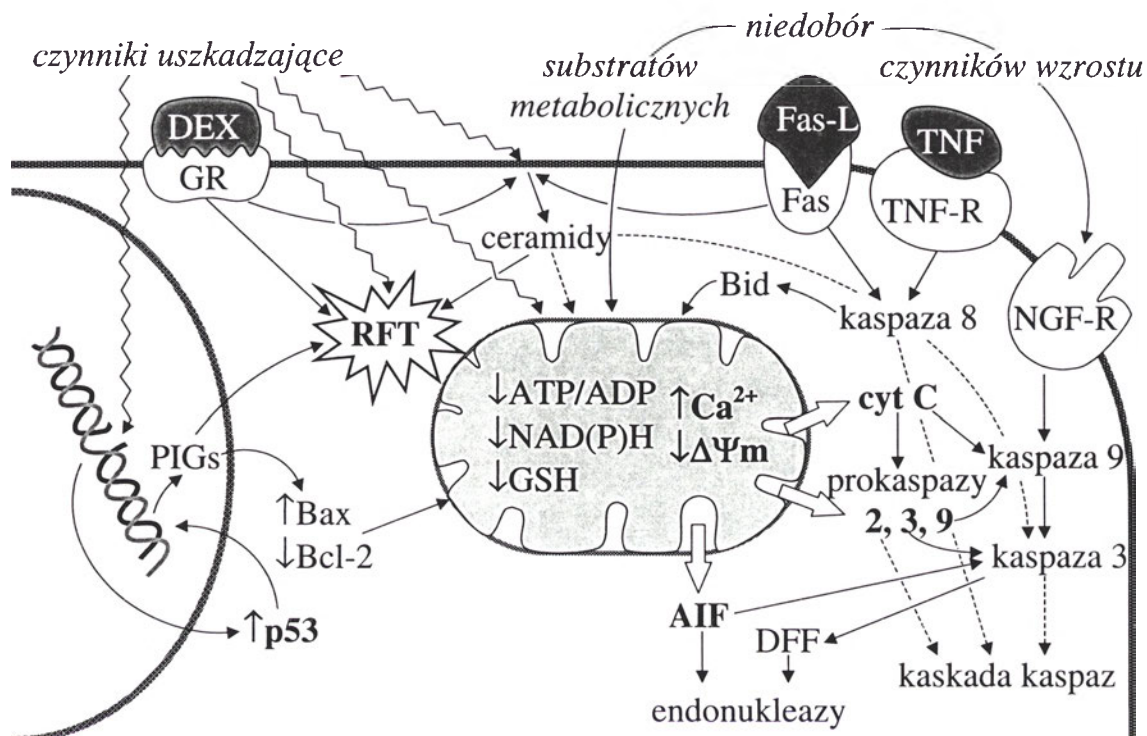
Ryc. 4. Rola jonów wapnia w regulacji stopnia otwarcia megakanałów mitochondrialnych. A — Niewielki wzrost stężenia Ca^{2+} w cytosolu. Mitochondria działają jak bufony wapniowe a megakanały pozostają zamknięte. B — Lokalny, gwałtowny lecz krótkotrwały wzrost stężenia Ca^{2+} , spowodowany np. wyrzutem jonów Ca^{2+} z siateczki śródpłazmatycznej pod wpływem trifosforanu inozytoli (IP_3). Dochodzi do szybkiego wzrostu stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondrium, po czym następuje, zależne od pH, przejściowe otwarcie megakanałów i uwolnienie nadmiaru jonów Ca^{2+} . W tym przypadku mitochondria mogą pełnić rolę przekaźników sygnałów wapniowych. C — Powolny, długotrwały napływ Ca^{2+} do cytosolu. Prowadzi on do przeładowania mitochondrium, wysycania miejsc wiążących Ca^{2+} w megakanałach i trwałego, maksymalnego ich otwarcia a w konsekwencji do pęcznienia organellum i rozrywania błony zewnętrznej.

jest częścią mechanizmu uwalniania Ca^{2+} zależnego od Ca^{2+} , dzięki któremu mitochondria odgrywają rolę przekaźników sygnałów wapniowych. Przemawia za tym fakt, że CSA, przeciwdziałając „migotaniu” porów mitochondrialnych, hamuje również sygnały wapniowe w cytosolu żywej komórki [67]. Inny jest natomiast wynik niezbyt dużego lecz długotrwałego wzrostu stężenia Ca^{2+} , np. po działaniu tap-sigarginy (inhibitor zależnej od Ca^{2+} ATPazy, powoduje opróżnianie z wapnia magazynów siateczki

ne nagromadzenie się Ca^{2+} w macierzy nie pobudza oddychania mitochondrialnego i zmian pH, dochodzi więc do przeładowania organellum wapniem. Wysycają się miejsca wiążące jony Ca^{2+} w ANT i następują zmiany konformacyjne odpowiadające maksymalnemu i nieodwracalnemu otwarciu megakanału (stan wysokiego przewodnictwa). Gradient protonowy ulega rozproszeniu i zahamowana zostaje fosforylacja oksydacyjna. W macierzy, na zasadzie koloosmozy, gromadzi się woda, co doprowadza do

pęcznienia mitochondrium i rozrywania błony zewnętrznej. Z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu uwalniają się czynniki apoptotyczne (Ryc. 4c). Podkreśla się, że związanie jonów wapnia jest niezbędne do utrzymania stanu wysokiego przewodnictwa megakanalów mitochondrialnych [10, 24]. Pozostałe induktory przemiany przepuszczalności mogą jedynie

substratów metabolicznych, również związanie ligandów z tzw. receptorami śmierci, jak Fas i TNF-R, oraz niekiedy hormonów sterydowych z ich receptorami [2, 31, 56, 72-75]. Szlaki wiodące do uruchomienia programu śmierci komórki pokazano w dużym uproszczeniu na Ryc. 5. Znakomita większość tych „prywatnych” dróg indukcji



Ryc. 5. Centralna pozycja mitochondrium na szlakach prowadzących do apoptozy. AIF — czynnik indukcji apoptozy, DEX — deksametazon, DFF — czynnik fragmentacji DNA, Fas — receptor powierzchniowy z rodziny tzw. receptorów śmierci, Fas-L — ligand receptora Fas, GR — receptor glukokortykoidów, GSH — glutation zredukowany, NGF-R — receptor czynnika wzrostu neuronów, PIGs — geny indukowane przez białko p53, RFT — reaktywne formy tlenu, TNF — czynnik nekrozy nowotworu należący do rodziny receptorów śmierci.

sprzyjać otwarciu porów [24, 45]. Podobnie jak wapń działają niektóre lipofilowe związki sieciujące grupy -SH, nie występują one jednak *in vivo* [68].

Utrzymujące się, podwyższone poziomy jonów Ca^{2+} w cytosolu zanotowano w początkowych stadiach przebiegu apoptozy wywołanej promieniowaniem jonizującym, działaniem glukokortykoidów, estrów forbolu oraz stymulacją receptorów Fas [69-71].

III. Apoptoza

III-1. Różnorodność szlaków premitochondrialnych

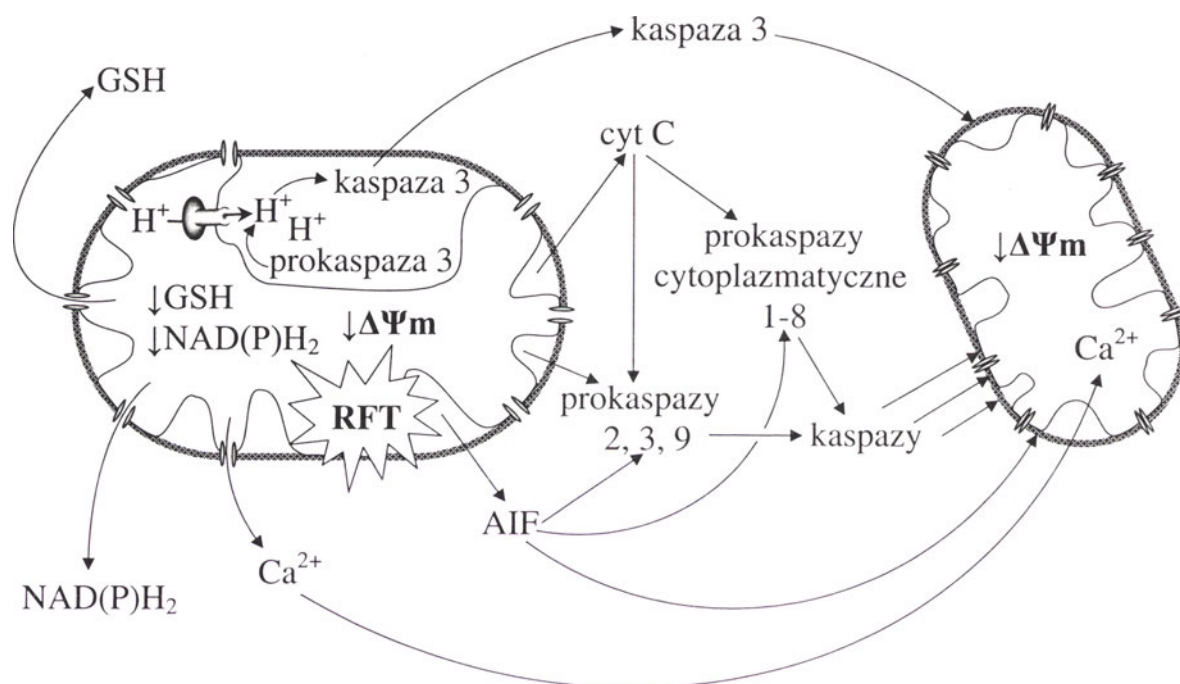
Wielość i różnorodność bodźców wywołujących apoptozę jest zadziwiająca. Zaliczają się do nich subnekrotyczne uszkodzenia powodowane przez promieniowanie, ciepło lub toksyny, brak niezbędnych czynników przeżycia, niedobór

apoptozy prowadzi do otwarcia megakanalów mitochondrialnych w wyniku zmniejszenia puli ATP/ADP lub/i obniżenia poziomu NAD(P)H i zredukowanego glutationu (GSH), obniżenia $\Delta\Psi_m$, wzrostu stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondriów a także poprzez działanie białek z rodziny Bcl-2, np. Bax i Bid [56]. Warto zauważyć, że w wielu szlakach indukcji apoptozy uczestniczą reaktywne formy tlenu (RFT) lub/i zmiany w komórkowym potencjale oksydoredukcyjnym [73]. Natomiast białko p53 — „strażnik genomu” — jest ważnym pośrednikiem na drodze do apoptozy wywołanej przez uszkodzenie DNA [76, 77].

Zahamowanie syntezy białka przez cykloheksimid nie chroni przed apoptozą [78-80] a jedynie niekiedy zmniejsza nasilenie tego procesu [81-83]. Wydaje się więc, że komórki posiadają gotowy zestaw czynników składających się na mechanizm śmierci, który w każdej chwili może być uruchomiony przez sygnał z mitochondrium.

III-2. Faza mitochondrialna — wzmocnienie sygnału śmierci

Zaobserwowano, że podczas apoptozy spadek $\Delta\Psi_m$ następuje prawie równocześnie we wszystkich mitochondriach danej komórki [25-27]. Nasunęło to przypuszczenie, że istnieje jakaś szczególna komunikacja międzymitochondrialna. Analiza zjawisk towarzyszących otwieraniu się megakanałów doprowadziła do wskazania dróg, jakimi sygnał powstały w pojedynczym mitochondrium może ulegać samowzmocnieniu i przenosić się na inne mitochondria, bardziej odporne na bodziec apoptogenny (Ryc. 6).



Ryc. 6. Mechanizmy wzmocnienia mitochondrialnego sygnału śmierci. GSH — glutation zredukowany, RFT — reaktywne formy tlenu.

Otwarcie megakanałów w mitochondrium prowadzi do załamania $\Delta\Psi_m$, zatrzymania syntezy ATP, wypływu z macierzy GSH, NAD(P)H i jonów Ca^{2+} [24, 42, 84]. Z przestrzeni międzylonowej wydostają się do cytoplazmy białka apoptogenne: cytochrom *c* (cyt *c*), czynnik indukcji apoptozy (AIF) oraz prokaspazy 2, 3 i 9 [17, 18, 31, 85-88]. Obniżenie poziomów GSH i NAD(P)H sprzyja utrwaleniu otwartej konformacji megakanałów. Uwolnione do cytoplazmy jony Ca^{2+} „doładują” inne mitochondria prowadząc do obniżenia w nich $\Delta\Psi_m$ [24]. Ubytek cyt *c* przerywa łańcuch oddechowy, co powoduje nadprodukcję RFT (głównie anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru) [51, 89-91]. RFT z kolei utleniają lipidy błony wewnętrznej (głównie kardiolipinę), co przyczynia się do jej uprzepuszczalności [51]. W cytoplazmie cyt *c* aktywuje ka-

skadę kaspaz [92] — wszystkie te enzymy są w stanie samodzielnie wywołać przemianę przepuszczalności w nieuszkodzonych mitochondriach — poprzez trawienie (bliżej nieznanych) substratów białkowych w błonach [93]. Również AIF powoduje załamanie $\Delta\Psi_m$ i przemianę w przepuszczalności w natywnych mitochondriach [94]. Wreszcie prokaspazy 2, 3 i 9 z przestrzeni międzylonowej wzmacniają, po aktywacji w cytoplazmie, działanie innych enzymów proteolitycznych [86, 87]. Dodatkowo prokaspaza 3, już w przestrzeni międzylonowej, może ulegać autoaktywacji przy obniżeniu pH, które towarzyszy zatrzymaniu syntezy ATP (równowaga reakcji syntazy

ATP przesuwają się w kierunku rozkładu ATP i enzym zaczyna wypompywać protony z macierzy) [8, 95].

Przedstawione mechanizmy rozprzestrzeniania się sygnału śmierci znajdują potwierdzenie zarówno w badaniach *in vitro* — na megakanałach zrekonstruowanych w sztucznych błonach i na izolowanych mitochondriach — jak również *in vivo* [18, 43, 85, 93].

III-3. Faza postmitochondrialna

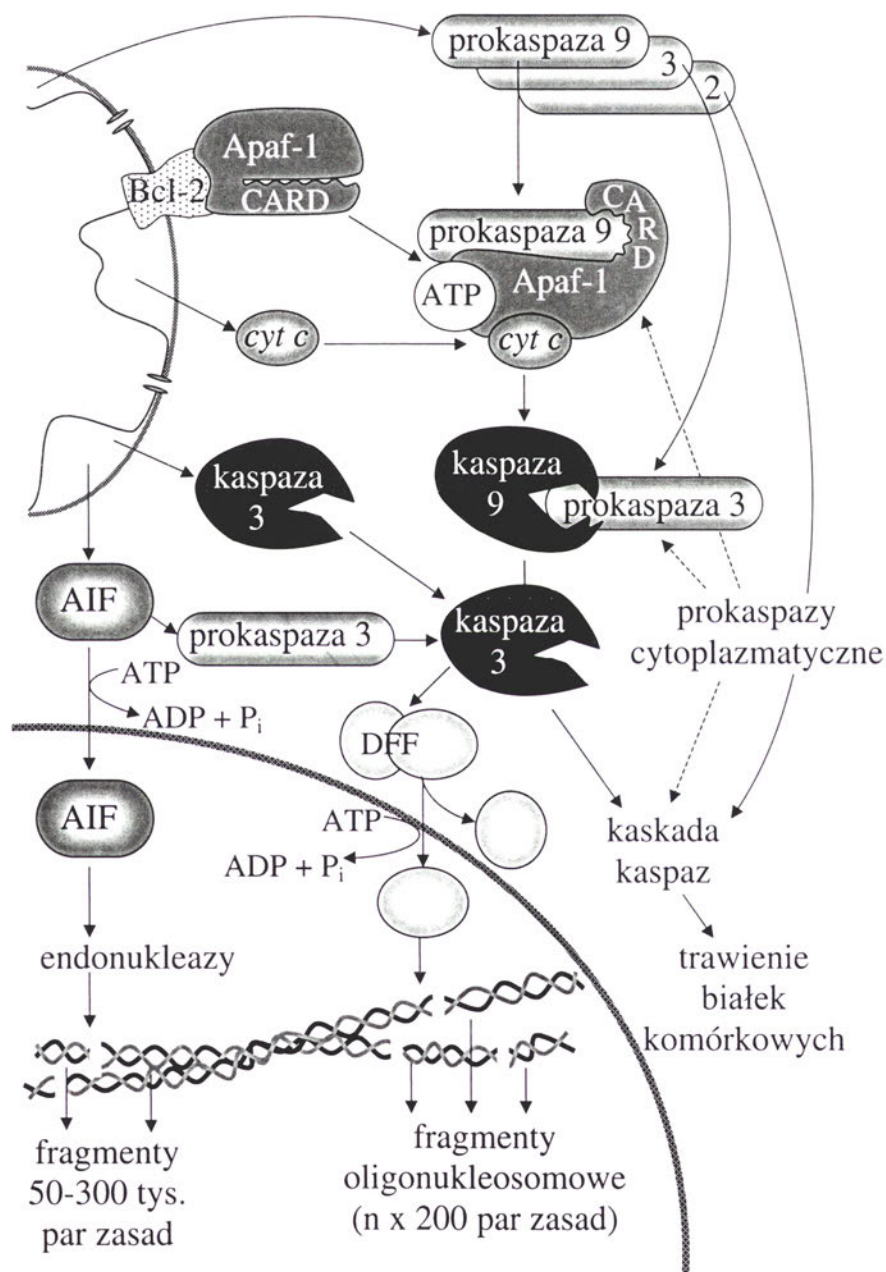
III-3.1. Białkowe czynniki aktywacji apoptozy: cytochrom *c*, AIF, kaspazy

Dotychczas nie wyjaśniono, w jaki sposób dochodzi do uwalniania białek z przestrzeni międzylonowej — megakanały, nawet całkowicie otwarte, nie przepuszczają cząsteczek o ciężarze większym niż

1,5 kDa [24, 28]. W wielu przypadkach przemiana w przepuszczalności doprowadza do pęcznienia mitochondrium i rozrywania błony zewnętrznej [17, 18, 26, 48]. Bywa jednak i tak, że w cytoplazmie stwierdza się obecność cyt *c* mimo braku oznak uszkodzenia błony (np. przy nadekspresji białka Bax [96, 97]). Pokazano jednak, że wpływ cyt *c* i AIF nie nastąpi, jeśli w środowisku znajduje się w nadmiarze białko Bcl-2 lub/i zahamowane zostanie działanie określonej grupy kaspaz [14, 17, 28]. W przestrzeni międzybłonowej znajdują się prokaspazy 2, 3 i 9 [86-88] i przynajmniej prokaspaza 3 łatwo ulega tam autoaktywacji przy obniżeniu pH (patrz rozdz. III-2). Ponadto w cytoplazmie niektóre prokaspazy mogą być

aktywowane z pominięciem drogi przez mitochondrium (np. po stymulacji tzw. receptorów śmierci [98, 99]). Teoretycznie istnieje też możliwość aktywnego transportu białek (jako odwrócenia ich importu do mitochondrium [100]); być może Bax i/lub kaspazy pełnią rolę aktywatorów tego procesu.

Wydostające się z przestrzeni międzybłonowej białka zapoczątkowują fazę wykonawczą apoptozy (Ryc. 7). Prokaspazy 2, 3 i 9 w cytoplazmie włączają się w łańcuch, w którym jedna proteaza aktywuje na-



Ryc. 7. Aktywacja procesu apoptozy przez białkowe czynniki uwalniane z mitochondrium: AIF (czynnik indukcji apoptozy), cyt *c* (cytochrom *c*) i kaspazy. Apaf-1 — czynnik 1-szy aktywujący proteazy w apoptozie, CARD — domena werbunku kaspaz, DFF — czynnik fragmentacji DNA.

dzybłonowej znajdują się prokaspazy 2, 3 i 9 [86-88] i przynajmniej prokaspaza 3 łatwo ulega tam autoaktywacji przy obniżeniu pH (patrz rozdz. III-2). Ponadto w cytoplazmie niektóre prokaspazy mogą być

stępną, co w efekcie doprowadza do trawienia ważnych dla życia komórki białek (m.in. lamin, aktyny, polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP), kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK) [95]), oraz

aktywacji czynnika fragmentacji DNA (DFF) [95, 101] – endonukleazy, która tnie DNA na fragmenty oligonukleosomowe [101, 102]. Czynnikiem warunkującym rozpoczęcie tej kaskady aktywacji w komórkach kręgowców jest cyt *c* [85, 103-106]. Łączy się on z czynnikiem 1-szym apoptozy aktywującym proteazy (Apaf-1) — białkiem, które zlokalizowane jest przy błonie mitochondrialnej i prawdopodobnie związane z Bcl-2. Pod wpływem cyt *c* Apaf-1 zmienia konformację odsłaniając domenę werbunku kaspazy (CARD), co pozwala na związanie prokaspazy 9. W utworzonym kompleksie, tzw. apoptosomie, następuje, z wykorzystaniem energii hydrolizy ATP, aktywacja prokaspazy 9. Ta z kolei, na drodze częściowej proteolizy, aktywuje kaspazę 3 rozpoczynając kaskadę aktywacji innych enzymów [92].

W odróżnieniu od cyt *c*, AIF spełnia funkcję apoptogenną samodzielnie. Białko to, po przemieszczeniu się do jądra (proces aktywny — wymagający ATP), aktywuje endonukleazy. Tną one DNA na duże (50-300 tys. par zasad) fragmenty [94, 102, 107]. W cytoplazmie AIF aktywuje kaspazę 3 i wywołuje spadek $\Delta\Psi_m$ w natywnych mitochondriach [102]. Mechanizm działania AIF pozostaje jak dotąd niewyjaśniony — białko to samo nie ma aktywności proteazy ani nukleazy [94].

Zarówno cyt *c* jak i AIF są białkami filogenetycznie starymi i wysoce konserwatywnymi [18, 94]. Poza funkcją apoptogenną mają one możliwość katalizowania reakcji utleniania-redukcji; wskazuje na to obecność kofaktorów: hemu w przypadku cyt *c* i FAD w przypadku AIF. Cyt *c* jest integralnym składnikiem mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów. AIF wykazuje homologię do niektórych oksydoreduktaz bakteryjnych [94]. Jak dotąd nie stwierdzono jednak, aby uczestniczył w reakcjach utleniania-redukcji w mitochondrium. Aktywność apoptogenną oba białka uzyskują dopiero po przetransportowaniu do mitochondrium, gdzie, po obróbce proteolitycznej i przyłączeniu kofaktora, uzyskują odpowiednią konformację [94, 102]. Drogi aktywacji apoptozy wiodące od cyt *c* i AIF są niezależne i niekoniecznie jednocześnie uruchamiane w tej samej komórce [38, 94, 102, 104, 107].

IV. Autofagia, apoptoza czy nekroza?

Wbrew poprzednim poglądom głoszącym, że apoptoza i nekroza są odrębnymi procesami, przedstawiono ostatnio dowody, że oba zjawiska mają swój początek w przemianie przepuszczalności mitochon-

driów [2]. Uważana dotychczas za nekrozę śmierć komórek spowodowana zawałem serca, udarem mózgu lub działaniem utleniaczy poprzedzona jest spadkiem $\Delta\Psi_m$ w mitochondriach tych komórek, można też jej zapobiec stosując CSA lub białko Bcl-2 [31]. Ważnym czynnikiem określającym decyzję: apoptoza czy nekroza jest poziom wewnątrzkomórkowego ATP w momencie, gdy dochodzi do załamania $\Delta\Psi_m$ [108-110]. Energia zmagazynowana w ATP jest wykorzystywana na wszystkich głównych szlakach aktywacji kaspaz: wiodących od cyt *c* [92], AIF [94] i receptorów śmierci [35]. Towarzyszące otwarciu megakanalów zatrzymanie fosforylacji oksydacyjnej i jednoczesna aktywacja ATPazy mitochondrialnej przyspieszają ubytek ATP z komórki [89, 111]. Jeśli glikoliza jest w stanie uzupełnić ten ubytek — proces apoptozy zostaje podtrzymany. W przeciwnym wypadku niedostatek energii doprowadza do zatrzymania funkcji życiowych komórki i niekontrolowanej lizy — nekrozy [2, 112]. Przy dostatecznej podaży ATP, zahamowanie działania kaspaz przez zastosowanie inhibitorów egzogennych (np. zmodyfikowanego oligopeptydu Z-VAD.fmk) lub endogennych (białek z rodziny inhibitorów apoptozy, IAPs [113]) doprowadza do lizy komórek bez wystąpienia objawów apoptozy [107, 114, 115]. Przypuszcza się, że podczas gwałtownej przemiany przepuszczalności obejmującej większość mitochondriów w komórce kaspazy mogą być również dezaktywowane przez utlenienie lub nitrylację [2]. Spadek $\Delta\Psi_m$ związany jest także ze zjawiskiem autofagii czyli degradacji pojedynczych mitochondriów w lizosomach komórki. Jest ona częścią stałego procesu wymiany tych organelli, łatwego do zaobserwowania w tkankach nie dzielących się, np. w sercu, mózgu, wątrobie i nerkach [32]. Zaproponowano model, w którym szybkość i zakres spadku $\Delta\Psi_m$ w komórce decyduje, czy nastąpi w niej autofagia, apoptoza czy nekroza [32]. Jeśli w pojedynczych mitochondriach, spontanicznie lub pod wpływem usunięcia składników odżywczych, następuje depolaryzacja — rozpoznawane są one jako nieprawidłowe i ulegają wewnątrzkomórkowej lizie — autofagii. Czynnikiem wywołującym spadek $\Delta\Psi_m$ w większej liczbie mitochondriów może doprowadzić do uwolnienia cyt *c* i AIF. Przy dostatecznym poziomie ATP zaktywowane zostaną kaspazy i rozwinie się apoptoza. Wreszcie, gwałtowne i równoczesne załamanie się $\Delta\Psi_m$ w większości mitochondriów komórki doprowadza do nekrozy wskutek szybkiego zużycia zasobów ATP.

V. Apoptoza a defekty mitochondrialne

Medycyna zna wiele przypadków, w których zmieniona podatność komórek na apoptozę doprowadza do choroby. Dokładne badania przeprowadzane ostatnio wykazują, że u podłoża większości tych zaburzeń leżą defekty funkcjonalne samych mitochondriów [116] lub zmiany w białkach współdziałających z tymi organellami w regulacji odpowiedzi komórki na bodźce apoptogenne [117]. W Tabeli 1 podano przykłady takich stanów chorobowych.

Tabela 1.

Zespoły chorobowe związane ze zmienioną podatnością komórek na apoptozę

Stan lub zespół chorobowy (badane komórki)	Przypuszczalny defekt funkcjonalny mitochondriów	Podatność na apoptozę	Piśmiennictwo
choroba Parkinsona (neurony mózgu, fibroblasty, leukocyty, trombocyty)	obniżona aktywność kompleksu I, $\downarrow\Delta\Psi_m$, \uparrow RFT	podwyższona	53, 118
choroba Alzheimerera (neurony mózgu, trombocyty)	obniżona aktywność kompleksu IV, niekiedy również II i III, $\downarrow\Delta\Psi_m$, \uparrow RFT	podwyższona	53
infekcja wirusem HIV-1 (limfocyty T)	upośledzenie transportu elektronów (przyczyna nieznana), $\downarrow\Delta\Psi_m$, \uparrow RFT	podwyższona	132, 133
zespół Reye'a (neurony mózgu, hepatocyty)	nadmierne nagromadzenie Ca^{2+} w mitochondriach po przebytej infekcji wirusowej	gwałtowna apoptoza pod wpływem zwykle nieszkodliwych leków (głównie salicylanów)	32
proces starzenia (komórki mięśni prążkowanych, fibroblasty)	obniżona aktywność kompleksu IV mutacje uodporniające mitochondria na $\downarrow\Delta\Psi_m$	podwyższona bez zmian, obniżona autofagia (sprzyja nagromadzeniu się mutacji w mtDNA)	134 32
niektóre białaczki	nadmierna ekspresja lub mutacja w białku Bcl-2	obniżona	117

Jest zrozumiałe, iż dokładne poznanie molekularnych mechanizmów apoptozy daje szansę na opracowanie skutecznych metod wykrywania i leczenia zarówno chorób, w których podatność na apoptozę jest podwyższona (np. choroby neurodegeneracyjne) [53, 118] jak i obniżona (np. białaczki) [117].

VI. Uwagi końcowe

Apoptoza występuje powszechnie wśród organizmów eukariotycznych. Początków kształtowania się tego procesu należy szukać około 2 miliardów lat temu, kiedy, jak się przypuszcza, doszło do symbiozy komórek proeukariotycznych z przodkami

współczesnych bakterii purpurowych; te ostatnie miały się z czasem przekształcić w mitochondria [91, 114]. Ewolucja doprowadziła do powstania ogromnej różnorodności form życia. Trudno się spodziewać, aby mechanizmy śmierci programowanej rozwinęły się wszędzie w jednakowej postaci. Przedstawione w tej pracy dane na temat roli mitochondriów w procesie apoptozy uzyskano dzięki doświadczeniom przeprowadzanym wyłącznie na komórkach ssaków. I tak dla przykładu, w komórkach tych cyt *c* jest jednym z ważniejszych czynników, które zapoczątkowują apoptozę. Blokują one sekwencje inhi-

bitorowe w cząsteczce Apaf-1, co umożliwia oligomeryzację tego białka adaptorowego i aktywację kaspazy 9 [115]. U robaka *Caenorhabditis elegans* występuje analog Apaf-1. Jest to białko Ced-4, które nie zawiera sekwencji inhibitorowych i nie wymaga cyt *c* do aktywacji [72, 119]. U owadów cyt *c* odgrywa prawdopodobnie rolę podobną jak u ssaków [120], lecz nie jest on uwalniany do cytosolu a jedynie, pod wpływem induktorów apoptozy, ulega zmianom konformacyjnym [120]. Szlaki apoptozy u roślin pozostają ciągle słabiej poznane niż u zwierząt [121]. Jednak fakt, że cytosol z apoptotycznych komórek roślinnych (marchew) jest w stanie wywołać apoptozę w jądrach komórek zwierzęcych (wątroba mysia) [122]

świadczy o zadziwiającym podobieństwie procesu śmierci programowanej u wszystkich eukariontów.

Obecna praca koncentruje się na roli mitochondriów w zapoczątkowywaniu programu śmierci komórki. Należy pamiętać, że w komórce istnieją liczne systemy regulacyjne, które mogą wpływać na funkcję apoptogenną mitochondriów.

Taki rozbudowany system tworzą białka z rodziny Bcl-2. Oddziałują one (w bliżej nieznanym jeszcze sposób) z błonami mitochondriów i innych struktur wewnątrzkomórkowych, regulując ich przepuszczalność. Należą tu zarówno inhibitory apoptozy (białka typu Bcl-2) jak i jej aktywatory (białka typu Bax) [56, 123].

Pojawia się też coraz więcej informacji na temat białek z rodziny inhibitorów kaspaz — IAPs [124, 125], oraz enzymów blokujących włączanie się proteaz w proces apoptozy. Przykładem jest kinaza Akt, która fosforyluje prokaspazę 9, zapobiegając w ten sposób jej aktywacji [126].

Wykazywano wielokrotnie, że czynniki wzrostu, takie jak NGF lub IGF, mogą indukować szlaki antyapoptotyczne poprzez indukcję/aktywację inhibitorów kaspaz, zaś inaktywację czynników promujących apoptozę, jak np. białko Bad (białko typu Bax) [126-129]. Obserwowano nawet odwrócenie procesu apoptozy przez NGF, już po uwolnieniu cyt *c* do cytosolu [130]. Stwierdzono jeszcze inną ochronę przed apoptozą: W komórkach mięśni szkieletowych człowieka brak ekspresji białka adaptorowego Apaf-1 i w związku z tym nie dochodzi tam do zależnej od cyt *c* aktywacji kaspaz. Jest to ciekawa adaptacja ewolucyjna, pozwalająca na ominięcie głównego szlaku apoptozy w przypadku dużej liczby mitochondriów [131]. W komórce pozbawionej mechanizmu wyzwalanego przez cyt *c* pozostaje szlak indukowany przez AIF. Prowadzi on do fragmentacji DNA i wczesnej nekrozy [72]

Komórka mająca w pogotowiu tak wielorakie mechanizmy zabezpieczające przed apoptozą nie zawsze podda się procesowi programowanego rozpadu. „Zdolność do umierania” (*competence to die*) jest jej cechą indywidualną i zależy od względnego udziału szlaków pro- i antyapoptotycznych.

Podziękowania

Autorka jest wdzięczna prof. dr hab. Irenie Szumiel za wskazanie szeregu najnowszych, interesujących artykułów z dziedziny apoptozy. Pragnie również podziękować prof. dr hab. Irenie Szumiel, dr Barbarze

Sochanowicz i dr Marcinowi Kruszewskiemu za cenne uwagi dotyczące rękopisu pracy.

Artykuł otrzymano 2 grudnia 1999 r.

Zaakceptowano do druku 10 stycznia 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Sen S (1992) *Biol Rev* **67**: 287-319
2. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1998) *Biochim Biophys Acta* **1366**: 151-165
3. Kerr FJ, Wyllie AH, Currie AR (1972) *Br J Cancer* **26**: 239-257
4. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 470-478
5. Collins MK, Lopez-Rivas A (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 307-309
6. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA (1995) *Trends Cell Biol* **5**: 21-26
7. Thompson CB (1995) *Science* **267**: 1456-1462
8. Green D, Kroemer G (1998) *Trends Cell Biol* **8**: 267-271
9. Cossarizza A, Kalashnikova G, Grassilli E, Chiappelli F, Salvioli S, Capri M, Barbieri D, Troiano L, Monti D, Franceschi C (1994) *Exp Cell Res* **214**: 323-330
10. Murgia M, Pizzo P, Sandona D, Zanovello P, Rizzuto R, Di Virgilio F (1992) *J Biol Chem* **267**: 10939-10941
11. Tepper CG, Studzinski GP (1993) *J Cell Biochem* **52**: 352-361
12. King MP, Attardi G (1989) *Science* **246**: 500-503
13. Gamon S, Anel A, Montoya J, Marzo I, Pineiro A, Naval J (1995) *FEBS Lett* **376**: 15-18
14. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miashita T, Reed JC, Raff MC (1993) *Nature* **361**: 365-369
15. Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC (1994) *Cell* **79**: 353-364
16. Martin SJ, Newmeyer S, Mathisa S, Farschon DM, Wang HG, Reed JC, Kolesnick RN, Green DR (1995) *EMBO J* **14**: 5191-5200
17. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996) *J Exp Med* **184**: 1331-1342
18. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G (1996) *J Exp Med* **183**: 1533-1544
19. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC (1994) *EMBO J* **13**: 1899-1910
20. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH (1976) *J Biol Chem* **251**: 5069-5077
21. Hunter DR, Haworth RA (1979) *Arch Biochem Biophys* **195**: 453-459
22. Hunter DR, Haworth RA (1979) *Arch Biochem Biophys* **195**: 460-467
23. Hunter DR, Haworth RA (1979) *Arch Biochem Biophys* **195**: 468-477
24. Zoratti M, Szabó I (1995) *Biochim Biophys Acta* **1241**: 139-176
25. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G (1995) *J Exp Med* **181**: 1661-1672
26. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeffner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G (1996) *J Exp Med* **184**: 1155-1160
27. Marzo I, Brenner C, Kroemer G (1998) *Biomed Pharmacother* **52**: 248-252
28. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beurner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G (1998) *J Exp Med* **187**: 1261-1271

29. Zamzami N, Marzo I, Susin SA, Brenner C, Larochette N, Marchetti P, Reed JC, Kofler R, Kroemer G (1998) *Oncogene* **16**: 1055-1063
30. Marchetti P, Susin S.A., Decaudin D, Gamen S, Castedo M, Hirsch T, Zamzami N, Naval J, Sennik A, Kroemer G (1996) *Cancer Res* **56**: 2033-2038
31. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997) *Immunol Today* **18**: 44-51
32. Lemasters JJ, Nieminen A-L, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B (1998) *Biochim Biophys Acta* **1366**: 177-196
33. Sikora E (1994) *Post Biochem* **40**: 150-160
34. Sikora E (1996) *Post Biochem* **42**: 108-112
35. Grzelakowska-Sztabert B (1998) *Post Biochem* **44**: 8-21
36. Bartosz G (1998) *Post Biochem* **44**: 22-31
37. Widlak P (1998) *Post Biochem* **44**: 252-254
38. Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Krett N, Halgreen, R, Rosen S, Kufe D, Kharbanda S, Anderson K (1997) *J Biol Chem* **272**: 29995-29997
39. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH, Peter ME (1998) *EMBO J* **17**: 1675-1687
40. Ashkenazi A, Dixit VM (1998) *Science* **281**: 1305-1308
41. Attardi G, Schatz G, (1988) *Annu Rev Cell Biol* **4**: 289-333
42. Bernardi P, Petronilli V (1996) *J Bioenerg Biomembr* **28**: 129-136
43. Richter C (1993) *FEBS Lett* **325**: 104-107
44. Scorrano L, Petronilli V, Bernardi P (1997) *J Biol Chem* **272**: 12295-12299
45. Ichas F, Mazat J-P (1998) *Biochim Biophys Acta* **1366**: 33-50
46. Kroemer G, Lisardo B, Zamzami N, Hortelano S, Martinez AC (1997) W: Lefkowitz R (red), *The Immunology Methods Manual*. Academic Press, New York, str. 1111-1125
47. Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR (1994) *J Bioenerg Biomembr* **26**: 509-517
48. Petit PX, Goubern M, Diolec P, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1998) *FEBS Lett* **426**: 111-116
49. Van der Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997) *Cell* **91**: 627-637
50. Green DR, Reed JC (1998) *Science* **281**: 1309-1312
51. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G (1995) *J Exp Med* **182**: 367-377
52. Macho A, Decaudin D, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1996) *Cytometry* **25**: 333-340
53. Tatton WG, Olanow CW (1999) *Biochim Biophys Acta* **1410**: 195-213
54. Neher E, Sakmann B (1976) *Nature* **260**: 779-802
55. Petronilli V, Szabó I, Zoratti M (1989) *FEBS Lett* **259**: 137-143
56. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G (1998) *Oncogene* **16**: 2265-2282
57. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed J (1993) *Cancer Res* **53**: 4701-4714
58. Riparbelli MG, Callaini G, Tripodi SA, Cintorino M, Tosi P, Dallai R (1995) *Exp Cell Res* **221**: 363-369
59. Carayon P, Portier M, Dussossoy D, Bord A, Petitpre G, Canat X, Le Fur G, Casellas P (1996) *Blood* **87**: 3170-3178
60. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Veira HLA, Prévost M-C, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998) *Science* **281**: 2027-2031
61. Packer MA, Miesel R, Murphy MP (1996) *Biochem Pharmacol* **51**: 267-273
62. Constantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P (1996) *J Biol Chem* **271**: 6746-6751
63. Fournier N, Ducet G, Crevat A (1987) *J Bioenerg Biomembr* **19**: 297-303
64. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P (1996) *J Biol Chem* **271**: 2185-2192
65. Nicholls DG, Ferguson SJ (1995) *Bioenergetyka 2*. Wydawnictwo Naukowe PWN
66. Lawrie AM, Rizzuto R, Pozzan T, Simpson AW (1996) *J Biol Chem* **271**: 10753-10759
67. Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS, Mazat J-P, Holmuhamedov EL (1994) *FEBS Lett* **348**: 211-215
68. Lenartowicz E, Bernardi P, Azzone GF (1991) *J Bioenerg Biomembr* **23**: 679-688
69. Bian X, Hughes FM Jr, Huang Y, Cidlowski JA, Putney JW Jr (1997) *Am J Physiol* **272**: C1241-C1249
70. Jayaraman T, Marks AR (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 3005-3012
71. Zhao Q-L, Kondo T, Noda A, Fujiwara Y (1999) *Int J Radiat Biol* **75**: 493-504
72. Bossy-Wetzell E, Green DR (1999) *Mutat Res* **434**: 243-251
73. Jabs T (1999) *Biochem Pharmacol* **57**: 231-245
74. Zhivotovsky B, Joseph B, Orrenius S (1999) *Exp Cell Res* **248**: 10-17
75. Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A, Riccardi C (1999) *Blood* **93**: 2282-2296
76. Wyllie A (1997) *Nature* **389**: 237-238
77. Polyak K, Xia Y, Zweiter JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) *Nature* **389**: 300-305
78. Ischizaki Y, Cheng L, Mudge AW, Raff MC (1995) *Mol Biol Cell* **6**: 1443-1458
79. Niwa M, Hara A, Kanamori Y, Matsumoto H, Kozawa O, Yoshimi N, Mori H, Uematsu T (1999) *Eur J Pharmacol* **371**: 59-67
80. Morita Y, Tilly JL (1999) *Endocrinology* **140**: 2696-2703
81. Goering PL, Thomas D, Rojko JL, Lucas AD (1999) *Toxicol Lett* **105**: 183-195
82. Goldberg MP, Jacquin M, Choi DW (1999) *Neuroscience* **90**: 1339-1348
83. Musat-Marcu S, Gunter HE, Jugdutt BI, Docherty JC (1999) *J Mol Cell Cardiol* **31**: 1073-1082
84. Desjardins P, Frost E, Morais R (1985) *Molec Cell Biol* **5**: 1163-1169
85. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) *Cell* **86**: 147-157
86. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A (1998) *J Cell Biol* **140**: 1485-1495
87. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G (1999) *J Exp Med* **189**: 381-394
88. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S (1999) *Cell Death Differ* **6**: 644-651
89. Cai J, Jones DP (1998) *J Biol Chem* **273**: 11401-11404
90. Murphy AN, Fiskum G, Beal MF (1999) *J Cereb Blood Flow Metab* **19**: 231-245
91. Blackstone NW, Green DR (1999) *BioEssays* **21**: 84-88
92. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) *Cell* **91**: 479-489
93. Marzo I, Susin SA, Petit PX, Ravagnan L, Brenner C, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G (1998) *FEBS Lett* **427**: 198-202
94. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Godlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) *Nature* **397**: 441-446
95. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DWC, Mc Manus BM (1998) *Lab Invest* **78**: 893-913
96. Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* **95**: 4997-5002

97. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR (1999) *J Biol Chem* **274**: 2225-2233
98. Depraetere V, Goldstein P (1997) *Semin Immunol* **9**: 93-107
99. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW (1998) *Cell* **94**: 739-750
100. Mayer A, Neupert W, Lill R (1995) *J Biol Chem* **270**: 12390-12397
101. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) *Cell* **89**: 175-184
102. Samejima K, Tone S, Kottke TJ, Enari M, Sakahira H, Cooke CA, Durrieu F, Martins LM, Nagata S, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1998) *J Cell Biol* **143**: 225-239
103. Yang J, Liu XS, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai JY, Peng TI, Jones DP, Wang XD (1997) *Science* **275**: 1129-1132
104. Li F, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Fritz LC (1997) *J Biol Chem* **272**: 30299-30305
105. Neame SJ, Rubin LL, Philpott KL (1998) *J Cell Biol* **142**: 1583-1593
106. Cai J, Yang J, Jones DP (1998) *Biochim Biophys Acta* **1366**: 139-149
107. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G (1999) *Cell Death Differ* **6**: 516-524
108. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P (1997) *J Exp Med* **185**: 1481-1486
109. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997) *Cancer Res* **57**: 1835-1840
110. Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C (1996) *FEBS Lett* **378**: 107-110
111. Nieminen A-L, Saylor AK, Herman B, Lemasters JJ (1994) *Am J Physiol* **267**: C67-C74
112. Qian T, Herman B, Lemasters JJ (1999) *Toxicol Appl Pharmacol* **154**: 117-125
113. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC (1998) *J Biol Chem* **273**: 7787-7790
114. Margulis L (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1071-1076
115. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998) *Mol Cell* **1**: 949-957
116. Suomalainen A (1997) *Ann Med* **29**: 235-246
117. Kusenda J (1998) *Neoplasma* **45**: 117-122
118. Tatton WG, Chalmers-Redman RM (1998) *Ann Neurol* **44**: 5134-5141
119. Yang X, Chang HY, Baltimore D (1998) *Science* **281**: 1355-1357
120. Rodriguez A, Oliver H, Zou H, Chen P, Wang X, Abrams JM (1999) *Nat Cell Biol* **1**: 272-279
121. Pennell RI, Lamb C (1997) *Plant Cell* **9**: 1157-1168
122. Zhao Y, Jiang ZF, Sun YL, Zhai ZH (1999) *FEBS Lett* **448**: 197-200
123. Adams JM, Cory S (1998) *Science* **281**: 1322-1326
124. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998) *EMBO J* **17**: 2215-2223
125. Grzelakowska-Sztabert B (1999) *Post Biochem* **45**: 167-176
126. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) *Science* **282**: 1318-1321
127. Kothny-Wilkes G, Kulms D, Luger TA, Kubin M, Schwarz T (1999) *J Biol Chem* **274**: 28916-28922
128. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhsa T (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1457-1462
129. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 7203-7215
130. Martinou I, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, Andre E, Fakan S, Martinou J-C (1999) *J Cell Biol* **144**: 883-889
131. Burgess DH, Svensson M, Dandrea T, Gronlund K, Hammarquist F, Orrenius S, Cotgreave IA (1999) *Cell Death Differ* **6**: 256-261
132. Macho A, Castedo M, Marchetti P, Aguilar JJ, Decaudin D, Zamzami N, Girard PM, Uriel J, Kroemer G (1995) *Blood* **86**: 2481-2487
133. Cossarizza A, Mussini C, Mongiardo N, Borghi V, Sabbatini A, De Rienzo B, Franceschi C (1997) *AIDS* **11**: 19-26
134. Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, James OF, Turnbull DM (1998) *Ann Neurol* **43**: 217-223

Czy komórki projektują własny genom?

Are cells engineering their own genomes?

ANNA PŁATEK¹, KRZYSZTOF FLIS¹, ELŻBIETA WYROBA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rearanżacje genomu podczas formowania się jądra wegetatywnego u eukariotycznych jednokomórkowców — orzęsków
 - II-1 Występowanie sekwencji usuwanych (IES)
 - II-2. Ewolucyjne pochodzenie IES — podobieństwa do transpozonów
 - II-3. Tasowanie genów
- III. Przykłady rearanżacji genomu u innych organizmów
 - III-1 Jednogenowy kolisty DNA w chloroplastach *Dinoflagellata*
 - III-2. „Gorące miejsca” mutacji w genomie drapieżnych ślimaków

Wykaz stosowanych skrótów: IES — sekwencja usuwana; MDS — segment przeznaczony do jądra wegetatywnego

I. Wstęp

Rearanżacje genomu są przedmiotem licznych badań od kiedy okazało się, że mutacje prowadzące do zmian ewolucyjnych zachodzą częściej niż przypuszczano. Zmiany te obejmują przeniesienie dużych fragmentów DNA lub też tasowanie czy zwielokrotnienie materiału genetycznego. Wszystkie te procesy mogą wpływać na ekspresję i tworzenie nowych genów. Co więcej, rearanżacje genomu nie muszą zachodzić przypadkowo. Okazuje się, że pewne odcinki DNA są bardziej podatne od innych na duplikację lub przeniesienie w inne miejsce chromosomu i związane jest to z ich sekwencją nukleotydową. Enzymy, które kopiuje i konserwują DNA wprowadzają zmiany tylko w pewnych częściach genomu, tworząc 'gorące miejsca' mutacji, zwiększające tempo ewolucji [1-4]. Ilustracją takiego zjawiska jest ogromna zmienność występująca w obrębie sekwencji kodujących toksyczne peptydy (konotoksyny) u

Contents:

- I. Introduction
- II. Genome rearrangements during macronuclear development in Ciliates
 - II-1. Occurrence of internal eliminated sequences (IES)
 - II-2. Evolutionary origin of IES — resemblance to transposons
 - II-3. Gene scrambling
- III. Examples of genome rearrangement in other organisms
 - III-1. Single-gene circular DNA in dinoflagellate chloroplasts
 - III-2. Mutational hot spots in the genom of predatory snails

ślímaka *Conus*. Tempo ewolucji zmiennego, C-końcowego regionu konotoksyn jest pięciokrotnie wyższe niż w przypadku najszybciej mutującego białka ssaczego (interferonu) [5].

Do najlepiej zbadanych przykładów rearanżacji genomu należą niezwykle zmiany zachodzące w jądrze orzęsków (*Ciliata*) — jednokomórkowych organizmów eukariotycznych, gdzie w sposób zaprogramowany usuwana jest duża ilość DNA i następuje tasowanie genów. Procesy te zachodzą w ściśle określonych miejscach — akumulujących mutacje z wysoką częstością — wywodzących się od transpozonów [6]. Transpozony, odkryte u kręgowców dopiero 5 lat temu, zdaniem wielu badaczy odegrały istotną rolę w ewolucji i organizacji genomu [7-9].

II. Rearanżacje genomu orzęsków podczas formowania się jądra wegetatywnego

Orzęski (*Ciliata*) są organizmami bardzo starymi ewolucyjnie i wyodrębniły się, z innymi *Alveolata* (*Dinoflagellata* i *Apicomplexa*), przed bilionem lat, niemal jednocześnie ze zwierzętami, grzybami oraz roślinami [10, 11]. Dzięki temu stanowią unikalny materiał do interdyscyplinarnych badań biologicznych.

Jedną z charakterystycznych cech tych organizmów jest budowa aparatu jądrowego. Badania gene-

¹Mgr, ²Doc. dr hab., Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biologii Komórki, 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3, tel. 659 85 71 wew. 357, fax 822 53 42, e-mail: wyroba@nencki.gov.pl

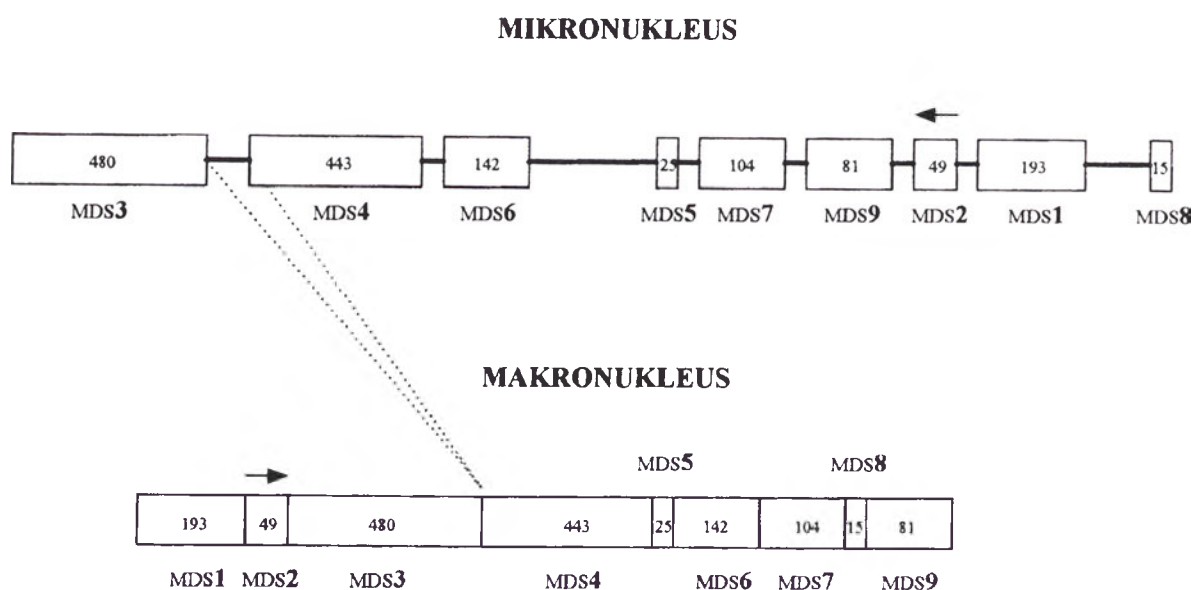
tyczne orzęsków wykazały, że oprócz dużego poliploidalnego jądra wegetatywnego (makronukleusa) zawierającego liczne kopie (do 1000) wszystkich genów, posiadają one jedno (lub więcej) jądro generatywne (mikronukleus), które jest diploidalne i transkrypcyjnie nieaktywne [12, 13]. Tak więc za ekspresję wszystkich genów komórki odpowiedzialny jest makronukleus. Podczas koniugacji, fazy płciowej cyklu życiowego orzęsków, następuje wymiana haploidalnych jąder, w wyniku której powstaje diploidalna zygota. Stary makronukleus ulega rozpadowi, a nowy tworzony jest z kopii jądra zygotycznego [14].

W czasie ewolucji geny mikronukleusa orzęsków uległy dwóm nadzwyczajnym modyfikacjom.

więc dramatycznym przemianom podczas rozmnażania płciowego, kiedy mikronukleusy od dwóch partnerów łączą się i dają początek nowemu mikronukleusowi i makronukleusowi. W nowo tworzonym makronukleusie DNA pomiędzy regionami kodującymi genów jest usuwany, a regiony kodujące muszą zostać ułożone we właściwej kolejności (Ryc. 1) [16].

II-1. Występowanie sekwencji usuwanych

IES zidentyfikowano w komórkach dwóch grup orzęsków: u *Hypotricha* (*Oxytricha*, *Stylonychia* i *Euplotes*) i *Holotricha* (*Tetrahymena* i *Paramecium*) [17]. Odcinki te są definiowane jako unikatowe se-



Ryc. 1. Zmiany w genie aktywny I u *Oxytricha nova* podczas rozwoju makronukleusa. IES (czarna linia) ulegają wycięciu, a MDS łączone są we właściwej kolejności. Liczby oznaczają długość MDS w nukleotydach, czarne strzałki — kierunek sekwencji. Wg [16, 19], zmodyfikowane.

Pierwsza to pojawienie się krótkich nie kodujących odcinków pomiędzy DNA linii generatywnej. Odcinki te nazywane są sekwencjami usuwanymi (IES — *internal eliminated segments*), ponieważ są one wycinane z genów mikronukleusa, kiedy po koniugacji rozwija się z niego makronukleus. U *Tetrahymena* cały proces koniugacji trwa około 20 godzin, a delecja ~6000 fragmentów DNA (IES) rozpoczyna się w połowie tego procesu i trwa około 2 godzin [13, 15].

Druga zmiana dotyczy fragmentów genów oddzielonych przez sekwencje usuwane, tzw. segmentów przeznaczonych do makronukleusa (MDS — *macronuclear-destined segments*). U niektórych orzęsków *Hypotricha* te kodujące odcinki uległy potasowaniu w pewnych genach. Geny mikronukleusa, normalnie nieaktywne, ulegają

kwencje wzbogacone w AT (>70%), które są oflan-
kowane w sąsiadujących segmentach (MDS) przez
pary powtarzających się (2-19) nukleotydów
5'-TA-3'. Te powtórzenia odgrywają rolę w łączeniu
końców MDS utworzonych w procesie wycinania
IES.

U *Paramecium* sekwencje usuwane występują za-
równo w kodującym, jak i nie kodującym DNA, a ich
liczba jest szacowana na ~65000 w haploidalnym ge-
nomie (Tab. 1) [6, 12, 13, 18, 19]. Wielkość fragmen-
tów usuwanych waha się od 28 do 882 par zasad, a
wiele z nich zawiera odwrócone powtórzenia w
pierwszych i ostatnich 8 nukleotydach, tworzone
przez sekwencję zgodną TAYAGYNR.

Zidentyfikowane do dziś IES u *Tetrahymena* są
generalnie dłuższe (od 600 do kilku tysięcy nukle-
otydów) niż te u *Paramecium* i znaleziono je (około

6000) tylko w nie kodującym DNA mikronukleusa (Tab. 1) [20]. Tak jak u *Paramecium*, są one oflankowane przez sekwencje repetytywne 5'-TA-3', ale nie mają motywu TAYAGYNR. Na końcach IES u *Oxytricha/Stylonychia* pojawiają się — w przeciwieństwie do powtórzeń 5'-TA-3' *Paramecium*, *Tetrahymena* i *Euplotes crassus* — dowolne sekwencje o długości 2-19 nukleotydów (Tab. 1) [18].

Tabela 1.

Zestawienie cech IES i MDS u *Holotricha* i *Hypotricha* *(Y = C lub T; R = G lub A; S = C lub G). Dane zaczerpnięto z [6, 13, 18, 19].

Gatunek	<i>Holotricha</i>		<i>Hypotricha</i>
	<i>Paramecium</i>	<i>Tetrahymena</i>	
Występowanie IES	DNA kodujący i niekodujący	DNA niekodujący	DNA kodujący i niekodujący
Liczba IES/In	~65000	6000	50000-200000
Długość IES (nukleotydy)	28-882	600->2000	7-598
Powtórzenia TA w sekwencji flankującej IES	+	+	tylko u <i>Euplotes crassus</i>
Seqwencje o wysokiej zgodności w IES	TAYAGYNR*	Nie wykryto	TTCTT (?)
Potasowanie kolejności MDS	Nie wykryto	Nie wykryto	W niektórych genach

Porównanie struktury genów mikronukleusa komórek rodzaju *Hypotricha* może pozwolić na prześledzenie zmian, jakim ulegały sekwencje usuwane w czasie ewolucji. IES trzech różnych gatunków tej rodziny różnią się nie tylko co do liczby, ale także wielkości, sekwencji i pozycji odcinków flankujących (Tab. 1). Zmiana długości IES następuje na skutek insercji lub delecji nukleotydów [21]. Przesuwanie się IES wzdłuż cząsteczki DNA jest najprawdopodobniej wynikiem mutacji na styku MDS/IES [17].

Analiza genów mikronukleusa *Hypotricha* wykazała, że IES są strukturami dynamicznymi ewolucyjnie, akumulującymi z wysoką częstością mutacje dotyczące zarówno sekwencji jak i długości odcinka mutowanego [18]. Zmiany te mogą umożliwić tworzenie nowych genów, a tym samym adaptację orzęsków do zmian w środowisku [22].

II-2. Ewolucyjne pochodzenie IES — podobieństwo do transpozonów

Występowanie sekwencji usuwanych jest prawdopodobnie zjawiskiem starym ewolucyjnie, ponieważ odkryto je zarówno u *Hypotricha*, jak i *Holotricha*.

Kilka cech IES sugeruje, że mogą one pochodzić od transpozonów. Transpozony są ruchomymi odcinkami DNA, zdolnymi do przemieszczeń w obrębie tego samego chromosomu lub pomiędzy

chromosomami i mogącymi wywoływać duże zmiany w strukturze genomów, na przykład inwersje, delecje, duplikacje dużych fragmentów DNA [23]. Barbara McClintock jako pierwsza wykazała istnienie transpozonów [24], opierając się na badaniach zmiany barwy ziaren kukurydzy. Zauważyła, że barwy te mogą się nagle zmieniać z jednego pokolenia na drugie i wyjaśniła

mechanizm tego zjawiska przemieszczaniem się pewnych odcinków chromosomowych. Badania ostatnich lat potwierdziły tę koncepcję, a elementy transpozycyjne znaleziono zarówno u *Prokaryota* jak i *Eukaryota* [25].

Seqwencja o wysokiej zgodności (TAYAGYNR) na końcach tych fragmentów DNA, które są usuwane u *Paramecium*, jest podobna do końców transpozonów Tec *Euplotes crassus* i transpozonów z rodziny Tc1 (Ryc. 2) [26]. Transpozony Tc1/mariner należą do nadrodziny transpozonów eukariotycznych, które przenoszą się pomiędzy gatunkami i zostały zidentyfikowane u wielu organizmów, od pierwotniaków do kręgowców [7, 27, 28]. Filogenetyczne rozprzestrzenienie i sposób przemieszczania się transpozonów sugerują, że mogą one być mało zależne od czynników specyficznych dla gospodarza, ponieważ dysponują możliwością ekspresji aktywnej transpozazy. Wykryto przenoszenie się transpozonów typu Tc1/mariner z muszek owocowych jednego gatunku do innego oraz z nicieni do ryby i z ryby do komórek ludzkich. Ostatnio wykazano też, że elementy te mogą bezpośrednio „przeskoczyć” z nicienia *Caenorhabditis elegans* do komórek ludzkich. Ta cecha transpozonów ‘mariner’ stwarza — według odkrywców tego zjawiska — możliwości zastosowania ich jako nośników w terapii genowej człowieka [8, 29].

Elementy przypominające transpozony zidentyfikowano w DNA mikronukleusa *Tetrahymeny*, cho-

ciąż nie wykryto w tych komórkach sekwencji o wysokiej zgodności w IES [18].

U *E. crassus*, zarówno transpozony, jak i sekwencje usuwane oflankowane są (Ryc. 2) przez powtór-

<i>Paramecium</i> — sekwencja w IES	5'-TAYAG\NR...-3'
<i>Euplotes crassus</i> Tec 1 i Tec 2	5'-TATAGAGG...-3'
Transpozony Tc1/mariner	5'-TACAGTKS...-3'

Ryc. 2. Podobieństwo końców IES u *Paramecium* do transpozonów. Porównano sekwencję o wysokiej zgodności flankującą koniec IES u *Paramecium* z sekwencjami na końcach transpozonów Tec 1 i Tec 2 u *E. crassus* i transpozonów Tc1/mariner. Identyczne nukleotydy zaznaczono pogrubioną czcionką, podobne — szarą (Y = C lub T; R = G lub A; K = G lub T; S = C lub G). Wg [26], zmodyfikowane.

zenia TA [26]. Cecha ta nie rozstrzyga pochodzenia ewolucyjnego IES: przypuszcza się, że mogą być one zdegenerowanymi pochodnymi transpozonów, jak i że ich ewolucja była niezależna od transpozonów. W tym drugim przypadku sugeruje się podobny mechanizm wycinania obu elementów i zaangażowanie tej samej maszyny molekularnej [18, 26]. Zwolennicy pierwszej hipotezy podkreślają, że dotyczy ona głównie krótkich IES u *Hypotricta* — zatraciły one znaczną część sekwencji w porównaniu z „antycznymi” transpozonomi, od których pochodzą — zachowując jednak te jej elementy (cis) umożliwiające precyzyjne ich wycięcie z rozwijającego się makronukleusa [6].

Niektórzy badacze wyróżniają długie IES (> 4 000 nukleotydów) i krótkie (15-500 nukleotydów) [6]. Długie IES zalicza się do rodzin transpozonów. Tego rodzaju IES u *Hypotricta* zawierają sekwencje homologiczne do sekwencji genów transpozazy: TBE1 w 1800 kopiach u *Oxytricha* oraz Tec 1 i Tec 2 — każda w 10^3 - 10^4 kopii u *Euplotes* [26, 30]. Jednakże mechanizmy wycinania Tec i TBE są odmienne. TBE 1, Tec 1 i Tec 2 kodują białka z rodziny transpozaz IS630-TC 1. Docelowym miejscem transpozycji jest dwunukleotyd TA. Porównanie sekwencji tych transpozaz (włącznie z elementami mariner) wykazało wysoce konserwatywne reszty aminokwasowe w odcinku C-końcowym: dwupeptyd Asp-Glu oraz region, w którym te dwa aminokwasy rozdzielone są 34-35 resztami aminokwasowymi (tzw. motyw D35E). Ten motyw jest prawdopodobnie homologiczny z prokariotyczną transpozazą oraz integrasami retrotranspozonów retrowirusowych [30].

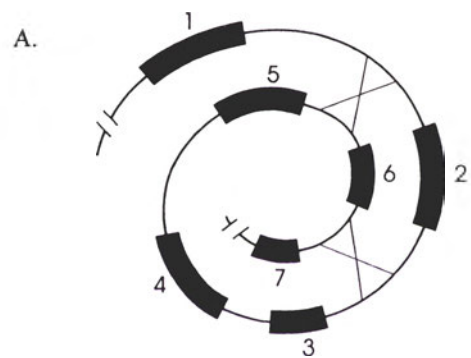
Tak więc u *Oxytricha* występują zarówno relikty starego transpozonu w postaci trzech krótkich IES

(~33 i 70 nukleotydów), jak i transpozon TBE 1 — prawdopodobnie efekt niedawnej — ewolucyjnie — transpozycji. Te IES oraz TBE 1 są precyzyjnie wycinane z DNA rozwijającego się makronukleusa [6].

II-3. Tasowanie genów

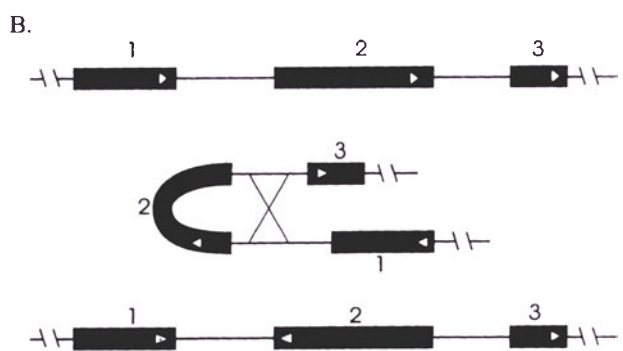
Sekwencje usuwane dzielą kodujące i niekodujące odcinki genu na fragmenty nazwane MDS. Niektóre MDS w mikronukleusach *Oxytricha nova* i *Oxytricha trifallax* zostały potasowane w czasie ewolucji.

Podczas rozwoju mikronukleusa tasowanie MDS zależy przypuszczalnie od obecności IES, które mogą służyć jako miejsca rekombinacji. Proces ten wpływa zarówno na zmianę kolejności (Ryc. 3a), jak i orientacji MDS (Ryc. 3b) i prawdopodobnie zachodzi zgodnie z hipotezą przedstawioną schematycznie



Kolejność MDS po rekombinacji

- 1 - 6 - 3 - 4 - 5 - 2 - 7 -



Ryc. 3. Tasowanie MDS w genie mikronukleusa.

A) Hipotetyczna konfiguracja cząsteczki DNA w mikronukleusie umożliwiająca równoległe ułożenie IES. Rekombinacja pomiędzy IES (miejsca rekombinacji zaznaczono 'X') zmienia kolejność MDS. B) Rekombinacja pomiędzy IES w położeniu antyrównoległym powoduje inwersję MDS2. MDS oznaczono cyframi. Białe strzałki pokazują orientację ich sekwencji. IES oznaczono liniami. Wg [18], zmodyfikowane.

na rycinie 3. Hipoteza ta zakłada, że cząsteczka DNA zawija się dośrodkowo, co ustawia dwa IES w położeniu równoległym. Proces rekombinacji pomiędzy tak ułożonymi IES prowadzi do przemieszania kolejności sąsiednich MDS. Podobny mechanizm postulowany jest do wyjaśnienia rekombinacyjnego przywracania właściwej kolejności MDS podczas rozwoju makronukleusa.

Potasowanie MDS zaobserwowano w trzech z ośmiu dotychczas scharakteryzowanych genów mikronukleusa *Oxytricha nova* [18]. IES pomiędzy niepotasowanymi MDS są dłuższe od IES oddzielających MDS potasowane i występują rzadziej na jednostkę długości DNA. Może to świadczyć o istnieniu różnic w nie znanym jeszcze mechanizmie tworzenia IES pomiędzy potasowanymi i niepotasowanymi MDS [19].

U *Oxytricha* każdy gen jest oflankowany na końcach przyległych do MDS przez parę powtarzalnych unikalnych sekwencji. W niepotasowanych MDS *Oxytricha* sekwencje powtórzeniowe są przeciętnie 4-nukleotydy, natomiast w potasowanych 10-nukleotydy. Sekwencje te mogą więc umożliwić przywrócenie właściwej kolejności MDS i wycinanie IES przez homologiczną rekombinację pomiędzy powtórzeniami w parze przy ich końcach lub odpowiednio zwinięcie cząsteczki DNA w specyficzną konfigurację [19].

Molekularny mechanizm insercji IES do genów mikronukleusa może polegać na wprowadzeniu cięcia do DNA z utworzeniem lepkich końców, a następnie przyłączeniu krótkich sekwencji przerywającego DNA (bogatego w AT) do jednoniciowych 'nawisów' w cięciach. Uzupelnienie przerw pozostawionych po fuzji mogłoby tworzyć dwunukleotydy sekwencje powtórzeniowe w nowo utworzonych MDS, na końcach IES. Te dwunukleotydy 5'-TA-3', będące częścią dłuższej odwróconej sekwencji o 8 parach zasad, odgrywają istotną rolę w wycinaniu IES [19]. Mutacje punktowe w tym ściśle konserwowanym regionie: A→G [31] lub C→T [32] uniemożliwiają wycięcie IES. Stwierdzono to np. w przypadku genu kodującego antygen immobilizacyjny 51A *Paramecium*, w którym IES o długości 370 par zasad (IES2591) nie podlegał wycięciu. Okazało się, że w jego obrębie znajduje się znacznie mniejszy IES — o długości zaledwie 28 par zasad — co sugeruje możliwość wielokrotnie powtarzającej się integracji takich elementów do genomu. Autorzy pracy [32] uważają, że jest to dodatkowy dowód potwierdzający koncepcję pochodzenia IES z transpozonów.

W trakcie zaprogramowanej rearanzacji genomu zachodzącej podczas rozwoju makronukleusa elimi-

nowane są olbrzymie ilości DNA: u *Tetrahymena* jest to 15% genomu mikronukleusa [13]. U *Oxytricha* usuwanych jest około 10^5 IES, co związane jest z procesem rekombinacji zachodzącym tyleż razy [6, 12].

DNA wycinany jest w postaci liniowych cząsteczek u *Tetrahymena* lub kolistych, jak u *Euplotes crassus* i *Oxytricha trifallax* [12]. U wyższych *Eukaryota* kolisty DNA występuje w postaci odcinków pozachromosomowych (np. w oocytach *Xenopus*) [33] oraz w organellach komórkowych — mitochondriach i chloroplastach.

III. Przykłady rearanzacji genomu u innych organizmów

III-1. Jednogenowy kolisty DNA w chloroplastach *Dinoflagellata*

Szczególnie interesujące wydaje się niedawne odkrycie budowy genomu chloroplastów *Dinoflagellata*, zaliczanych do typu *Pyrrophyta* (tobołki). *Dinoflagellata* występują w planktonie głównie wód słonych; jako organizmy autotroficzne mają duże znaczenie w biocenozie zbiorników wodnych, biorąc udział w produkcji biomasy. Niektóre tobołki zawierają substancje toksyczne (alkaloidy) i podczas masowego występowania mogą być przyczyną zatrucia ryb [34, 35].

DNA w jądrze komórkowym tobołków ma nietypowy skład zasad, nie zawiera histonów i jest stale skondensowany, jak gdyby był nieustannie przygotowany do podziału. Odmienna jest również architektura genomu chloroplastów tych organizmów. U *Eukaryota* chloroplasty stanowią 'maszynę' niezbędną do przeprowadzania fotosyntezy. Pochodzą od endosymbiotycznych cyjanobakterii i posiadają wiele cech swych prokaryotycznych przodków. Ich genom jest mniejszy niż u cyjanobakterii, ale również jest kolisty i ma jedno miejsce inicjacji replikacji, geny natomiast pogrupowane są w operony [36].

Badając gatunek *Heterocapsa triquetra* Zhang [34] odkrył, że genom chloroplastów tobołków ma unikatową architekturę odbiegającą od powyższego schematu. Jest on podzielony na wiele kolistych odcinków, z których każdy zawiera jeden gen kodujący białko lub rybosomalne RNA. Nie jest jasne w jaki sposób tobołki wykształciły te jednogenowe fragmenty z wielogenowego kolistego DNA. Taka organizacja genomu chloroplastów *Dinoflagellata* umożliwia badanie funkcji i ko-

ewolucji wielu miejsc inicjacji replikacji w pojedynczym genomie.

Budowa genomu chloroplastu tobołków różni się zasadniczo od innych genomów plastydowych, włączając szczątkowy, niefotosyntetyzujący plastyd u *Apicoplexa* np. u pasożyta *Plasmodium falciparum* wywołującego malarię. Analizując sekwencje jądrowego rRNA wywnioskowano, że *Dinoflagellata* i *Apicomplexa* są pokrewnymi grupami [37, 38]; we współczesnej systematyce włącza się je do grupy *Alveolata* [38]. Jeżeli ich plastydy wyewoluowały od wspólnego przodka, jest wysoce prawdopodobne, że mają taki sam mechanizm wewnątrzkomórkowego transportu i sortowania białek, ale różny system enzymatyczny [39]. Budowa chloroplastów omawianych organizmów nie jest zagadnieniem czysto akademickim. Plastydy mogłyby stanowić idealny cel działania leków przeciw malarii, toksoplazmozie i innym chorobom ludzi i zwierząt wywołanym przez pasożytnicze pierwotniaki [34, 40].

III-2. „Gorące miejsca” mutacji w genomie drapieżnych ślimaków

Badania wielu organizmów wykazały, że częstość mutacji nie jest jednakowa w całym genomie. Drapieżny ślimak z rodzaju *Conus* żyjący w tropikalnych rafach koralowych jest dobrym przykładem takiego zjawiska [41]. Każdy z około 500 gatunków tych ślimaków wytwarza odrębny zestaw (od 50 do 200) toksycznych peptydów służących do paraliżowania ofiar. Peptydy te składają się z 10-30 aminokwasów o dużej ilości mostków dwusiarczkowych [42]. Poszczególne toksyny łączą się selektywnie ze specyficznymi izoformami kanałów jonowych bramkowanych przez ligandy (np. cholinergiczny receptor nikotynowy) lub przez napięcie (np. kanały sodowy i wapniowy) oraz z receptorami związanymi z białkami G [41, 42]. Analizując propeptydy — prekursorzy konotoksyn — odkryto, że N-końcowy odcinek obejmujący sekwencję sygnałową był niemal identyczny u kilku badanych gatunków *Conus* w przeciwieństwie do regionu C-końcowego, który podlegał znacznym zmianom [43], co niektórym badaczom nasuwa analogię do struktury przeciwciał [42]. Ten niezwykle zmienny obszar jest bogaty w silnie konserwowane reszty cysteinowe. W przypadku konotoksyn δ i ω występuje 'szkielet' -C-C-CC-C-C-, w którym pomiędzy poszczególnymi cysteinami występuje od 1 do 7 innych aminokwasów [42, 43]. Mutacje w C-końcowym odcinku polegają na zamianie pojedynczych zasad pomiędzy cysteinami,

co umożliwiła tworzenie niezliczonej ilości nowych toksyn.

Dodatkowym sposobem wytwarzania tak wielu rodzajów toksyn są modyfikacje posttranslacyjne peptydów włącznie z rzadką reakcją bromowania tryptofanu — charakterystyczną dla organizmów słonowodnych — obserwowaną w 8-aminokwasowym peptydzie wyizolowanym z *Conus radiatus* [43, 44].

Porównując sekwencje niektórych neurotoksyn wytwarzanych przez *Conus abbreviatus* i *Conus lividus* oszacowano, że tempo ewolucji tych peptydów jest pięciokrotnie wyższe niż w przypadku najszybciej mutującego białka ssaczego (interferonu) i trzykrotnie wyższe niż u *Drosophila* [5].

Różnorodność konotoksyn związana jest z ciągłym procesem duplikacji genów, mutacjami i selekcją różnicującą. Ten szybki sposób generowania rozmaitych trujących peptydów może być strategią ułatwiającą adaptację gatunku do zmian środowiskowych, jakkolwiek jego pochodzenie ewolucyjne jest nieznane [5, 45].

Zaproponowano kilka przyczyn istnienia takich 'gorących miejsc mutacji'. Jednym z nich może być różna skuteczność naprawy błędów wkradających się do genomu. W badaniach *in vitro* wykazano, że częstość pomyłek popełnianych podczas replikacji może się wahać, zależnie od charakteru sekwencji, które wymagają naprawy [3]. Co więcej, podczas kopiowania DNA w pewnych sekwencjach częściej są popełniane błędy, niż w innych. W szczególności sekwencje nukleotydowe zbudowane z powtórzonych kilka razy dwóch lub trzech par zasad mogą być trudne do dokładnego zreplikowania [46, 47].

Odkryto mutacje, w których znacznie wzrasta liczba powtarzających się tripletów w istotnych genach i które są przyczyną szeregu chorób dziedzicznych takich jak choroba Huntingtona, dystrofia mięśniowa i ataksja rdzeniowo-mózdkowa [48].

W przeszłości przypuszczano, że genomy ewoluują w kierunku zmniejszenia częstości mutacji i wytworzenia mechanizmów chroniących przed przypadkową zmianą genetyczną. Obecnie sugeruje się, że najbardziej przystosowanymi genomami są te, które rozwinęły zdolność do szybkich zmian [3, 8, 45].

Artykuł otrzymano 8 lipca 1999 r.

Zaakceptowano do druku 6 grudnia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Umar A, Kunkel TA (1996) *Eur J Biochem* 238: 297-307

2. Otto SP, Hastings IM (1998) *Genetica* **102-103**: 507-524
3. Pennisi E (1998) *Science* **281**: 1131-1134
4. Sarasin A, Bounacer A, Lepage F, Schlumberger M., Suarez HG (1999) *C R Acad Sci III* **322**: 143-149
5. Duda TF, Palumbi SR (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6820-6823
6. Seegmiller A, Williams KR, Hammersmith RL, Doak TG, Witherspoon D, Messick T, Storjohann LL, Herrick G (1996) *Mol Biol Evol* **13**: 1351-1362
7. Radice AD, Bugaj B, Fitch DHA, Emmons SW (1994) *Mol Gen Genet* **244**: 606-612
8. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z (1997) *Cell* **91**: 501-510
9. Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG (1998) *Nature* **394**: 744-751
10. Cavalier-Smith T (1993) *Microbiol Rev* **57**: 953-994
11. Sogin ML, Silberman JD (1998) *Int J Parasitol* **28**: 11-20
12. Klobuchter LA, Herrick G (1997) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **56**: 1-62
13. Saveliev SV, Cox MM (1996) *EMBO J* **15**: 2858-2869
14. Orias E (1986) W:Gall JG (red) *The Molecular Biology of Ciliated Protozoa*, Academic Press, Orlando, FL, 45-84
15. Martindale DW, Allis CD, Bruns PJ (1982) *Exp Cell Res* **140**: 227 - 236
16. Greslin AF, Loukin SH, Oka Y, Prescott DM (1988) *DNA* **7**: 529-536
17. Prescott DM (1999) *Nucl Acids Res* **25**: 1243-1250
18. Prescott DM (1997) *Curr Opin Genet Dev* **7**: 807-813
19. Prescott MD, DuBois ML (1996) *J Euk Microbiol* **43**: 432-441
20. Yao M-C (1996) *Trends Genet* **12**: 26-30
21. Prescott JD, DuBois ML, Prescott DM (1998) *Chromosoma* **107**: 293-303
22. Klobuchter LA, Prescott DM (1986) W:Gall JG (red) *The Molecular Biology of Ciliated Protozoa*, Academic Press, Orlando, FL, 111-154
23. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM (1987) *Molecular Biology of the Gene*, the Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, CA
24. McClintock B (1950) *Proc Natl Acad Sci USA* **36**: 344-355
25. Finnegan DJ (1989) *Trends Genet* **5**: 103-107
26. Klobuchter LA, Herrick G (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 2006-2013
27. Verrinder Gibbins AM (1998) *Nature Biotechnology* **16**: 1013-1014
28. Rubin EJ, Akerley BJ, Novik VN, Lampe DJ, Husson RN, Mekalanos JJ (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1645-1650
29. Schouten GJ, van Luenen HG, Verra NC, Valerio D, Plasterk RH (1998) *Nucl Acids Res* **26**: 3013-3017
30. Doak TG, Doerder FP, Jahn CL, Herrick G (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 942-946
31. Mayer KM, Forney JD (1999) *Genetics* **151**: 597-604
32. Mayer KM, Mikami K, Forney JD (1998) *Genetics* **148**: 139-149
33. Cohen S, Menut S, Mechali M (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 6682-6689
34. Zhang Z, Green BR, Cavalier-Smith T (1999) *Nature* **400**: 155-159
35. Burkholder JM (1999) *Świat Nauki* **10**: 56-63
36. McFadden G (1999) *Nature* **400**: 119-120
37. Gajadhar AA, Marquardt WC, Hall R, Gunderson J, Aritzia-Carmona EV, Sogin ML (1991) *Mol Biochem Parasitol* **45**: 147-154
38. Cavalier-Smith T (1993) *Microbiol Rev* **57**: 953-994
39. Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Berra GS, Roos DS., McFadden GI (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12352-12357
40. McFadden GI, Waller RF (1997) *Bioessays* **19**: 1033-1040
41. Olivera BM, Rivier J, Clark C, Ramilo CA, Corpuz GP, Abogadie FC, Mena EE, Woodward SR, Hillyard DR, Cruz LJ (1990) *Science* **249**: 257-263
42. Woodward SR, Cruz LJ, Olivera BM, Hillyard DR (1990) *EMBO J* **9**: 1015-1020
43. Olivera BM (1997) *Mol Biol Cell* **8**: 2101-2109
44. Jimenez EC, Craig AG, Watkins M, Hillyard DR, Gray WR, Gulyas J, River JE, Cruz LJ, Olivera BM (1997) *Biochemistry* **36**: 989-994
45. Caporale LH (1998) *Nature Biotechnol* **16**: 908-909
46. Fuji S, Akiyama M, Aoki K, Sugaya Y, Higuchi K, Hiraoka M, Miki Y, Saitoh N, Yoshiyama K, Ihara K, Seki M, Ohtsubo E, Maki H (1999) *J Mol Biol* **289**: 835-850
47. Kroutil LC, Kunkel TA (1999) *Nucl Acids Res* **27**: 3481-3486
48. Warter JM, Tranchant C (1998) *Presse Med* **27**: 376-381.

Regulacja ekspresji genów szoku termicznego *hsp70i*

Regulation of expression of the heat shock genes *hsp70i*

ZDZISŁAW KRAWCZYK¹, KATARZYNA LISOWSKA²

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Kinetyka ekspresji genów *hsp70i*. Autoregulacja
- III. Czynniki transkrypcyjne HSF
 - III-1. Właściwości czynnika HSF1
 - III-2. Struktura czynnika HSF1
 - III-3. Mechanizm aktywacji czynnika HSF1
- IV. Struktura HSE; oddziaływanie HSF1 z HSE
 - IV-1. Czynniki wpływające na powstanie funkcjonalnego kompleksu HSF-HSE
- V. Właściwości czynnika HSF2
- VI. Inne czynniki HSF wyższych eukariontów
- VII. Regulacja ekspresji genów *hsp70i* w temperaturze fizjologicznej
- VIII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Kinetics of induction of the *hsp70i* genes. Autoregulation
- III. HSF transcription factors
 - III-1. Properties of the HSF1 factor
 - III-2. Molecular structure of the HSF1 factor
 - III-3. Mechanism of activation of the HSF1 factor
- IV. Structure of HSE; interaction between HSF1 and HSE
 - IV-1. Factors affecting formation of the functional HSF-HSE complex
- V. Properties of the HSF2 factor
- VI. Other HSF factors of higher eukariotes
- VII. Regulation of the *hsp70i* genes expression at physiological temperature
- VIII. Concluding remarks

Spis skrótów: AD — ang. *activation domain*, domena aktywująca czynnika transkrypcyjnego HSF; C-koniec — koniec karboksylowy białka; DBD — ang. *DNA binding domain*, domena czynnika transkrypcyjnego oddziałująca z DNA; DnaK — odpowiednik eukariotycznego białka HSP70 u *E.coli*; HR — ang. *hydrophobic repeat*, powtórzony kilkakrotnie motyw aminokwasowy zawierający reszty hydrofobowe w określonych pozycjach; HSC/*hsc* — ang. *heat shock cognate proteins (genes)*, tzw. białka/geny pokrewne HSP/*hsp*; HSE — ang. *heat shock element*, sekwencja regulacyjna typowa dla promotorów genów *hsp*; HSF — ang. *heat shock factor*, czynnik transkrypcyjny oddziałujący z HSE; HSP/*hsp* — ang. *heat shock proteins (genes)*, białka/geny szoku termicznego (stresu komórkowego); LZ — ang. *leucine zipper*, struktura białkowa określana jako zamek lecynowy; MAR — ang. *matrix associated region*, region DNA pełniący funkcję przyczepu do białek macierzy jądrowej; N-koniec — koniec aminowy białka; NLS — ang. *nuclear localization signal*, sekwencja aminokwasowa warunkująca transport białka do jądra komórkowego.

I. Wstęp

Geny szoku termicznego zaliczane są do grupy genów stresu komórkowego (ang. *heat shock family of stress proteins*) [1, 2]. Ekspresję tych genów, w skrót-

cie nazywanych genami *hsp* (ang. *heat shock protein*) indukuje ekspozycja komórek na liczne egzogenne i endogenne czynniki (nazywane stresorami, ang. *molecular stressor* lub *cellular stressor*), które powodują powstawanie nieprawidłowych białek (np. w wyniku denaturacji lub nieprawidłowych modyfikacji polipeptydów) [3]. Sygnałem informującym komórkę o konieczności pobudzenia ekspresji genów *hsp* mogą być prawdopodobnie także zmiany właściwości błony plazmatycznej [4]. Poznanym jako pierwszy i jednocześnie jednym z najsilniejszych induktorów genów *hsp* jest szok termiczny wywołany przez wzrost temperatury środowiska komórki o kilka do kilkunastu stopni powyżej temperatury fizjologicznej [5]. Stopień ekspresji genów *hsp* może się zmieniać także w czasie prawidłowych procesów fizjologicznych oraz w stanach patologicznych. Mechanizm aktywacji transkrypcji genów *hsp* pod wpływem tych bodźców nie jest jeszcze dobrze poznany (Rozdział VII).

Elementem integrującym różne drogi aktywacji genów *hsp* i jednocześnie ostatnim lub jednym z końcowych etapów indukcji transkrypcji tych genów jest aktywacja swoistego czynnika transkrypcji HSF (ang. *heat shock factor*, Rozdział III), który następnie oddziałuje ze swoistą sekwencją regulatorową HSE (ang. *heat shock element*, Rozdział IV) występującą w promotorach genów *hsp* [6].

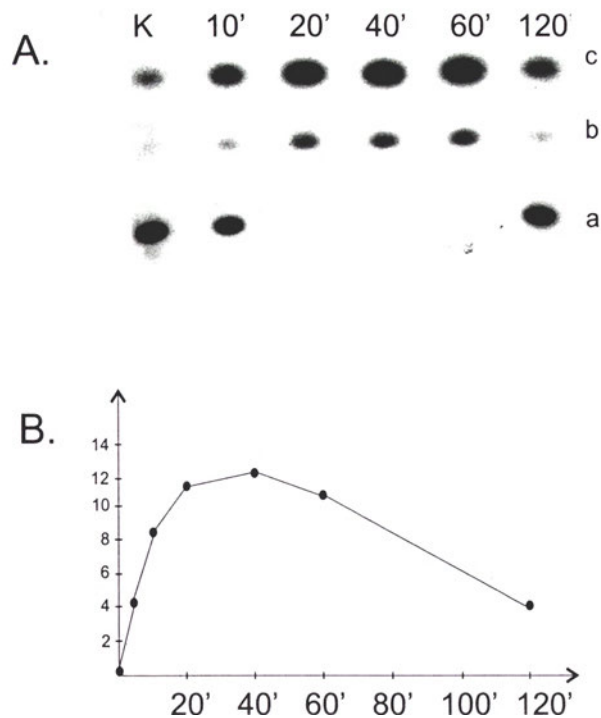
¹Prof. dr hab., ²Dr, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Zakład Biologii Nowotworów, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: krawczyk@onkol.instonko.gliwice.pl

Geny szoku termicznego stanowią grupę bardzo liczącą i heterogenną, w której wyodrębnia się pięć głównych wielogenowych rodzin nazywanych: *hsp100*, *hsp90*, *hsp70*, *hsp60* i *hsp25/27* [1, 2]. Niektóre rodziny, np. *hsp70* czy *hsp90* zawierają oprócz genów indukowalnych termicznie także geny nazywane pokrewnymi (ang. *heat shock cognate genes*), których aktywność nie zmienia się pod wpływem szoku termicznego (patrz [7]). Jednym z takich białek o właściwościach zbliżonych do białka HSP70, o którym będzie dalej mowa w kontekście regulacji ekspresji genów *hsp* jest cytoplazmatyczne białko HSC70 [7]. Większość, a być może wszystkie białka HSP funkcjonują jako tak zwane białka opiekuńcze (ang. *molecular chaperons*) kontrolujące zmiany konformacji białek komórkowych i będące ważnym, konserwowanym ewolucyjnie mechanizmem komórkowej homeostazy i cytoprotekcji [8, 9].

Śród genów szoku termicznego jedynie geny *hsp70i* (ang. *inducible*) nie są transkrybowane w komórkach prawidłowych lub wykazują tylko nieznaczny poziom konstytutywnej ekspresji (ang. *basal activity*) w temperaturze fizjologicznej i w nieobecności stresorów. Z tego względu geny te są najczęściej wykorzystywanym modelem do badania aktywności transkrypcji indukowanej oddziaływaniem elementów regulacyjnych HSF-HSE. Niniejsza praca poświęcona jest omówieniu mechanizmu regulacji ekspresji genów *hsp70* ssaków. Ze względu na znaczne międzygatunkowe podobieństwo zarówno struktury genów *hsp70* jak i mechanizmu ich ekspresji w wielu miejscach wspomniane będą także właściwości układu transkrypcji genów *hsp* innych gatunków.

II. Kinetyka ekspresji genów *hsp70i*. Autoregulacja

Aktywacja genów *hsp* w odpowiedzi na działanie stresorów jest reakcją przejściową i odwracalną, regulowaną na poziomie transkrypcji i translacji [10]. Proces indukowanej termicznie ekspresji genów *hsp70i* obejmuje trzy fazy (Ryc. 1): aktywację transkrypcji, akumulację mRNA i białka oraz hamowanie transkrypcji genu (faza atenuacji). Faza atenuacji kończy się z chwilą ustania transkrypcji genów *hsp70* (lub powrotu do konstytutywnego poziomu ekspresji). W komórkach poddanych przedłużonej ekspozycji na szok termiczny faza ta trwa dłużej niż w komórkach, z których środowiska usunięto czynnik stresujący [11-13, przegląd w 10]. Stopień indukcji genów *hsp70i* i czas trwania fazy atenuacji zależą



Ryc. 1. Przykłady kinetyki ekspresji genów *hsp70i* pod wpływem szoku termicznego. A. Komórki wątrobiaka szczura (linia Fe33) transfekowano plazmidem zawierającym fragment promotora genu *hsp70.1* szczura złączony z genem CAT (bakteryjna acetylotransferaza chloramfenikolu) i inkubowano w temp. 42°C w podanym czasie. Następnie badano aktywność CAT w lizatach komórkowych, stosując jako substrat C¹⁴-chloramfenikol. Produkty reakcji rozdzielano metodą chromatografii cienkowarstwowej. a — substrat; b, c — acetylowane formy chloramfenikolu (intensywność zaczernienia plam odzwierciedla aktywność promotora genu *hsp70.1*) (Z. Krawczyk i P. Wolniaczek, dane niepublikowane). B. Komórki ludzkie HeLa inkubowano w temp. 42°C w podanym czasie. Następnie badano stopień ekspresji genu *hsp70.1* w izolowanych jądrach komórkowych metodą „run on”. Dane wyrażono w jednostkach arbitralnych. Na podstawie [11].

od wielkości różnicy pomiędzy temperaturą fizjologiczną i temperaturą szoku termicznego, a także od gatunku organizmu i rodzaju komórek, przy czym stopień ekspresji genów *hsp70i* skorelowany jest na ogół ze stężeniem aktywnego czynnika HSF [11]. Wzór ekspresji genów *hsp70i*, a zwłaszcza przebieg fazy atenuacji w przypadku indukcji tych genów przez czynniki inne niż szok termiczny nie jest jeszcze dobrze poznany.

Intensywna transkrypcja i translacja genów *hsp70i* ustaje po spadku temperatury do wartości fizjologicznej, lecz podwyższony poziom białek HSP70 w komórkach może utrzymywać się przez dłuższy czas (od kilkunastu do kilkudziesięciu godzin) wywołując stan termotolerancji [14]. Równocześnie od dawna obserwowano, że wzrost stężenia białek HSP może być czynnikiem hamującym aktywację genów *hsp70i*. Np. w komórkach *S. cerevisiae* podwyższenie poziomu endogennych białek HSP70

powodowało spadek stopnia ekspresji genu wskaźnikowego znajdującego się pod kontrolą promotora *hsp70* [15]. Także w komórkach ludzkiej białaczki limfoblastycznej, które w wyniku stabilnej transfekcji genem *hsp70i* syntezowały konstytutywnie białko HSP70i faza atenuacji była znacznie krótsza niż w komórkach kontrolnych [17]. Z kolei mutacja genów *hsp70*, objawiająca się brakiem funkcjonalnego białka powodowała w komórkach *S. cerevisiae* pobudzenie ekspresji innych genów *hsp* [16, 18]. Opisanie wyżej obserwacje i wiele innych wskazywały, że proces ekspresji genów *hsp70* podlega autoregulacji, a negatywnym elementem regulacyjnym są prawdopodobnie białka HSP70i i HSC70 [19, przegląd w 10]. Problem ten będzie omawiany szerzej w rozdziale III-3.

Należy wspomnieć, że mimo odmiennego mechanizmu aktywacji genów *hsp* u bakterii, transkrypcja tych genów także podlega autoregulacji i, podobnie jak u eukariontów, negatywnym elementem regulacji jest odpowiednik HSP70 — białko DnaK [20, 21].

III. Czynniki transkrypcji HSF

U drożdży i muszki owocowej występuje tylko jeden czynnik transkrypcji HSF, natomiast u roślin wyższych i kręgowców jest ich kilka i są one kodowane przez odrębne geny. U myszy wykryto dwa czynniki: HSF1 i HSF2 [22], zaś u człowieka trzy: HSF1 [23], HSF2 [24] i HSF4 [25]. Trzy czynniki HSF (HSF1, HSF2 i HSF4) wykryto także u kury [26]. Dotychczas nie sklonowano czynników HSF szczura. Obecność kilku typów cząsteczek HSF u wyższych eukariontów służy, prawdopodobnie, różnicowaniu odpowiedzi komórek w sposób zależny od rodzaju stresora i komórki.

HSF zaliczany bywa do rodziny czynników transkrypcyjnych ETS, której głównym przedstawicielem jest białko kodowane przez protoonkogen *Ets-1*, a do której należą między innymi także: CAP (ang. *catabolite activator protein*), HNF-3 (ang. *hepatocyte nuclear factor*), bakteryjne czynniki σ^{32} i σ^{70} , będące alternatywnymi podjednostkami polimerazy RNA i inne [27]. Wyznacznikiem podobieństwa pomiędzy białkami rodziny ETS jest struktura domeny oddziałującej z DNA o budowie typu helisa-skłębhelisa (ang. *helix-turn-helix*, HTH), oraz motyw GAA w sekwencji DNA rozpoznawanej przez te białka (patrz rozdziały III-2 i III-3).

U drożdży *S. cerevisiae* delecja genu *hsf* jest letalna [28]. Efekt letalny można znieść poprzez tranfekcję komórek o genotypie *hsf*^{-/-} plazmidem kodującym ludzki czynnik HSF1 lub HSF2 [29], co świad-

czy o znacznym międzygatunkowym podobieństwie funkcjonalnym pomiędzy czynnikami HSF. Delecja lub mutacje genu *hsf* u muszki owocowej nie są letalne, wpływają jedynie na niektóre procesy życiowe. Znacznie zmniejsza się przeżywalność komórek w warunkach ostrego szoku termicznego a także hamowane są procesy rozwoju i oogenezy, jednak bez powstawania widocznych zmian morfologicznych [30]. Wstępne badania wykazują, że także u myszy delecja genu HSF1 nie wpływa na ogólne funkcje życiowe jednak w komórkach *hsf1*^{-/-} nie pojawia się stan termotolerancji [31].

III-1. Właściwości czynnika HSF1

Czynnik HSF1 kręgowców jest funkcjonalnym odpowiednikiem uniwersalnego czynnika HSF niższych eukariontów, który indukuje transkrypcję genów *hsp70i* i innych genów *hsp* pod wpływem szoku termicznego oraz wielu innych stresorów. HSF1 syntezowany jest konstytutywnie w prawidłowych warunkach fizjologicznych a aktywność genu *hsf1* nie wzrasta pod wpływem szoku termicznego. W warunkach prawidłowych cząsteczki HSF1 znajdują się w cytoplazmie w postaci nieaktywnego monomeru, niezdolnego do wiązania się z DNA. Szok termiczny lub inny rodzaj stresu indukuje transformację HSF1 w aktywną, trimeryczną formę (Rozdział III-3). HSF1 (a także niektóre inne czynniki HSF; patrz rozdziały V i VI) to jedyne znane czynniki transkrypcyjne, których aktywna forma ma postać homotrimeru. Trimeryczne cząsteczki przemieszczają się do jądra komórkowego, przy czym rozmieszczenie HSF1 w nukleoplazmie jest nierównomierne. Czynnik gromadzi się w kilku miejscach tworząc wyraźne granule o nieregularnym kształcie zanikające w fazie atenuacji [32, 33]. Lokalizacja granul HSF1 nie pokrywa się z lokalizacją transkryptów genów *hsp70* i *hsp90*. Liczba i wzór rozmieszczenia granul nie zależy od rodzaju czynnika stresującego. Liczba granul HSF1 jest jednak skorelowana z ploidią. Funkcjonalne znaczenie granul HSF1 nie jest na razie jasne.

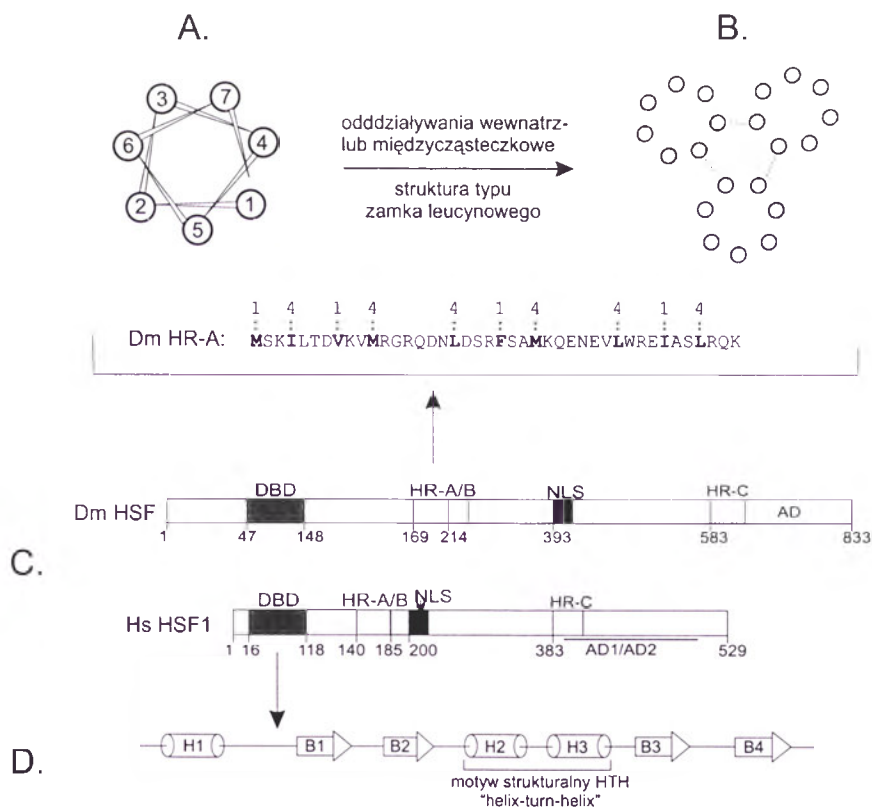
III-2. Struktura czynnika HSF1

W cząsteczce HSF ssaków, roślin wyższych, drożdży i muszki owocowej można wyróżnić kilka regionów o podstawowym znaczeniu dla funkcji tego białka i jedynie w tych regionach cząsteczki międzygatunkowe podobieństwo sekwencji aminokwasów jest znaczące [3, 34]. W pobliżu N-końca cząsteczki HSF1 znajduje się domena DBD (ang. *DNA binding domain*), za pomocą której HSF1

oddziałuje z sekwencją HSE. Do domeny DBD przylega region oligomeryzacji, który jest miejscem oddziaływań z innymi cząsteczkami HSF w trimerze. W regionie tym wyróżnia się dwa motywy strukturalne nazywane HR-A i HR-B lub LZ1 i LZ2 (HR od ang. *hydrophobic repeats*; LZ — ang. *leucine zipper*) [3, 35, 36]. Trzeci region homologii (HR-C lub LZ3 [34, 37]) znajduje się w części C-końcowej cząsteczki. Odpowiada on za utrzymywanie czynnika HSF w nieaktywnej, monomerycznej konformacji. W centralnej części cząsteczki znajduje się także sekwencja sygnałowa NLS (ang. *nuclear localization signal*) kierująca HSF do jądra komórkowego [3, 38]. Rozmieszczenie domen w cząsteczce HSF przedstawiono na rycinie 2. Badania krystalograficzne struktury domeny DBD czynnika HSF drożdży *Kluyveromyces lactis* [39] oraz domeny DBD HSF muszki owocowej, wykonane za pomocą NMR w roztworze [40, 41], ustaliły budowę przestrzenną tej domeny. Domenę tworzą trzy regiony helikalne i cztery o strukturze β -harmonijki

(ang. β -sheet) uszeregowane w kolejności $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 3$ - $\beta 4$. Cztery ułożone antyrównolegle fragmenty o strukturze β stanowią konstrukcję podtrzymującą motyw typu helisa-skret-helisa (ang. *helix-turn-helix*, HTH) uformowany przez α -helisy 2 i 3 [39-41]. Prawdopodobnie, tak jak w przypadku innych białek zawierających domenę HTH fragmentem cząsteczki oddziałującym z DNA jest helisa 3 domeny HTH, tzw. helisa rozpoznająca (ang. *recognition helix*) [42].

Struktura domen HR-A, HR-B i HR-C jest podobna, została ona przedstawiona na rycinie 2 na przykładzie najdłuższej domeny: HR-A. Domenę tę tworzy ciąg 5 bloków, z których każdy złożony jest z siedmiu aminokwasów uszeregowanych tak, że pierwsza i czwarta reszta aminokwasowa ma charakter hydrofobowy. Domeny przyjmują strukturę α -helisy, w której reszty hydrofobowe znajdują się po jednej stronie spirali. Jest to budowa typowa dla domen mogących tworzyć strukturę tzw. zamka leucynowego (LZ). Struktury LZ mogą za pomocą od-



Ryc. 2. Elementy struktury czynnika HSF. **A.** Struktura domen hydrofobowych (HR) pokazana na przykładzie fragmentu domeny HR-A czynnika HSF muszki owocowej (sekwencja aminokwasów domeny oznaczona — Dm HR-A; szczegółowy opis domen HR w tekście). Hydrofobowe aminokwasy 1 i 4 (oznaczone ciemniejszymi kółkami) znajdują się po jednej stronie na powierzchni helisy. **B.** Schemat oddziaływań hydrofobowych pomiędzy α -helisami domen HR-A/B w trimerze HSF. Taki sam typ oddziaływań hydrofobowych warunkuje utrzymanie HSF w nieaktywnej, monomerycznej formie, z tą różnicą, że w tym przypadku są to oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe i zaangażowane są weń dwie a nie trzy domeny HR (HR-A/B i HR-C). **C.** Schematyczne rozmieszczenie funkcjonalnych domen w cząsteczce HSF muszki owocowej (Dm) i HSF1 człowieka (Hs). Oznaczenia: DBD — domena oddziałująca z DNA, HR — domeny hydrofobowe, NLS — sygnał transportu do jądra, AD — domeny aktywujące. Liczby umieszczone pod prostokątami oznaczającymi poszczególne domeny oznaczają położenie w odniesieniu do pierwszego aminokwasu z końca aminowego białka. **D.** Schemat struktury drugorzędowej domeny oddziałującej z DNA (na przykładzie domeny DBD ludzkiego czynnika HSF1). H1-H3: struktury helikalne, B1-B4 struktury β -harmonijki. Na podstawie prac [3, 40, 43] i innych cytowanych w tekście.

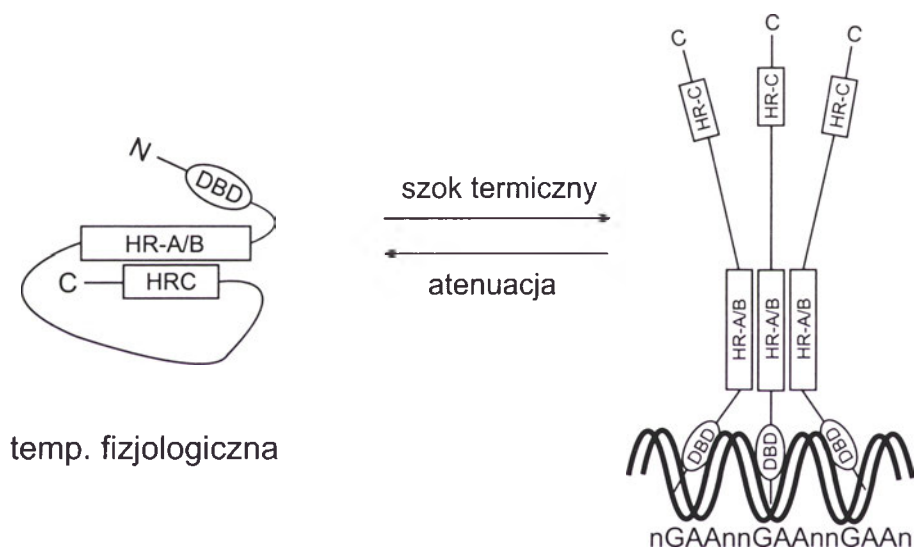
działań hydrofobowych tworzyć połączenia zarówno wewnątrzcząsteczkowe jak i międzycząsteczkowe. Przyjmuje się zatem, że aktywna, trimeryczna postać czynnika HSF powstaje w wyniku oddziaływań między regionami helikalnymi HR-A/B trzech cząsteczek HSF, natomiast forma monomeryczna utrzymywana jest poprzez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania pomiędzy regionami HR-A/B i HR-C (Ryc. 3).

Z elementami kompleksu inicjacyjnego/transkrypcyjnego oddziałuje tzw. domena transaktywacyjna AD (ang. *activation domain*). W cząsteczce HSF1 człowieka domena ta znajduje się w części C-końcowej cząsteczki i można w niej wyróżnić dwa podregiony AD1 i AD2 [45-50]. Domena AD ludzkiego HSF1 może funkcjonalnie zastępować domenę AD cząsteczki HSF *D. melanogaster* mimo braku istotnego podobieństwa na poziomie sekwencji ami-

Funkcja transaktywacyjna czynnika HSF1 w temperaturze fizjologicznej blokowana jest także w wyniku konstytutywnej fosforylacji niektórych reszt serynowych zlokalizowanych poza domeną AD. Mutacja powodująca zastąpienie seryny alaniną w pozycji 307 cząsteczki HSF1 człowieka powoduje konstytutywną aktywność czynnika [52-54]. Dotychczasowe badania wskazują, że kinazami, które mogą hamować aktywność czynnika HSF1 są kinaza ERK1 MAPK (ang. *extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase*) i kinaza 3 β syntazy glikogenu (GSK-3 β) [55].

III-3. Mechanizm aktywacji czynnika HSF1

Mechanizmy regulujące odwracalne przejścia pomiędzy monomeryczną a trimeryczną formą czynni-



Ryc. 3. Oddziaływania wewnątrz- i międzycząsteczkowe warunkujące odwracalne przemiany konformacyjne (trimeryzacja *versus* monomeryzacja) czynnika HSF. Na podstawie prac [36, 37]. Szczegóły opisano w tekście

nokwasów. [51]. Domena AD stymuluje zarówno inicjację transkrypcji jak i elongację przy czym w obu procesach zaangażowane są w sposób zróżnicowany subdomeny AD1 i AD2 [50].

Domeny AD czynnika HSF1 człowieka i muszki owocowej wyodrębnione z cząsteczki HSF i połączone z domeną DBD czynnika transkrypcji GAL4 aktywują geny wskaźnikowe w sposób konstytutywny, niezależnie od szoku termicznego [51, 49]. Natomiast w natywnej cząsteczce HSF1 transaktywacyjna funkcja regionu C-końcowego cząsteczki HSF1 podlega negatywnej regulacji poprzez fragmenty cząsteczki zlokalizowane pomiędzy domenami DBD i AD1 [46, 49]. Zatem, region C-końcowy cząsteczki HSF1 funkcjonuje jako domena transaktywacyjna jedynie w warunkach szoku termicznego lub pod wpływem innych stresorów [46, 47].

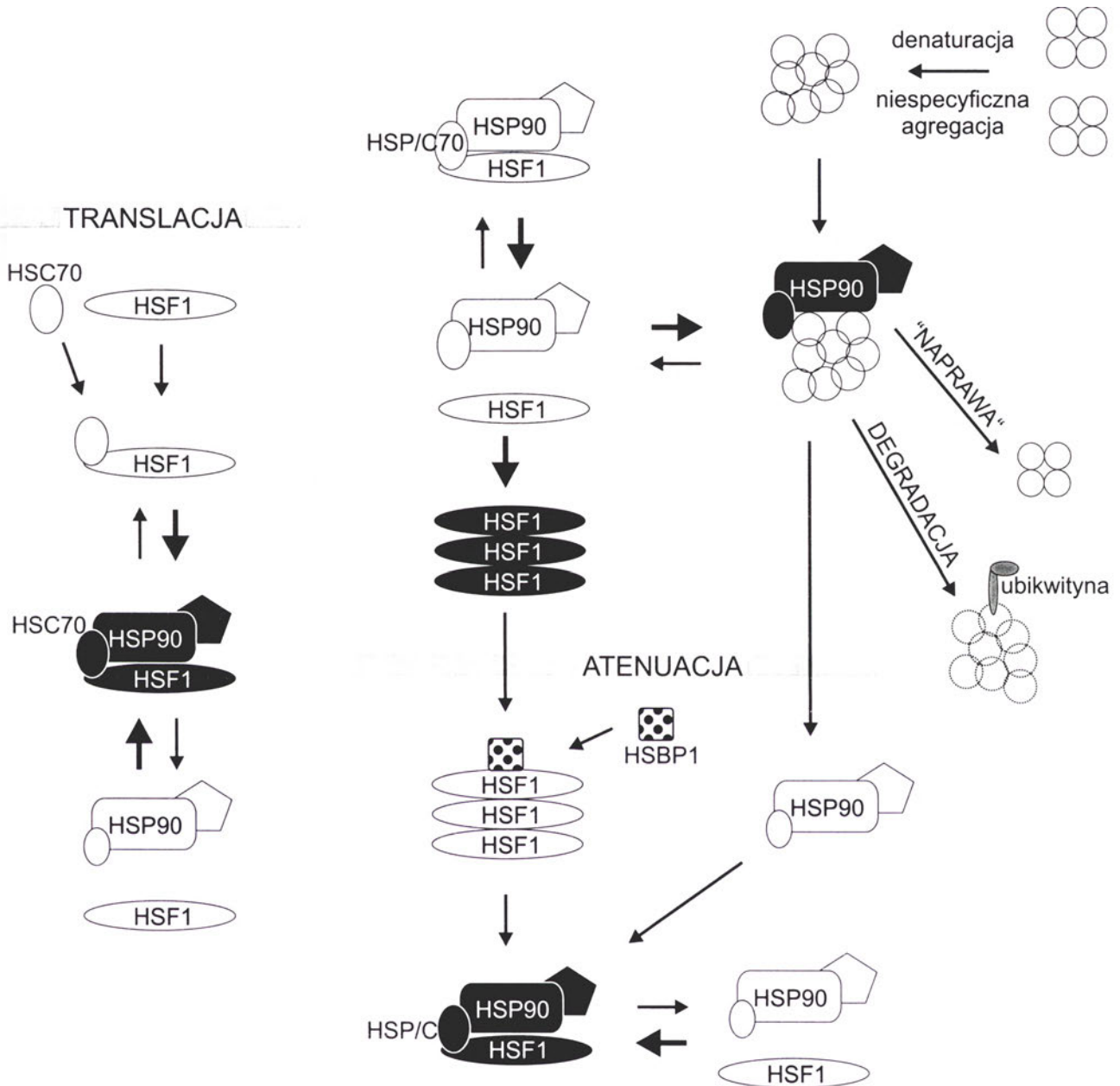
ka HSF1 w komórkach ssaków nie są jeszcze w pełni poznane. Szereg obserwacji cytowanych poniżej ugruntowało przeświadczenie, że struktura monomeryczna HSF1 utrzymywana jest poprzez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania, jednak wymaga dodatkowo stabilizacji przez czynnik (czynniki?) białkowy właściwy dla komórek eukariotycznych.

Rekombinowane czynniki HSF1 człowieka i HSF muszki owocowej syntetyzowane w komórkach *E. coli*, spontanicznie przyjmują strukturę oligomeryczną [56, 57], natomiast syntetyzowane w komórkach eukariotycznych pozostają w formie monomerycznej [37, 56, 58]. Oczyszczony czynnik HSF1 przechodzi w czasie aktywacji *in vitro* z formy monomerycznej w trimer już w 37°C, a przy pH obniżonym do wartości 5.9 — w temp. 25°C [57]. Podobnie, część puli HSF1 oczyszczonego do homogenno-

ści i zdenaturowanego za pomocą chlorowodoru guanidyny samorzutnie przyjmuje w czasie renowacji postać trimery już w temperaturze 37°C. Jeśli jed-

monomerycznej w trimer zachodzi w temperaturze, w jakiej jest on aktywowany w komórkach gospodarza [58, 60, 61].

STRES KOMÓRKOWY



Ryc. 4. Rola białek szoku termicznego w procesie aktywacji i inaktywacji czynnika HSF ssaków. Część lewa ryciny przedstawia domniemane oddziaływania białek HSP z HSF1 w temperaturze fizjologicznej. Środkowa część ryciny przedstawia cykl przemian konformacyjnych czynnika HSF1 w komórce w czasie odpowiedzi komórek na szok termiczny. Prawa część ryciny informuje o udziale wieloskładnikowych kompleksów białek HSP w procesie „naprawy” zdenaturowanych polipeptydów lub kierowaniu nieodwracalnie uszkodzonych białek na drogę proteolizy. Kolorem ciemniejszym oznaczono kompleksy białkowe lub formy konformacyjne białka HSF1 przeważające ilościowo na określonym etapie procesu. Grube strzałki oznaczają preferowany kierunek przemian konformacyjnych lub oddziaływań międzycząsteczkowych. Kółka oznaczają podjednostki białek złożonych. Pięciokątem oznaczono inne niż HSP90 i HSP70/HSC70 (znane lub domniemane) składniki kompleksu. Na podstawie prac [65, 67].

nak renaturacja *in vitro* przebiega w obecności lizatu komórkowego to trimeryzacja następuje w 43°C [59]. Ponadto, temperatura w jakiej czynnik HSF1 ulega trimeryzacji jest cechą swoistą gatunkowo. W przypadku syntezy i aktywacji czynnika HSF1 w układzie heterologicznym transformacja z formy

Ponieważ ekspresja genów *hsp70* podlega autoregulacji, za główny czynnik negatywnie regulujący ekspresję tych genów uznano początkowo białko HSP70i lub/i HSC70. Wydawało się to tym bardziej oczywiste, że obserwowano powstawanie kompleksów HSP70/HSC70 z trimeryczną formą HSF1 [19,

62], a dodanie egzogenne białko HSP70 do ekstraktów otrzymanych z komórek kontrolnych hamowało powstawanie aktywnej formy czynnika [62]. Wyniki wstępnych badań sugerowały, że białko HSP70 może brać udział w inaktywacji czynnika HSF1 zarówno w fazie indukcji jak i w fazie represji transkrypcji genów *hsp70*.

Pierwotna hipoteza autoregulacji zakładała, że w warunkach fizjologicznych białko HSC70 (lub/i HSP70i) tworzy kompleks z monomerem HSF1 utrzymując czynnik transkrypcyjny w nieaktywnej formie. W komórkach poddanych działaniu szoku termicznego lub innego molekularnego stresora uszkodzone białka komórkowe współzawodniczą z czynnikiem HSF1 o opiekuńcze białko HSP70i/HSC70. Powoduje to oddysocjowanie HSF1 z kompleksu z białkiem opiekuńczym i samorzutną trimeryzację czynnika. Aktywacja genów szoku termicznego i wzrost stężenia białka HSP70i, prowadzi do ponownego tworzenia się kompleksów HSF1-HSP70 i monomeryzacji czynnika transkrypcji [63]. W celu weryfikacji tego modelu podjęto szereg badań, których wyniki można podsumować następująco:

1. HSP70 i HSC70 tworzą kompleks z trimeryczną formą czynnika HSF1 [64, 65]. Fragmentem cząsteczki HSF1, z którym wiążą się białka HSP70 i HSC70 jest C-końcowa domena transaktywacyjna, a szczególnie istotne znaczenie w tych oddziaływaniach mają 4 C-końcowe aminokwasy [65]. Powstanie kompleksu nie wpływa na właściwość oddziaływania trimerycznej formy HSF1 z DNA, hamuje jednak aktywacyjną funkcję czynnika HSF1. Oprócz hamowania transkrypcji genów *hsp*, oddziaływania białek HSP/C70 z HSF1 w komórce poddanej szokowi termicznemu sprzyjają monomeryzacji czynnika HSF1 w czasie fazy atenuacji [64, 65]. W fazie tej z transaktywacyjną domeną HSF1 wiąże się oprócz HSP70 i HSC70 także kilka innych białek. Spośród nich zidentyfikowano dwa, HSP40/HDj1 [65] i HSBP1 [66] i wykazano, że hamują one funkcję transaktywacyjną czynnika HSF1. Nie stwierdzono, aby trimeryczna forma HSF1 tworzyła kompleks z białkiem HSP90 [67].

2. W temperaturze fizjologicznej monomeryczna forma HSF1 tworzy kompleksy z białkami szoku termicznego HSP70, HSC70 [64, 68] i HSP90 [67, 69]. Mimo, że białka HSP70 i HSC70 spowalniają proces powstawania oligomerycznej formy HSF1 [68], to główne znaczenie w utrzymywaniu czynnika w postaci monomeru ma HSP90 [67]. Jednym z kluczowych dowodów wskazujących na rolę HSP90 jest obserwacja, że białko to usuwa HSF1 z kompleksów z

HSP70 i HSC70 oraz, że geldanamycyna, swoisty inhibitor białka HSP90, znacznie przyspiesza proces trimeryzacji HSF [67]. Kompleks HSP90-HSF jest nietrwały i może być wykryty jedynie w warunkach stabilizujących te oddziaływania [67].

Przytoczone dane wskazują, że zmiany konformacyjne czynnika HSF1 dokonują się poprzez złożone, wielostopniowe oddziaływania HSF z opiekuńczymi białkami HSP i białkami pomocniczymi, podobnie jak to ma miejsce np. w przypadku aktywacji receptorów hormonów steroidowych [70, 71]. Aktualny model zmian konformacyjnych czynnika HSF1, uwzględniający udział HSP90 i HSP/C70 w tym procesie przedstawiony jest na rycinie 4.

IV. Struktura HSE. Oddziaływanie HSF1 z HSE

HSE ma budowę modułową, a jednostką struktury HSE jest pentanukleotyd nGAAn, gdzie n oznacza dowolny nukleotyd [72, 73]. Metodą ukierunkowanej mutagenezy wykazano, że w pierwszej pozycji pentanukleotydu istnieje jednak preferencja dla A, co wyraża się wzrostem wydajności transkrypcji [74], natomiast G w pozycji drugiej jest całkowicie konserwatywna i jej substytucja hamuje transkrypcję [73]. Funkcjonalny element HSE jest ciągiem kilku (co najmniej trzech) pentanukleotydów następujących po sobie w odwróconej orientacji (przykładowo: [nGAAn] [nTTCn] [nGAAn]) przy czym, na ogół, nie wszystkie pentamery tworzące HSE mają idealną sekwencję nGAAn. W promotorach różnych genów *hsp70i* liczba pentamerów nGAAn w danym ciągu tworzącym HSE może wynosić od 3 do 8, liczba funkcjonalnych miejsc HSE waha się od 2 do 4, a wzajemne rozmieszczenie bloków HSE względem siebie i względem miejsca inicjacji transkrypcji także bywa odmienne. Każdy moduł nGAAn w regionie HSE oddziałuje z domeną DBD jednej cząsteczki HSF1 wimerze [75, 76]. Wraz ze wzrostem liczby pentanukleotydów w HSE zwiększa się liczba przyłączanych cząsteczek HSF1 i jednocześnie znacznie wzrasta stabilność kompleksu HSE-HSF, jakkolwiek nie wpływa to istotnie na poziom ekspresji genu [77, 78].

Badania prowadzone na modelu drożdży wskazują, że HSF może sterować zróżnicowaną ekspresją licznych genów w sposób zależny od struktury bloków HSE w poszczególnych genach [79, 80]. Szczególnie interesująca wydaje się możliwość oddziaływania HSF z sekwencjami podobnymi do HSE znajdującymi się poza obszarem promotorów genów *hsp*. Jakkolwiek liczbę potencjalnie funkcjonalnych

miejsce HSE o strukturze [nGAAn][nTTCn][nGAAn] w genomie ssaków ocenia się na około 10,000 [81] to prawdopodobnie większość z nich jest maskowana przez białka histonowe.

Z sekwencją HSE może oddziaływać także białko CHBF (ang. *constituive HSE binding factor*) będące represorem ekspresji genu *hsp70i* [82]. CHBF zidentyfikowano jako białko tożsame lub blisko spokrewnione z podjednostką 70 kDa autoantygeny Ku [83]. Druga podjednostka (86 kDa) białka Ku jest u człowieka identyczna z białkiem kodowanym przez gen naprawy DNA XRCC5 [84]. Ku wydaje się być swoistym regulatorem ekspresji genów *hsp70i*, ponieważ zwiększenie stężenia podjednostki 70 kDa ludzkiego białka Ku w komórkach szczura hamuje indukowaną termicznie ekspresję jedynie tych genów nie wpływając na stopień ekspresji innych genów *hsp* [85, 86].

IV-1. Czynniki wpływające na powstanie funkcjonalnego kompleksu HSF-HSE

Wielokrotnie obserwowano, że związanie się aktywnej, trimerycznej formy czynnika HSF1 z HSE jest warunkiem koniecznym, lecz nie zawsze wystarczającym, aby nastąpiła aktywacja transkrypcji genu *hsp70i* (a także innych genów *hsp*). Przykładem może być brak indukcji ekspresji genu *hsp70i* w komórkach mysiej białaczki erytroleukemicznej poddanych szokowi termicznemu [87], w komórkach NIH-3T3 traktowanych H₂O₂ [88], komórkach HeLa poddanych szokowi hiposmotycznemu [89], czy w komórkach HeLa traktowanych salicylanem sodu [90] mimo, że we wszystkich wymienionych przypadkach wykazano oddziaływanie trimerycznej formy HSF1 z HSE. Należy wspomnieć, że aspiryna, mimo iż nie indukuje bezpośrednio genów *hsp70i* powoduje (zarówno *in vivo* jak i *in vitro*), że indukcja transkrypcji genów *hsp70i* zachodzi w niższej temperaturze, a stopień pobudzenia ekspresji tych genów jest kilkakrotnie wyższy niż w komórkach nie- traktowanych salicylanem sodu [91,92]

HSF1 może także oddziaływać z promotorami różnych genów szoku termicznego w sposób wybiórczy. Np. w komórkach siatkówczaka (retinoblastoma, linia Y79) poddanych szokowi termicznemu trimer HSF1 aktywuje ekspresję genów *hsp90* nie wiążąc się jednak z HSE promotora genów *hsp70i* [93]. Kolejny przykład ilustruje bardziej złożoną sytuację. W komórkach mysiej białaczki (linia CH1 wywodząca się z limfocytów B) poddanych szokowi termicznemu *in vitro* trimer HSF1 wiąże się z promo-

torem genu *hsp70i*, a jednak nie zostaje uruchomiona transkrypcja genów *hsp70i*. Jeśli te same komórki poddawane są hipertermii *in vivo*, po implantacji do jamy otrzewnowej myszy, to geny *hsp70* są transkrybowane [94].

Sądzi się, że HSF1 osiąga pełną aktywność w wyniku dodatkowych modyfikacji trimeru. Jedną z nich jest prawdopodobnie zwiększony stopień ufosforylowania cząsteczki [58, 91, 95]. Przytoczone przykłady wskazują, że skuteczne oddziaływanie aktywnego czynnika HSF1 z sekwencjami HSE *in vivo* może być warunkowane modyfikacjami czynnika, strukturą chromatyny w obszarze promotora genu *hsp*, a także wpływem lokalnego środowiska komórkowego. Uwarunkowania te mogą być przyczyną narządowego i komórkowego zróżnicowania stopnia aktywacji transkrypcji genu *hsp70 in vivo*.

V. Właściwości czynnika HSF2

Dotychczas wyodrębniono i poznano strukturę czynników HSF2 myszy [21], człowieka [23] i pomidora [96]. U roślin czynniki HSF1 i HSF2 pełnią podobną funkcję będąc aktywatorami transkrypcji genów *hsp* w odpowiedzi na szok termiczny, natomiast u ssaków funkcje tych czynników są zróżnicowane. Ogólny plan budowy HSF1 i HSF2 jest podobny. Cząsteczka HSF2 zawiera, podobnie jak HSF1 domenę DBD (oddziałującą z DNA), domenę oligomeryzacyjną HR-A/B, sekwencję HR-C odpowiadającą domenie hamującej trimeryzację czynnika HSF1 [24] oraz domenę transaktywacyjną [97]. Istotne podobieństwo sekwencji aminokwasów pomiędzy czynnikami HSF1 i HSF2 zaznacza się jedynie w regionach DBD, HR-A/B i HR-C [24].

U myszy wykryto HSF2 we wszystkich badanych narządach. Czynniki ten może występować w postaci co najmniej dwóch izoform — α i β , powstających w wyniku alternatywnego składowania mRNA [98, 99]. Forma α w porównaniu z formą β zawiera dodatkowo 18 reszt aminokwasowych w części C-końcowej cząsteczki [98]. W testach transfekcyjnych czynniki HSF2- α znacznie silniej niż HSF2- β aktywuje gen wskaźnikowy znajdujący się pod kontrolą promotora zawierającego sekwencje HSE [98]. Poziom HSF2 jest zróżnicowany narządowo; najwięcej białka wykryto w jądrach, mięśniach szkieletowych i mózgu, natomiast najmniej w wątrobie, śledzionie i nerce [99]. Według S a r g e i wsp., [100] forma α przeważa w jądrach, a forma β dominuje w mózgu, natomiast według A l a s t a l o i wsp., [101] w jądrach dominującą

formą jest raczej forma β . W jądrach najwyższe stężenie HSF2 występuje w spermatocytach w stadium pachytenu i we wczesnych spermatydach [100, 101]. U szczura maksymalna ekspresja obu form (α i β) następuje w stadium III cyklu nabłonka plemnikotwórczego [101].

Nieaktywną postacią HSF2 jest dimer; forma wiążąca się z DNA jest trimerem. Nie stwierdzono, aby powstawały heteromeryczne formy czynników HSF1 i HSF2. W większości badanych tkanek czynnik HSF2 występuje w postaci dimerycznej, a ponadto większość bodźców, pod wpływem których HSF1 ulega trimeryzacji nie aktywuje HSF2. Czynniki HSF1 i HSF2 mogą wiązać się z tymi samymi blokami sekwencji HSE, wykazują jednak nieco odmienne preferencje co do sposobu oddziaływań. Optymalną strukturą, z którą wiąże się HSF1 jest HSE złożony z co najmniej 4 podjednostek, a w przypadku HSF2, HSE złożony z 2-3 pentamerów [76, 102].

Rola czynnika HSF2 w aktywacji transkrypcji genów nie jest jasna. Konstytutywną trimeryzację HSF2 i wysokie stężenie jego aktywnej postaci wykryto w komórkach raka zarodkowego linii F9 i PCC4.aza.R1 [103], w komórkach wczesnego zarodka myszy, w stadiach postimplantacyjnych [104] i w komórkach spermatogenicznych myszy [100]. Mimo, że HSF2 wiąże się z HSE *in vitro*, to *in vivo* nie wykazano ani oddziaływań tego czynnika z promotorem genów *hsp70i*, ani jednoznacznego udziału czynnika w aktywacji genów *hsp*. Udział HSF2 w regulacji transkrypcji genu *hsp70i* sugerowano w przypadku pobudzenia ekspresji genu *hsp70i* (bez znaczącej aktywacji HSF1) w czasie różnicowania, pod wpływem heminy, ludzkich komórek białaczki szpikowej linii K562 [105]. Wyniki testów transfekcyjnych wskazywały, że formą HSF2, która dominuje w komórkach K562 i aktywuje ekspresję genu *hsp70i* jest forma α , natomiast forma β działa represyjne [106]. Udział HSF2 jako czynnika aktywującego gen *hsp70* w komórkach K562 został jednak poddany w wątpliwość [107], przedstawiono bowiem dowody, że ani ekspresja chimerycznego genu zawierającego domenę transaktywacyjną czynnika HSF2 złączoną z domeną DBD czynnika GAL4, ani znaczny wzrost stężenia czynnika HSF2 nie aktywuje genu wskaźnikowego w komórkach K562 stymulowanych heminą. Wymienieni autorzy [107] aktywację genu *hsp70i* pod wpływem heminy przypisują czynnikowi HSF1.

Brak korelacji pomiędzy stopniem ekspresji genów *hsp* i poziomem HSF2 sugeruje, że HSF2 może być czynnikiem transkrypcyjnym dla genów innych niż geny *hsp*. Dotychczas udało się jedynie

wykazać, że czynnik HSF2 może aktywować transkrypcję genu tioredoksyny [106]. Istnieją przesłanki wskazujące, że aktywacja genów (w tym także *hsp*) przez HSF2 wymaga obecności swoistych kofaktorów. Posługując się metodą „dwuhybrydową” (ang. *two-hybrid assay*) wykazano, że w komórkach K562 z czynnikiem HSF2 wiąże się białko nukleoporyna p62, główny składnik kompleksu porowego [108]. Wiązanie odbywa się poprzez domenę trimeryzacyjną czynnika HSF2 i C-końcową helikalną domenę nukleoporyny. Nukleoporyna może być jednym z czynników hamujących aktywację HSF2. Wymieniona wyżej grupa badaczy wykryła także swoiste dla jąder (*testes*) białko HSF2BP, które oddziałuje z HSF2 [102]. Funkcja tego białka nie jest na razie znana.

Najnowsze badania wskazują, że HSF2 trimeryzuje i indukuje ekspresję genów *hsp* w warunkach zablokowania funkcji proteasomu [110, 111], przy czym aktywacja HSF2 jest w znacznym stopniu niezależna od rodzaju komórek. Jednym z inhibitorów proteasomu jest hemina, stąd prawdopodobnie wzrost ekspresji genów *hsp70* w komórkach K562 traktowanych tym związkiem. Zahamowanie funkcji proteasomu powoduje niespecyficzną aktywację ekspresji podobnego zestawu genów *hsp* jak w przypadku aktywacji poprzez czynnik HSF1. Wysuwana jest hipoteza, że różne czynniki HSF aktywowane są w odpowiedzi na różne „zestawy” bodźców, zapewniając wzrost ekspresji genów *hsp* w odmiennych procesach. I tak, HSF1 jest aktywowany gdy konieczne jest zapewnienie ochrony białek przed denaturacją, natomiast HSF2 jest aktywowany gdy zachodzi potrzeba usunięcia poliubikwitynowanych białek przeznaczonych do degradacji proteolitycznej [110].

VI. Inne czynniki HSF wyższych eukariontów

W komórkach ptasich, oprócz HSF1 i HSF2 występuje czynnik HSF3. Aktywna trimeryczna forma HSF3 powstaje w wyższej temperaturze szoku termicznego i po dłuższym czasie od zadziałania szkodliwego bodźca, a więc w bardziej ekstremalnych warunkach niż to ma miejsce w przypadku HSF1. Dotychczasowe badania sugerują, że HSF3 może działać w sposób swoisty tkankowo, a także może aktywować geny *hsp* w sposób zależny od cyklu komórkowego [25, 112, 113]. HSF3 wydaje się być modulatorem aktywności HSF1, bowiem obserwowano, że w komórkach pozbawionych genu *hsf3* czynnik HSF1 nie ulega trimeryzacji i transkrypcja genów

hsp jest zahamowana. Ponowne wprowadzenie genu *hsf3* do komórek o genotypie *hsf3* *-/-* przywraca zdolność czynnika HSF1 do trimeryzacji [114].

Ludzki czynnik HSF4 różni się od innych czynników HSF brakiem C-końcowej domeny HRC i nie wykazuje zdolności aktywowania transkrypcji genów *hsp*. Ekspresja HSF4 jest zróżnicowana tkankowo — w najwyższym stężeniu występuje on w sercu, mózgu, mięśniach szkieletowych i trzustce. Po transfekcji genu *hsf4* do komórek HeLa wykrywano obecność aktywnego trimeru HSF4, który wiązał się z sekwencjami HSE powodując znaczny spadek poziomu ekspresji genów *hsp* [24]. Czynniki HSF4, konkurując o miejsce wiązania z czynnikiem HSF1 ma zatem właściwości represora i prawdopodobnie jest jednym z czynników odpowiedzialnych za tkankowo specyficzną represję genów *hsp*.

W komórkach roślin występuje do sześciu typów białek HSF. Ze względu na właściwości strukturalne roślinne czynniki HSF zostały podzielone na dwie klasy [115]. Czynniki klasy A posiadają w obrębie domeny HR-A/B insercję 21 aminokwasów, która potencjalnie może tworzyć strukturę typu „*coiled-coil*”. Białko klasy B ma budowę typową dla innych znanych czynników HSF. Gen *hsfA1* pomidora jest aktywny konstytutywnie, zaś geny *hsfA2* i *hsfB1* indukowane są pod wpływem szoku termicznego. Prawdopodobnie niektóre roślinne czynniki HSF (szczególnie klasy B) mogą pełnić funkcje represorów transkrypcji lub modulatorów aktywności innych białek HSF. Obszerne omówienie właściwości roślinnych czynników HSF znajduje się w pracach [115, 116].

VII. Regulacja ekspresji genów *hsp70i* w temperaturze fizjologicznej

Geny *hsp70i* mając właściwość uaktywniania się pod wpływem czynników uszkodzających natywną strukturę białek mogą także ulegać „spontanicznej”, zróżnicowanej ekspresji w czasie prawidłowych procesów fizjologicznych (np. w czasie różnicowania i rozwoju [117, 118]), w stanach patologicznych (np. w komórkach nowotworowych [119, 120]), czy w niektórych typach komórek dorosłych osobników (np. w komórkach mięśni [121], czy w niektórych komórkach mózgu i siatkówki [122]). Mechanizm aktywacji genów *hsp70i* w tych przypadkach nie jest w pełni poznany.

Promotory genów *hsp70i* oprócz sekwencji HSE zawierają także uniwersalne elementy regulacyjne typu „cis” takie jak „TATA-box”, „CAAT-box”, miejsce wiązania czynnika Sp1 i inne, których zna-

czenie w regulacji ekspresji genów *hsp70* nie zostało jeszcze w pełni zbadane. Spośród poznanych promotorów genów *hsp70i* najbardziej złożony jest obszar regulacyjny ludzkiego genu *hsp70.1* (*locus* HSP-A1A); gen ten, traktowany jako modelowy, jest jedynym genem *hsp70i* ssaków, którego mechanizm regulacji transkrypcji jest dosyć dobrze poznany.

Promotor genu *hsp70.1* człowieka jest promotorem wstępnie uformowanym, co oznacza, że niektóre czynniki transkrypcji są trwale zasocjowane z sekwencjami regulatorowymi także w warunkach fizjologicznych. Stale związane z promotorem są białka TBP (ang. *TATA-box binding protein*), CBF (ang. *CAAT-box binding protein*) i Sp1 [123, 124]. Wymienione oddziaływania są najważniejszymi elementami warunkującymi podstawowy poziom konstytutywnej ekspresji (ang. *basal expression*) ludzkiego genu *hsp70* w temperaturze fizjologicznej [125]. Dodatkowo, poziom podstawowej ekspresji genu jest modulowany poprzez oddziaływanie specyficznych czynników transkrypcyjnych z sekwencją SRE (ang. *serum response element*) pod wpływem czynników wzrostowych zawartych w surowicy krwi [126]. Ponadto ekspresja genu *hsp70.1* człowieka może być modulowana przez białko E1A adnowirusa oraz białka p53, c-Myb, B-Myb, STAT-1 i c-MYC (patrz niżej).

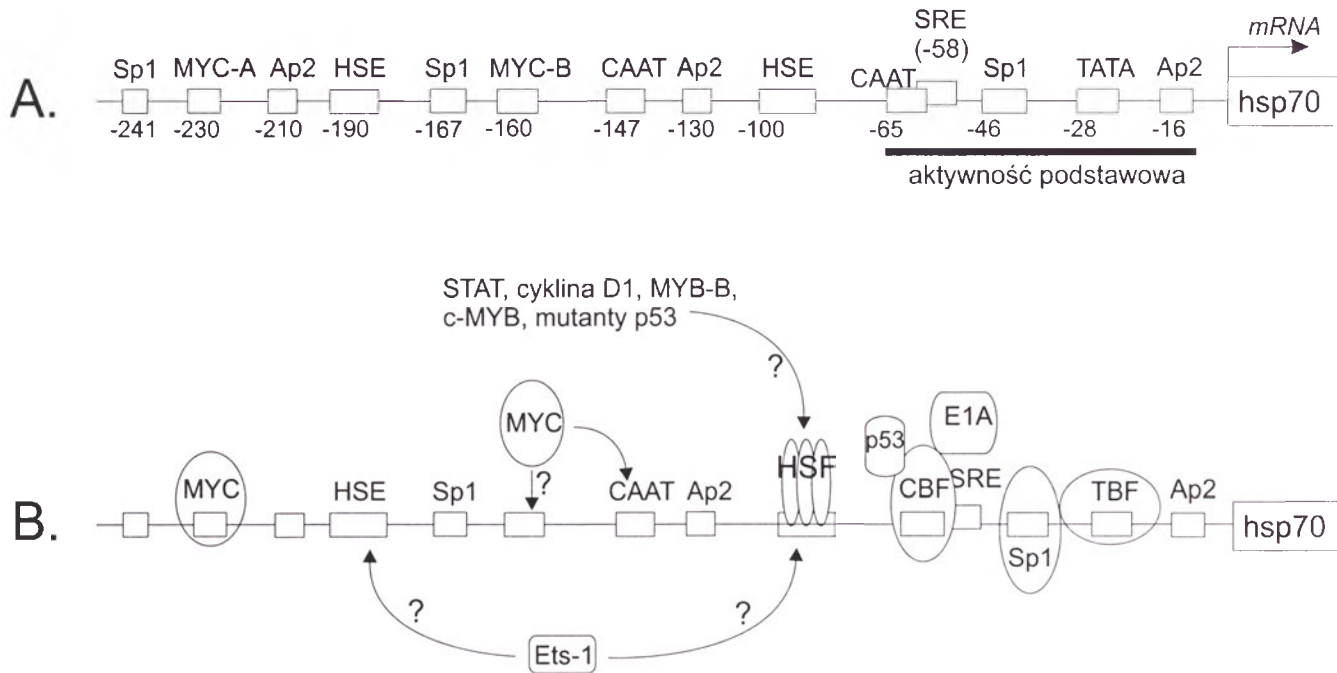
Na rycinie 5 przedstawiono schematycznie rozmieszczenie znanych i potencjalnych elementów regulacyjnych „cis” w promotorze genu *hsp70.1* człowieka oraz zaznaczono ich udział w modulowaniu ekspresji genu.

Aktywacja genu *hsp70.1* przez białko E1A adnowirusa następuje w wyniku oddziaływań pomiędzy E1A a czynnikiem transkrypcji CBF [127]. Z czynnikiem CBF oddziałuje także białko p53 typu dzikiego hamując ekspresję genu [128]. Z kolei niektóre formy zmutowanego białka p53 aktywują ekspresję genu *hsp70.1* w sposób zależny od sekwencji HSE, jednak nie wiążą się bezpośrednio z tą sekwencją [129].

Silnymi aktywatorami genu *hsp70.1* w komórkach QT6 są białka B-MYB i cyklina D1. Aktywacja wymaga obecności sekwencji HSE, jednak jej mechanizm jest nieznan [130]. Słabszym aktywatorem genu *hsp70.1* niż B-MYB jest c-MYB. Najnowsze dane wskazują, że białko c-MYB tworzy kompleks z czynnikiem transkrypcji HSF3, co uaktywnia ten czynnik w temperaturze fizjologicznej [131]. Podobnie w komórkach HepG2 traktowanych INF- γ czynnik transkrypcji STAT-1 tworzy kompleks z czynnikiem HSF; kompleks ten ma właściwość wiązania się z regionem HSE i

aktywowania ekspresji genu *hsp70.1* [132]. W promotorze genu *hsp70.1* człowieka znajdują się także dwa miejsca przyłączenia białka c-MYC [133]. Delecja sekwencji wiążących c-MYC hamuje aktywację genu *hsp70.1* indukowaną w komórkach HL-60 przez pole magnetyczne [134].

Przeświadczenie to wynika z licznych obserwacji zwiększonej przeżywalności komórek, w których z przyczyn fizjologicznych lub w wyniku manipulacji eksperymentalnych wzrasta stężenie białek HSP70i. Obecnie coraz większą uwagę poświęca się wyjaśnianiu roli jaką mogą pełnić białka HSP70i w ko-



Ryc. 5. A. Struktura promotora genu *hsp70.1* (*HSPA1A*) człowieka. Prostokątami zaznaczono schematycznie rozmieszczenie elementów regulacyjnych „cis”. Liczby umieszczone pod prostokątami wskazują położenie określonej sekwencji regulacyjnej w odniesieniu do miejsca startu transkrypcji. Pozycja większości miejsc wg [78]; miejsca SRE wg [126], miejsc MYC wg [133]. Podkreślono region promotora warunkujący podstawową, konstytutywną aktywność (ang. *basal activity*) genu w temperaturze fizjologicznej. B. Oddziaływania elementów regulacyjnych „trans” z sekwencjami regulacyjnymi genu *hsp70.1*. Czynniki warunkujące aktywność konstytutywną w warunkach fizjologicznych przedstawiono w postaci niezaciemnionych owali. Czynniki transkrypcyjne wpływające na pobudzenie bądź hamowanie transkrypcji pod wpływem różnych czynników stresujących oznaczono kolorem szarym. Oddziaływania nie w pełni potwierdzone oznaczono znakiem zapytania. Szczegóły dotyczące oddziaływań poszczególnych elementów regulacyjnych „cis” i „trans” oraz cytowania prac źródłowych znajdują się w tekście.

W procesie aktywacji genu *hsp70i*, w pewnych sytuacjach ujawnia się znaczenie regulacyjne struktur chromatynowych wyższego rzędu. W czasie embriogenezy myszy gen *hsp70.1* jest silnie aktywowany na etapie dwukomórkowego zarodka [135]. Z badań prowadzonych na myszach transgenicznym wynika, że jednym z elementów istotnych dla aktywacji transkrypcji genu *hsp70.1* w tym czasie są sekwencje MAR (ang. *matrix associated regions*). Sekwencje te nie wydają się mieć jednak znaczenia w procesie aktywacji transkrypcji genu *hsp70* indukowanej pod wpływem szoku termicznego [136].

VIII. Uwagi końcowe

Mimo braku pełnej wiedzy o funkcji białek szoku termicznego kodowanych przez geny *hsp70i* istnieje głębokie przekonanie o ich cytoprotekcyjnej funkcji w stosunku do komórek ekspozowanych na działanie cytotoksycznych czynników egzo- i endogennych.

W komórkach, które syntetyzują je konstytutywnie w temperaturze fizjologicznej, a także badaniu jaki wpływ na przebieg rozmaitych chorób (w szczególności chorób nowotworowych) lub ich patogenezę może mieć zwiększona ekspresja genów *hsp70i*.

Poznanie mechanizmów regulujących ekspresję indukowaną i konstytutywną pozwoli w przyszłości sterować ekspresją tych genów w celach terapeutycznych. Indukcja genów *hsp70i* może bowiem sprzyjać zmniejszaniu zakresu uszkodzeń mięśnia sercowego i mózgu powstałych w wyniku niedotlenienia, przyspieszać proces gojenia ran czy modulować odpowiedź immunologiczną. Z kolei hamowanie ekspresji genów *hsp70i* może być pożądanym w przypadku ich zwiększonej ekspresji: np. w komórkach nowotworowych, kiedy zwiększony poziom białek HSP70i może przyczyniać się do powstania oporności na cytostatyki i cytolizę czy hamować proces apoptozy. Omówienie obecnego stanu badań, których celem jest poszukiwanie warunków i farma-

ceuteyków modulujących stopień ekspresji genów *hsp70i*, a także omówienie prób zastosowania genów *hsp70i* w terapii genowej może czytelnik znaleźć w innych pracach przeglądowych [7, 137].

Poznanie mechanizmu regulacji ekspresji genów *hsp70i* przyczyni się także do pełniejszego zrozumienia przyczyn zróżnicowanej narządowo i komórkowo ekspresji innych genów *hsp* oraz genów nie należących do głównych grup *hsp*, które w regionie promotora zawierają funkcjonalną sekwencję HSE (np. gen MDR1 [138]; gen APP [139], czy niektóre geny kodujące białka MHC I [140]), a także genów, których ekspresja jest hamowana przez czynnik HSF1 (np. gen *c-fos* [141]). Zagadnienia wspomniane w uwagach końcowych będą przedmiotem odrębnej pracy przeglądowej.

Podziękowanie

Praca finansowana z projektu badawczego Nr 6 P04A 036 15 Komitetu Badań Naukowych.

Artykuł otrzymano 16 sierpnia 1999 r.

Zaakceptowano do druku 11 października 1999 r.

Piśmiennictwo

- Lindquist S, Craig EA (1988) *Annu Rev Genet* **22**: 631-667
- Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. R. I. Morimoto, A. Tissieres i C. Georgopoulos (red.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994
- Scharf KD, Hohfeld I, Nover L (1998) *J. Biosci* **4**: 313-329
- Vigh L, Maresca B, Harwood JL (1998) *TIBS* **23**: 369-374
- Ritossa F (1996) *Cell Stress Chaperones* **1**: 97-98
- Pelham HRB (1982) *Cell* **30**: 517-528
- Lisowska K, Krawczyk Z (1998) *Post Biochem* **44**: 179-192
- Forreiter C, Nover L (1998) *J. Biosci* **4**: 287-302
- Latchman DS (1998) *Int J Mol Medicine* **2**: 375-381
- Lindquist S (1993) *Autoregulation of the heat-shock response*. W: Joseph Ilan (red.) *Translational Regulation of Gene Expression*. Plenum Press, New York. pp. 279-320
- Abravaya K, Philips B, Morimoto RI (1991) *Genes Develop* **5**: 2117-2127
- Di Domenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S (1982) *Cell* **31**: 593-603
- Mosser DD, Theodorakis NG, Morimoto RI (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 4736-4744
- Weber LA (1992) *Cell Prolif* **25**: 101-113
- Stone DE, Craig EA (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 1622-1632
- Craig EA, Jakobsen K (1984) *Cell* **38**: 841-849
- Boorstein WR, Craig EA (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 3262-1632
- Mosser DD, Duchaine J, Massie B (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 5427-5438
- Baler R, Welch WJ, Voellmy R (1992) *J Cell Biol* **117**: 1151-1159
- Yura T, Nagai H, Mori H (1993) *Annu Rev Microbiol* **47**: 321-350
- Błaszczak A (1998) *Praca doktorska*. Uniwersytet Gdański.
- Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C, Morimoto RI (1991) *Genes Dev* **5**: 1902-1911
- Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6906-6910
- Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L, Tempst P, Kingston RE (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6911-6915
- Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 469-481
- Nakai S, Morimoto RI (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 1983-1997
- Landsman D, Wolffe AP (1995) *TIBS* **20**: 225-226
- Sorger PK, Pelham HRB (1988) *Cell* **54**: 855-864
- Liu X-D, Liu PCC, Santoro N, Thiele DJ (1997) *EMBO J* **16**: 6466-6477
- Jedlicka P, Mortin MA, Wu C (1997) *EMBO J* **16**: 2452-2462
- McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ (1998) *J Biol Chem* **273**: 7523-7528
- Cotto JJ, Fox SG, Morimoto RI (1997) *J Cell Sci* **110**: 2925-2934
- Jolly C, Morimoto RI, Robert-Nicoud M, Vourc'h C (1997) *J Cell Sci* **110**: 2935-2941
- Wu C (1995) *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 441-469
- Peteranderl R, Nelsone HC (1992) *Biochemistry* **31**: 12272-12276
- Zuo J, Baler R, Dahl G, Voellmy R (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7557-7568
- Rabindran SK, Haroun RI, Clos J, Wiśniewski J, Wu C (1993) *Science* **259**: 230-234
- Zandi E, Tran T-NT, Chamberlain W, Parker CS (1997) *Genes Develop* **11**: 1299-1314
- Harrison CJ, Bohm AA, Nelson HC (1994) *Science* **263**: 224-227
- Vuister G W, Kim S-J, Orosz A, Marquardt J, Wu C, Bax A (1994) *Struct Biol* **1**: 605-614
- Damberger FF, Pelton JG, Harrison CJ, Nelson HCM, Wemmer DE (1994) *Prot Sci* **3**: 1806-1821
- Vuister G W, Kim SJ, Wu C, Bax A (1994) *Biochemistry* **33**: 10-16
- Wu C, Clos J, Giorgi G i wsp., (1994). W: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. R. I. Morimoto, A. Tissieres i C. Georgopoulos (red.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 395-414
- Sorger PK, Nelson HCM (1989) *Cell* **59**: 807-813
- Green M, Schuetz TJ, Sullivan EK, Kingston RE (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 3354-3362
- Shi Y, Kroeger PE, Morimoto RI (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 4309-4318
- Zuo J, Rungger D, Voellmy R (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 4319-4330
- Newton EM, Knauf U, Green M, Kingston RE (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 839-846
- Yuan C-X, Czarnecka-Verner E, Gurley WB (1997) *Cell Stress and Chap* **2**: 263-275
- Brown SA, Weirich CS, Newton EM, Kingston RRE (1998) *EMBO J* **11**: 3146-3154
- Wiśniewski J, Orosz A, Allada R, Wu C (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 367-374
- Kline MP, Morimoto RI (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 2107-2115
- Knauf U, Newton EM, Kyriakis J, Kingston RE (1996) *Genes Dev* **10**: 2782-2793
- Xia W, Guo Y, Vilaboa N, Zuo J, Voellmy R (1998) *J Biol Chem* **273**: 8749-8755
- He B, Meng Y-H, Mivechi NF (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 6624-6633
- Clos J, Westwood T, Becker B, Wilson S, Lambert K, Wu C (1990) *Cell* **63**: 1085-1097
- Farkas T, Kutsikova YA, Zimarino V (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 906-918
- Baler R, Dahl G, Voellmy R (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 2486-2496

59. Larson SJ, Schuetz TJ, Kingston RE (1995) *Biochemistry* **34**: 1902-1911
60. Clos J, Rabindran S, Wiśniewski J, Wu C (1993) *Nature Lond* **364**: 252-255
61. Treuter E, Nover L, Ohme K, Scharf KD (1993) *Mol Gen Genet* **240**: 113-125
62. Abravaya KA, Myers M, Murphy SP, Morimoto RI (1992) *Genes Dev* **6**: 1153-1164
63. Morimoto RI (1993) *Science* **259**: 1409-1410
64. Rabindran SK, Wiśniewski J, Li L, Li GC, Wu C (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 6552-6560
65. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI (1998) *Genes Dev* **12**: 654-666
66. Satyal SH, Chen D, Fox SG, Kramer JM, Morimoto RI (1998) *Genes Dev* **12**: 1962-1974
67. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R (1998) *Cell* **94**: 471-480
68. Baler R, Zou J, Voellmy R (1996) *Cell Stress Chaperones* **1**: 33-39
69. Nadeau K, Das A, Walsh CT (1993) *J Biol Chem* **268**: 1479-1487
70. Scheibel T, Buchner J (1998) *Biochem Pharmacol* **56**: 675-682
71. Krawczyk (1999) *Endokrynologia Polska* (w druku)
72. Amin J, Ananthan J, Voellmy R (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 3761-3769
73. Xiao H, Lis JT (1988) *Science* **239**: 1139-1142
74. Fernandes, M., Xiao H, Lis JT (1994b) *Nucl Acid Res* **22**: 167-173
75. Perisic O, Xiao H, Lis JT (1989) *Cell* **59**: 797-906
76. Kroeger PE, Sarge KD, Morimoto RI (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 3370-3383
77. Xiao H, Perisic O, Lis JT (1991) *Cell* **64**: 585-593
78. Cunniff NA, Wagner J, Morgan WD (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 3504-3514
79. Bonner JJ, Ballou C, Fackenthal DL (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 501-508
80. Santoro N, Johansson N, Thiele DJ (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 6340-6352
81. Morimoto RI, Jurivich DA, Kroeger, PE i wsp (1994). W: *Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. R.I. Morimoto, A. Tissieres i C. Georgopoulos (red.) pp. 417-454. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
82. Liu RY, Kim D, Yang SH, Li, GC (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3078-3082
83. Kim D, Ouyang H, Yang SH, Nussenzweig A, Burgman P, Li GC (1995) *J Biol Chem* **270**: 15277-15284
84. Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestly A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FA, Jackson SP, Jeggo PA (1994) *Science* **265**: 1442-1445
85. Li GC, Yang S-H, Kim D, Nussenzweig A, Ouyang H, Wei J, Burgman P, Li L (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4512-4516
86. Yang S-H, Nussenzweig A, Li L, Kim D, Ouyang H, Burgman P, Li GC (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 3799-3806
87. Hensold JO, Hunt CR, Calderwood SK, Housman DE, Kingston RE (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 1600-1608
88. Bruce JL, Price BD, Coleman CN, Calderwood SK (1993) *Cancer Res* **53**: 12-15
89. Huang LE, Caruccio L, Liu AY-C, Chen KY (1995) *Biochem J* **307**: 347-352
90. Jurivich D, Sistonen L, Kroes R, Morimoto R (1992) *Science* **255**: 1243-1245
91. Jurivich DA, Pachetti C, Qiu L, Welk JF (1995) *J Biol Chem* **270**: 24489-24495
92. Fawcett TW, Xu Q, Holbrook NJ (1997) *Cell Stress Chaperones* **2**: 104-109
93. Mathur SK, Sistonen L, Brown IR, Murphy SP, Sarge KD, Morimoto RI (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8695-8699
94. Davidson S, Hoj P, Gabriele T, Anderson RL (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 1071-1078
95. Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 1392-1407
96. Scharf K-D, Heider H, Höhfeld I, Lyck R, Schmidt E, Nover L (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 2240-2251
97. Yoshima T, Yura T, Yanagi H (1998) *Nucleic Acids Res* **11**: 2580-2585
98. Goodson ML, Park-Sarge O-K, Sarge KD (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 5288-5293
99. Fiorenza MT, Farkas T, Dissing M, Kolding D, Zimarino V (1995) *Nuclei Acids Res* **23**: 467-474
100. Sarge KD, Park-Sarge O-K, Kirby JD, Mayo KE, Morimoto RI (1994) *Biol Reprod* **50**: 1334-1343
101. Alastalo T-P, Lonnstrom M, Leppa S, Kaarniranta K, Huikko M-P, Sistonen L, Parvinen M (1998) *Exptl Cell Res* **240**: 16-27
102. Kroeger PE, Morimoto RI (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7592-7603
103. Murphy S, Gorzowski JJ, Sarge KD, Phillips B (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 5309-5317
104. Rallu M, Loones M, Lallemand Y, Morimoto RI, Morange M, Mezger V (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2392-2397
105. Sistonen L, Sarge KD, Philips B, Abravaya K, Morimoto RI (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 4104-4111
106. Leppa S, Pirkkala L, Chow SC, Eriksson JE, Sistonen L (1997) *J Biol Chem* **272**: 30400-30404
107. Yoshima T, Yura T, Yanagi H (1998) *J Biol Chem* **273**: 25466-25471
108. Yoshima T, Yura T, Yanagi H (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 228-233
109. Yoshima T, Yura T, Yanagi H (1998) *Gene* **214**: 139-146
110. Mathew A, Mathur SK, Morimoto RI (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 5091-5098
111. Kawazoe Y, Nakai A, Tanabe M, Nagata K (1998) *Eur J Biochem* **255**: 356-362
112. Tanabe M, Nakai A, Kawazoe Y, Nagata K (1997) *J Biol Chem* **272**: 15389-15395
113. Nakai A, Kawazoe Y, Tanabe M, Nagata K, Morimoto RI (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 5168-5178
114. Tanabe M, Kawazoe Y, Takeda S, Morimoto RI, Nagata K, Nakai A (1998) *EMBO J* **17**: 1750-1758
115. Nover L, Scharf KD, Gagliardi D, Vergne P, Czarnecka-Verner E, Gurley WB (1996) *Cell Stress Chaperones* **1**: 215-223
116. Czarnecka-Verner E, Yuan C-X, Scharf K-D, Englisch G, Gurley WB (1997) *Acta Physiol Plantarum* **19**: 529-537
117. Loones M-T, Rallu M, Mezger V, Morange M (1997) *Cell Mol Life Sci* **53**: 179-190
118. D'Souza SM, Brown IR (1998) *Cell Stress Chaperones* **3**: 188-199
119. Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO i wsp. (1994) *Eur J Cancer* **12**: 1884-1891
120. Conroy S, Latchman D (1996) *Br J Cancer* **74**: 717-721
121. Locke M, Tanguay RM (1996) *Cell Stress Chaperones* **1**: 189-196
122. Manzerra P, Rush SJ, Brown IR (1997) *J Cell Physiol* **170**: 130-137
123. Abravaya K, Philips B, Morimoto RI (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 586-592
124. Morgan WD (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 4099-4104
125. Wu BJ, Kingston RE, Morimoto RI (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 629-633
126. Wu B, Williams GT, Morimoto RI (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2203-2207
127. Williams GT, McClannahan TK, Morimoto RI (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 2574-2587
128. Agoff SN, Hou J, Linzer DIH, Wu B (1993) *Science* **259**: 84-88
129. Tsutsumi-Ishii Y, Tadokoro K, Hanaoka F, Tsuchida N (1995) *Cell Growth Differ* **6**: 1-8

130. Kamano H, Klempnauer K-H (1997) *Oncogene* **14**: 1223-1229
131. Kanei-Ishii C, Tanikawa J, Nakai A, Morimoto R, Ishii S (1997) *Science* **277**: 246-248
132. Stephanou A, Isenberg DA, Nakajima K, Latchman DS (1999) *J Biol Chem* **274**: 1723-1728
133. Taira T, Negishi Y, Kihara F, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H (1992) *Biochim Biophys Acta* **1130**: 166-174
134. Lin H, Head M, Blank M, Jin M, Goodman R (1998) *J Cell Biochem* **69**: 181-188
135. Bensaude O, Babinet C, Morange M, Jacob F (1983) *Nature* **305**: 331-333
136. Thompson EM, Christians E, Stinnakre M-G, Renard J-P (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 4694-4703
137. Morimoto RI, Santoro MG (1998) *Nature Biotechnol* **16**: 833-838
138. Kim SH, Yeo GS, Lim YS, Kang CD, Kim CM, Chung BS (1998) *Exp Mol Med* **30**: 87-92
139. Adroer R, Acedo L-A, Oliva R (1997) *Neurosci Lett* **226**: 203-206
140. Groh, V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12445-12450
141. Chen C, Xie Y, Stevenson MA, Auron PE, Calderwood SK (1997) *J Biol Chem* **272**: 26803-26806

Kwaśne białka rybosomowe i ich udział w regulacji translacji

Acidic ribosomal proteins and their role in regulation of translation

ANNA GRZYB¹, PIOTR ZIEN¹, MAREK PILECKI², RYSZARD SZYSZKA³

Spis treści:

- I. Wstęp.
 - I.1. Właściwości fizykochemiczne rybosomu
- II. Kwaśne białka rybosomowe
 - II-1. Ogólna charakterystyka białek kwaśnych
 - II-2. Porównanie białek kwaśnych *Eucaryota* i *Procaryota*
 - II-3. Rybosomalne białka P0 i L10
- III. Struktura kompleksu P1/P2-P0
 - III-1. Charakterystyka fenotypowa mutantów białek kwaśnych P1/P2
 - III-2. Funkcje domen białka P0
 - III-3. Rola białek kwaśnych w procesie translacji
- IV. Potranslacyjne modyfikacje białek P
 - IV-1. Fosforylacja białkowych składników „palca”
 - IV-2. Kinazy białkowe modyfikujące białka P
 - IV-3. Metylacja
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
 - I-1. Physicochemical properties of the ribosome
- II. Acidic ribosomal proteins
 - II-1. Basic characteristic of acidic proteins
 - II-2. Comparison of *Eucaryotic* and *Procaryotic* acidic proteins
 - II-3. Ribosomal proteins P0 and L10
- III. Structure of the P1/P2-P0 complex
 - III-1. Phenotypic characteristic of the mutants of the P1/P2 acidic proteins
 - III-2. Function of the P0 protein domains
 - III-3. Role of the acidic proteins in the translation process
- IV. Posttranslational modification of P proteins
 - IV-1. Phosphorylation of the protein elements of the “stalk”
 - IV-2. Protein kinases modifying P proteins
 - IV-3. Methylation
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: CK2 — kinaza kazeinowa typu 2 (ang. *casein kinase type 2*, EC 2.7.1.37); PK60S — kinaza białkowa podjednostki rybosomowej 60S; kinaza RAP I — kinaza kwaśnych białek rybosomowych (ang. *Ribosomal Acidic Proteins kinase I*); PKA — kinaza białkowa zależna od cAMP; PKC — kinaza białkowa zależna od Ca²⁺ i fosfolipidów; aminoacylo-tRNA_i — inicjatorowy aminoacylo-tRNA; EF1, EF2 — czynnik elongacyjny 1, 2; kDa — tys. Daltonów; M_r — ciężar molekularny; pI — punkt izoelektryczny.

I. Wstęp

I-1. Właściwości fizykochemiczne rybosomu

Podstawową i integralną częścią aparatu translacyjnego w komórce są rybosomy. Te małe struktury o

średnicy ok. 30 nm grupują i koordynują funkcjonowanie kilkudziesięciu małych i wielkocząsteczkowych składników biorących udział w złożonym procesie biosyntezy białka. Rybosom to rybonukleoproteid złożony z dwu podjednostek — dużej i małej. Każda z nich zawiera swoiste łańcuchy RNA oraz zestaw białek inkrustujących kwasy nukleinowe. Rybosomalny RNA przybiera strukturę przypominającą jeża. Ta charakterystyczna forma powstaje wskutek wewnętrznego parowania zasad wchodzących w skład rRNA. Uważa się, że około 70% rRNA występuje w postaci odcinków sparowanych, a 30% w postaci pojedynczych nici. Struktura ta jest zasocjowana z białkami, zajmującymi określone w stosunku do siebie pozycje [1]. Rybosom jest dość sztywną bryłą, mogącą w pewnym zakresie zmieniać swoje kształty. W czasie biosyntezy białka jego elementy mogą się w stosunku do siebie przemieszczać. Tym niemniej na jego powierzchni są miejsca o stałym kształcie,

¹ Mgr, ²Dr, ³Dr hab., Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin; e-mail: szyszk@kul.lublin.pl

przyjmujące różne cząsteczki współreagujące ze sobą w czasie translacji [1, 2].

Dużą część rybosomu stanowią białka rybosomowe i stanowią one u *Eucaryota* — 35%, zaś u *Procarvota* 50% masy rybosomu. Współuczestniczą one w konstrukcji rybosomu, a także pełnią rolę regulacyjną. Białka rybosomowe małej podjednostki oznacza się literą S (ang. *small*) a dużej literą L (ang. *large*), oraz numerami zgodnymi z ich lokalizacją po rozdziale elektroforetycznym w żelu poliakrylamidowym. Większość białek rybosomowych to polipeptydy zasadowe pełniące głównie funkcję strukturalną tworząc kompleks z rRNA. Rolę regulacyjną w biosyntezie białka przypisuje się białkom kwaśnym [3].

II. Kwaśne białka rybosomowe

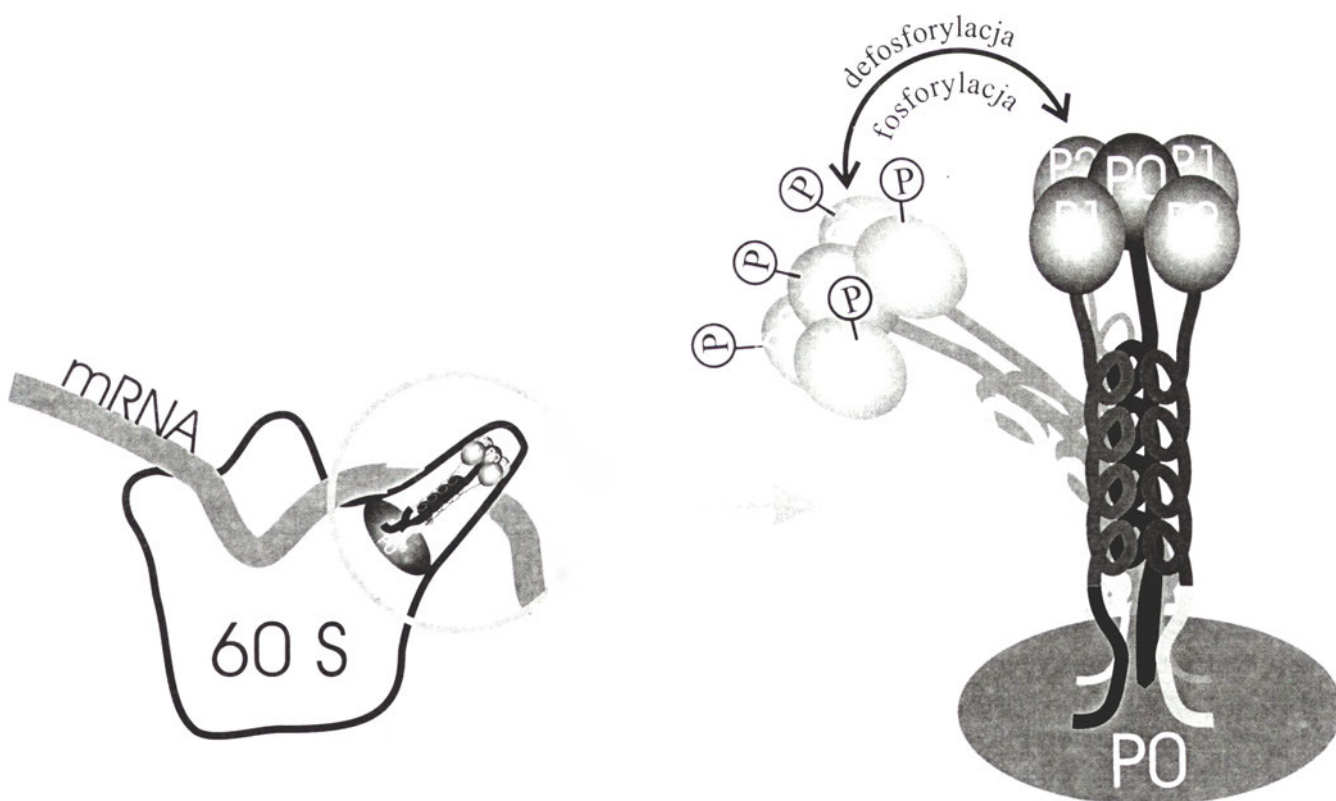
II-1. Ogólna charakterystyka białek kwaśnych

Białka kwaśne wykryto po raz pierwszy ponad 20 lat temu w rybosomach *Escherichia coli*. Występują one w większej podjednostce rybosomowej wszyst-

oznacza się literą A (ang. *acidic*), a eukariotyczne literą P (ang. *phosphorylated*).

Białka kwaśne *Procarvota* i *Eucaryota* posiadają wiele cech wspólnych: niską masę cząsteczkową (10-19 kDa), charakter kwaśny (pI od 3,0 do 5,0), dużą zawartość hydrofobowych domen bogatych w alaninę (stanowi do 20% aminokwasów polipeptydu), niską zawartość aminokwasów aromatycznych i argininy, brak cysteiny, dużą zawartość struktury α -helisy, zdolność do dimeryzacji, obecność w kilku kopiach w rybosomie, udział w formowaniu struktury „palca” (Ryc. 1), oddziaływanie z czynnikami translacyjnymi, brak degradacji po odłączeniu od rybosomu (kumulują się w cytoplazmie) [4].

Jednym z charakterystycznych elementów strukturalnych dużej podjednostki rybosomowej wszystkich organizmów jest trzon (potocznie zwany palcem), elastyczna wypukłość boczna, którą u bakterii tworzy pentameryczny kompleks złożony z dwóch dimerów białka L7 i L12 oraz jednej cząsteczki białka L10, a w komórkach *Eucaryota* z białek P1, P2 i P0. Uważa się, że struktura ta uczestniczy w interakcji czynników elongacyjnych z rybosomem w



Ryc. 1. Struktura „palca” podjednostki rybosomowej 60S. Procesy fosforylacji i defosforylacji są mechanizmami regulującymi powinowactwo białek do rybosomu, a przez to wpływają na jego aktywność oraz poziom translacji [68]. Zmienny skład a także ładunek „palca” rybosomowego może wpływać na jego konformację przestrzenną, skutkiem czego mogą być różnice w wydajności translacji różnych mRNA.

kich organizmów i są niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania. Prokariotyczne białka kwaśne

czasie biosyntezy białka, a miejsce reakcji znajduje się u jej podstawy [1, 3, 4].

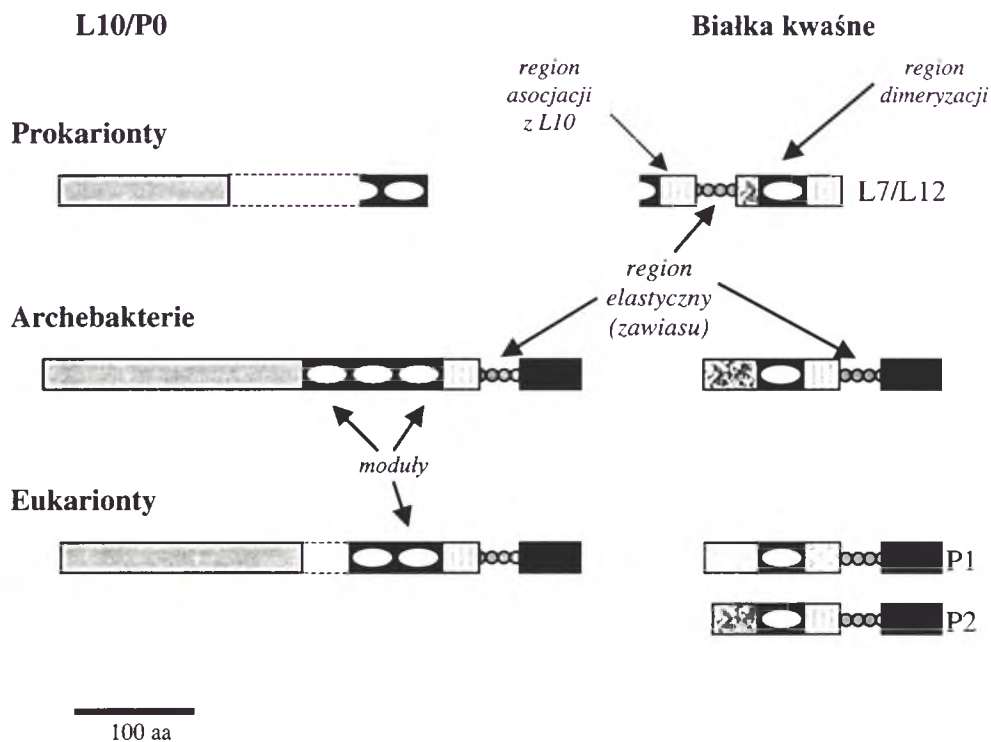
II-2. Porównanie białek kwaśnych *Prokaryota* i *Eucaryota*

Białka kwaśne podjednostki rybosomowej 50S *E. coli* należą do najlepiej poznanych białek rybosomowych. Oznaczono je symbolami L7/L12 [5]. Łańcuchy obu białek zbudowane są ze 120 aminokwasów o identycznych sekwencjach i M_r wynoszącym 12,2 kDa. Różnica między L7 i L12 dotyczy acetylacji N-końcowej reszty serynowej, w białku L7 występuje acetyloseryna, a w białku L12 seryna [6]. W związku z tym polipeptydy różnią się nieznacznie wartością punktu izoelektrycznego (pI): dla L7 pI= 4,7 a dla L12 pI= 4,85. Cechą charakterystyczną tych białek jest wysoka zawartość alaniny, kwasu glutaminowego, waliny i lizyny. Brak jest w ich składzie tyrozyny, tryptofanu i cysteiny.

Acetylacja N-końcowej seryny białka L12 następuje jeszcze przed przyłączeniem polipeptydu do rybosomu. Poziom jej nie jest stały i podlega on wyraźnym zmianom podczas hodowli komórek *E. coli* [7]. Stosunek L7 do L12 spada we wczesnej, a wzrasta w późnej fazie logarytmicznej. Pomimo wyraźnych zmian poziomu acetylacji białka L12, nie wykazano funkcjonalnego znaczenia obecności dwóch jego form. Rybosomy zawierające formę L12 wykazywały taką samą aktywność w procesie syntezy białka *in vitro* jak zawierające tylko białko L7 lub

obie formy, L7 i L12 [8]. Badania genetyczne dowodzą, że obie formy L7/L12 wykazują podobne cechy funkcjonalne. Inaktywacja genu kodującego acetylazę odpowiedzialną za tworzenie pochodnej metylowej białka L12 nie wpływa na wzrost komórki bakteryjnej [9]. Nie można jednak wykluczyć, że obie formy: L7 i L12 pełnią różne funkcje *in vivo*, za czym przemawia fakt, że rybosomy z komórek hodowanych na podłożu wzbogaconym zawierają 2-3-krotnie więcej białek L12 niż rybosomy z hodowli na podłożu minimalnym podczas gdy ilość białka w formie L7 zmienia się tylko w niewielkim stopniu [8].

Białko L7/L12 *E. coli* zawiera dwie domeny strukturalne: wydłużoną domenę N-końcową (reszty aminokwasowe od 1 do 36) i globularny fragment C-końcowy (reszty 53-120). W obrębie domeny C-końcowej występuje region o charakterze silnie kwaśnym i specyficznej strukturze, typowej dla tej grupy białek. Obie domeny łączy tzw. region zawiasu (reszty 37-52). Białka te występują w 4 kopiach na rybosomie i poprzez domeny N-końcowe tworzą dimery. Wolne domeny C-końcowe stanowią elementy funkcjonalne. Oba homodimery L7/L12 przez interakcję swoich N-terminalnych domen z C-końcem białka L10 tworzą pentameryczny kompleks (L7/L12)₄L10, który następnie łączy się z wysoce konserwatywnym regionem 23S rRNA zakrywając miejsce wiązania białka L11 (Ryc. 2) [10, 11].



Ryc. 2. Porównanie struktur białek rybosomowych L10/P0 i białek kwaśnych eubakterii, archebakterii i eukariontów na podstawie podobieństwa ich sekwencji aminokwasowych.

Rybosom *Eucaryota* zawiera białka kwaśne o podobnych właściwościach fizykochemicznych do swoich bakteryjnych odpowiedników i jak się wydaje podobnej funkcji. Ich podobieństwo przejawia się też na poziomie immunologicznym [5-8, 10]. Istnieją dwa typy białek P: P1 i P2. Stwierdzono je w komórkach takich organizmów jak np. człowiek, szczur, bezkręgowce, rośliny, drożdże. Charakteryzują się one masą cząsteczkową ok. 12 kDa oraz pI pomiędzy 3,0 i 4,0 [1, 3, 12, 13].

Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie homologii w sekwencji aminokwasowej sugeruje, że rodzina kwaśnych białek rybosomowych *Eucaryota* powstała drogą duplikacji pierwotnego genu. Pierwsza duplikacja spowodowała powstanie genów kodujących białka typu P1 i P2, natomiast druga doprowadziła do powstania czterech genów kodujących rodzinę białek kwaśnych u niższych *Eucaryota* [14]. Podział na grupy P1 i P2 wynika z porównania sekwencji aminokwasowych rybosomowych białek P pochodzących z wielu eukariontów, należących do różnych gałęzi filogenetycznych, z białkami rybosomowymi ssaków.

W ten właśnie sposób wyróżniono cztery typy białek w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Białka te tworzą 2 pary, z których pierwsza należy do grupy P1-P1A i P1B a druga do grupy P2-P2A i P2B. Białka te do niedawna określano odpowiednio YP1 α , YP1 β , YP2 α i YP2 β . W literaturze można spotkać inne, historycznie starsze nazewnictwo białek P2A, P2B i P1B — odpowiednio L44 lub L35, L45 lub L36 i L44' [15, 16](Tab. 1).

Tabela 1.

Odpowiedniki w nazewnictwie białek kwaśnych [15, 16]

A1	Ax	A2	A0	
	L44'	L44	L45	
		L35	L36	
P1		P2	P0	
YP1 α	YP1 β	YP2 α	YP2 β	P0
P1A	P1B	P2A	P2B	P0

C-koniec wszystkich białek P charakteryzuje duża konserwatywność (Tab. 2). Końcowy peptyd DMGFGLFD [13,15] występuje u wszystkich organizmów eukariotycznych, od drożdży aż po człowieka [17]. Odstępstwa od tej reguły notowane są u niektórych roślin i pierwotniaków. Wysoka konserwatywność sekwencji aminokwasowej tego odcinka sugeruje jego ważną rolę funkcjonalną. Niebagatelne

znaczenie tego peptydu podkreśla także fakt, że jest on eksponowany na powierzchni rybosomu. Przypuszcza się, że to właśnie fragment DMGFGLFD reaguje z czynnikami elongacyjnymi.

Także N-koniec u większości białek P wykazuje duże podobieństwo (Tab. 3). Wyjątek stanowią białka P1 roślin oraz białka P2 pierwotniaków.

Ilość białek P jest różna u poszczególnych gatunków, lecz stała w obrębie jednego gatunku i wynosi od dwóch u ssaków do ośmiu u *Trypanosoma crusi* [12].

Rybosom drożdży zawiera cztery białka kwaśne [18-20]. Początkowa analiza białek rybosomowych *S. cerevisiae* wykazała obecność trzech kwaśnych polipeptydów L44, L45 i L44'[20]. Scharakteryzowano je, oczyszczono oraz otrzymano dla nich specyficzne przeciwciała. Sklonowano także geny kodujące te białka. Białko L44' jest skróconą formą białka L44 (stąd jego nazwa L44'). W oparciu o konserwatywny C-koniec tych polipeptydów skonstruowano syntetyczne sondy oligonukleotydowe, dzięki którym zidentyfikowano gen kodujący kolejne białko kwaśne. Produkt tego genu nie był wykrywany we wcześniejszych badaniach, ale dokonano tego w połączonym systemie transkrypcji-translacji genu sklonowanego *in vitro*. Białko to posiada taki sam koniec karboksylowy i wykazuje wszystkie cechy charakterystyczne dla typowych rybosomowych białek kwaśnych [21]. Charakteryzuje się ono najniższym punktem izoelektrycznym spośród rybosomalnych białek P [20].

Jak dotąd niewiele jest wiadomo o przestrzennej budowie eukariotycznych białek P. Chociaż pełnią one te same funkcje co białka A *Prokaryota*, to analogia sekwencji aminokwasowych pomiędzy nimi jest niewielka. Podobieństwo funkcjonalne białek P do L7/L12 przejawia się między innymi w tym, że przyłączają się do rybosomu końcem aminowym i eksponują koniec karboksylowy. Poza tym w roztworach tworzą stabilne dimery przypominające bakteryjny dimer L7/L12. Ze względu na podobieństwo funkcjonalne omawianych białek postuluje się, że ich budowa strukturalna jest także zbliżona (globularna domena karboksylowa, połączona elastycznym regionem zawiasu z α -helikalną domeną N-końcową).

II-3. Rybosomalne białko P0 i L10

Białko P0 zostało opisane pierwotnie jako pochodzący z rybosomów kurczęcia polipeptyd o masie 40 kDa reagujący krzyżowo z przeciwciałami skierowanymi przeciwko białkom P1 i P2 [22]. Podobne

białka wykryto u innych eukariontów [23-26], a także u archebakterii [27]. Białko to ma masę 38 kDa i jest białkiem rdzenia rybosomowego [28].

Pomimo niepełnej homologii sekwencji aminokwasowej, P0 i L10 uznawane są za funkcjonalnie homologiczne [29]. P0 jest większe niż L10 i posiada na C-końcu przedłużenie, którego brak w polipeptydzie bakteryjnym. Struktura pierwszorzędowa tego przedłużenia wykazuje duże podobieństwo do białek P1 i P2. Białko P0 podobnie jak P1 i P2 zawiera cha-

runkach, które powodują całkowite usunięcie L10 [33].

W centrum GTP-azowym bakterii występuje ponadto białko L11. Pomimo, że nie jest ono strukturalnym składnikiem „palca” to, podobnie jak L10, wiąże się w tym miejscu na rybosomie. Białko L11 jest położone u podstawy „palca” i jest składnikiem miejsca wiążącego czynniki elongacyjne [18, 19]. U *Eucaryota* funkcje te spełnia białko L12 (u drożdży określane wcześniej jako L15) [34]. Jego pokrewień-

Tabela 2.

Podobieństwo sekwencji karboksylowego końca białek P1, P2 i P0 u przedstawicieli różnych organizmów.

Organizm	Koniec karboksylowy*		
	P1	P2	P0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KEEEEAKEESDDDMGFGLFD	EKEEEAAEESDDDMGFGLFD	EAAAEEEEESDDDMGFGLFD
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	KEEAKEEESEDEDMGFGLFD	KEEAKEEESEDEDMGFGLFD	EAAAEEEESEDEDMGFGLFD
<i>Dictiostelium discoideum</i>	KKEEVKKEESDDDMGFGLFD	VVEEKKEESDDDMGMGLFD	EAAEEKKEESDDDMGFGLFD
<i>Trypanosoma crusi</i>	AAAKKEEEEDDDMGFGLFD	APAAAAEEEDDDMGFGLFD	AEPEEEDDDDDFGMGALF
<i>Rattus norvegicus</i>	EAKKEESESEEDDMGFGLFD	DEKKEESEESDDDMGFGLFD	VEAKEESESEDEDMGFGLFD
Homo sapiens	EAKKEESEESDDDMGFGLFD	DEKKEESEESDDDMGFGLFD	VEAKEESESEDEDMGFGLFD

* Pogrubioną czcionką zaznaczono konsensus sekwencji aminokwasowych. Sekwencje uzyskano z bazy danych SWISS-PROT (www.expasy.ch/sprot)

rakterystyczną dla tych białek konserwatywną sekwencję DMGFGLFD. Pod względem strukturalnym P0 przypomina białko L10 połączone z innym białkiem kwaśnym [15].

Przypuszcza się, że białka P0 i L10 pochodzą od tego samego prabiałka, które powstało na drodze fuzji dwóch genów: pierwotnego genu kodującego białko L10 i genu kodującego inne rybosomalne białko kwaśne. Występujące obecnie bakteryjne białko L10 utraciło koniec karboksylowy w wyniku odmiennych dróg ewolucji *Procaryota* i *Eucaryota*. Eukariotyczne P0 wykazuje większe pokrewieństwo filogenetyczne do białka archebakterii niż eubakterii [30, 32]. Podobieństwo domeny C-końcowej białka P0 do białek P1 i P2 tłumaczy fakt reakcji krzyżowej z przeciwciałami skierowanymi przeciwko P1 lub P2 [27-31]. Jednak różnice w sekwencjach tych regionów (Tab. 2) powodują, że np. u *T. crusi* białko P0 nie jest w pełni rozpoznawane przez przeciwciała skierowane przeciwko peptydowi DMGFGLFD, domeny karboksylowej P1/P2 [31].

Białko P0, podobnie jak L10, wiąże się bezpośrednio z rRNA w centrum GTP-azowym [27]. Siła wiązania jest dużo większa niż w rybosomie bakteryjnym, dlatego P0 pozostaje związane z 60S w wa-

stwo z L11 *Procaryota* przejawia się krzyżową reakcją przeciwciał przeciwko bakteryjnemu białku L11 i drożdżowemu L12 [20]. Poza tym białka te są najbardziej metylowanymi białkami rybosomalnymi [16]. Zarówno L12 jak i L11 są łatwo usuwane z powierzchni rybosomu przez ekstrakcję roztworem NH₄Cl/etanol [34], a w roztworach łączą się w kompleksy z białkami P [15].

W badaniach *in vitro* wykazano, że białka z obydwu systemów biologicznych, prokariotycznego i eukariotycznego, są wymiennymi składnikami rybosomu, tzn. może dochodzić do wymiany tych białek pomiędzy rybosomem a pulą cytoplazmatyczną [8, 15].

III. Struktura kompleksu P1/P2-P0

Białko P0 reaguje z P1 i P2 tworząc pentameryczny kompleks analogiczny do kompleksu bakteryjnego L10-L7/L12 [36], obecnego także u archebakterii [37]. Kompleks ten wyekstrahowano po raz pierwszy z trzustki psa [38] i komórek HeLa [25]. Technika reakcji krzyżowych (ang. *cross-linking*) stwierdzono, że rybosomalne białko P0 jest oflankowane przez homodimery białek P1 i P2 (Ryc. 1) [39]. Przypusz-

czalną pentameryczną budowę „palca” potwierdzono testem ELISA z zastosowaniem króliczych przeciwciał skierowanych przeciwko C-końcowemu peptydowi wspólnemu dla białek P0 i P1/P2 [19].

W układach bakteryjnych i archebakterii [15] kwaśne białka reagują z białkiem L10 poprzez domenę aminową. Badania interakcji białek P u *Eucaryota* przeprowadzono stosując jako materiał doświadczalny *S. cerevisiae*. Do komórek drożdży wprowadzono gen LacZ (kodujący β -galaktozydazę). Następnie różnej długości fragmenty czterech genów kodujących białka kwaśne połączono z genem reporterowym. Ekspresja polipeptydów kodowanych przez te konstrukty genowe zależała od aktywności β -galaktozydazy. Otrzymane w ten sposób produkty białkowe o długości co najmniej 50 N-końcowych aminokwasów po wprowadzeniu do komórki

III-1. Charakterystyka fenotypowa mutantów białek kwaśnych P1/P2

Żadne z wyżej wymienionych 4 białek kwaśnych występujących w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* nie jest elementem bezwzględnie koniecznym do aktywności rybosomu, a zatem do przeżycia i wzrostu komórki [15, 43, 44]. Odmienne jest u *Saccharomyces pombe*, gdzie jeden z genów kodujących rybosomalne białka kwaśne, P1 lub P2, jest prawdopodobnie niezbędny do przeżycia komórki [45, 46].

Białka kwaśne *S. cerevisiae* są kodowane przez pojedyncze i niezależne geny [20, 24, 47]. Rolę każdego z genów zbadano stosując metodę mutacji. Ich inaktywacja wpływa na aktywność rybosomów, a dokładnie, na ilość białek P pozostających na rybosomie oraz w całkowitych ekstraktach komórkowych

Tabela 3.

Sekwencje aminowego końca białek P1 i P2 u przedstawicieli różnych organizmów *Eukariota*.

Organizm	Koniec aminowy*	
	P1	P2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M-ST-ESAL—SYAALILADS	MKYLAAYLLLNAAGN-TPDA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M-S--DSII--SFAAFILADA	MKYLAAYLLLQGGNAAPSA
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	M-SA-SEL-ATSYSALILADE	MKYLAAYLLLTVGGKDSPSA
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	M-SA-SEL-ATSYSALILADE	MKYLAAYLLLTVGGKQSPSA
<i>Dictiostelium discoideum</i>	MSEIKTEEL-ACIYSGLLLQDD	MKYLAAYLLLTVGGKQSPSA
<i>Artemia salina</i>	MAS-K-DEL-ACIYAALILLDD	MRYVAAYLLAALSGNADPST
<i>Drosophila melanogaster</i>	MST-K-AEL-ASVYASLILVDD	MRYVAAYLLAVLGGKDSPAN
<i>Rattus norvegicus</i>	MASV-SEL-ACIYSALILHDD	MRYVASYLLAALGGNSNPSA
Homo sapiens	MASV-SEL-ACIYSALILHDD	MRYVASYLLAALGGNSSPSA

*Pogrubioną czcionką zaznaczono konsensus sekwencji aminokwasowych. Sekwencje uzyskano z bazy danych SWISS-PROT (www.expasy.ch/sprot)

więzały się do cząsteczki rybosomu. Wynik ten potwierdził, że rybosomowe białka kwaśne *Eucaryota*, tak jak *Procaryota*, wiążą się z rybosomem swoją domeną N-końcową, podczas gdy domena C-końcowa nie odgrywa istotnej roli w tym procesie [33].

Białka P1/P2, w przeciwieństwie do P0, można łatwo oddysocjować od rybosomu, co oznacza niższą stabilność kompleksu eukariotycznego niż prokariotycznego. Oprócz tego kompleks ten łatwiej ulega denaturacji niż jego bakteryjny odpowiednik [15]. Porównanie obrazów elektronowych dużej podjednostki rybosomowej obu systemów wykazało, że struktura „palca” w rybosomach 70S jest bardziej wyeksponowana [40] niż w 80S [41, 42].

a także na metabolizm komórkowy tj. na wzrost komórki. W większości przypadków, przy niezależnej inaktywacji pojedynczych genów, natężenie tych zmian jest niewielkie i zależy od rodzaju inaktywowanego genu. Mutacja genu P2A wywiera mały wpływ na szybkość wzrostu komórek mutantu, podczas gdy inaktywacja genu P1A zaburza funkcję rybosomu w większym stopniu, co objawia się wydłużeniem czasu generacji komórek o ok. 50%. Dlatego uważa się, że białko P1A odgrywa większą rolę w funkcjonowaniu rybosomu [15, 43, 44].

Badania szczepów, w których zinktywowano dwa geny, pochodzące z dwóch różnych grup białek kwaśnych tj. P1 i P2, sugerują jedynie nieznaczne

wydłużenie czasu generacji komórek w porównaniu z komórkami mutantów niosących pojedynczy inaktywowany gen. Jednakże mutanty syntetyzujące białka kwaśne należące tylko do jednej grupy (P1 lub P2) wykazują aż trzykrotne wydłużenie czasu generacji komórek w porównaniu z komórkami szczepu typu dzikiego. Rybosomy pochodzące z komórek mutantów nie zawierają żadnego białka kwaśnego; nawet tych, których geny były aktywne. Białka kodowane przez te geny występowały w stanie wolnym w cytoplazmie, czego dowodem była ich obecność w całkowitych ekstraktach komórkowych [15, 44, 45]. Obecność białek P w cytoplazmie, zwłaszcza w przypadku mutacji genów grupy P1, oznacza słabe oddziaływanie białek tylko jednego typu (P1 lub P2) z rybosomem. Pomimo obecności cytoplazmatycznej puli białek P nie obserwowano zjawiska zastępowania brakujących polipeptydów ani wzrostu ilości innych kwaśnych polipeptydów, co potwierdza ich specyficzność działania [15, 43-45]. Zatem warunkiem związania białek P z rybosomem jest utworzenie kompleksu zawierającego przynajmniej jedno białko kwaśne każdego typu, P1 i P2. Istniejące dwie formy każdego z nich, A i B, mogą tworzyć kompleks z którąkolwiek z form drugiego typu. Każda taka kombinacja funkcjonuje w drożdżach, ale niektóre z nich, np. P1A + P2B zapewniają wyższą efektywność syntezy białka [45].

Jedną z najbardziej zaskakujących obserwacji dotyczących mutacji genowych jest żywotność mutantów. Czas generacji komórek poczwórnego mutantu, jak również mutantów potrójnych, jest zbliżony do czasu generacji podwójnych mutantów, posiadających po dwa zinaaktywowane geny kodujące białka jednego typu. W tak zmutowanych szczepach obecność wolnych białek P nie zwiększa szybkości wzrostu komórek, a w niektórych przypadkach komórki syntetyzujące jedno białko P rosną wolniej niż komórki mutantu poczwórnego. Takie zjawisko obserwowano u jednego z mutantów potrójnych, u którego zmutowano geny kodujące białka P1A, P1B oraz P2B. Zatem głównym czynnikiem powodującym negatywny wpływ na wzrost komórek mutantów jest brak białek kwaśnych związanych z rybosomem. Rybosom taki w pewnym stopniu spełnia nadal swe funkcje, tj. bierze udział w procesie translacji [15, 44, 45, 47, 48]. Aktywność ekstraktów komórkowych poczwórnego mutantu dowodzi, że białka P1/P2, będące składnikami rybosomu nie są konieczne do jego aktywności i syntezy białka zarówno *in vivo* jak i *in vitro* [45, 47]. Rybosomy mutantów podwójnych i poczwórnych pozbawione białek P wykazują ok. 35% aktywności w procesie

polimeryzacji z użyciem syntetycznych i naturalnych mRNA. Aktywność tą stymuluje w znacznym stopniu dodanie egzogennych białek P [15, 44, 47].

Najbardziej widoczną fenotypową konsekwencją braku białek kwaśnych jest wrażliwość komórek mutantów na obniżoną temperaturę, co objawia się bardzo słabym wzrostem komórek w temperaturze 23°C, spowodowanym zmniejszoną szybkością syntezy białka. Brak dwu białek kwaśnych tej samej grupy (P1 lub P2) powoduje także zaburzenie zdolności do wykorzystywania niektórych źródeł węgla przez komórkę oraz do sporulacji w stanie diploidalnym. Wszystkie wymienione zmiany fenotypowe mogą być rezultatem zahamowania ekspresji któregoś z białek biorących udział w odpowiednich procesach. Zmiany te można odwrócić poprzez transformację zmutowanych komórek plazmidami niosącymi gen kodujący brakujące białko. Ekspresja tego genu pozwala na utworzenie kompleksu białek P1-P2, wiążącego się z rybosomem [15, 47].

Brak białek kwaśnych na rybosomach drożdży powoduje zaburzenie wydajności translacji, lecz nie zmienia wyraźnie dokładności odczytywania kodonów mRNA w warunkach *in vitro* oraz zdolności do supresji kodonów nonsensownych *in vivo* [15, 47].

Zmiany szybkości translacji różnych rodzajów mRNA powodują pojawienie się odmiennego zestawu syntetyzowanych białek, a w konsekwencji różny wpływ na określone szlaki metaboliczne [47].

W przypadku drożdżowych mutantów poczwórnych, potrójnych i wolno-rosnących mutantów podwójnych stwierdzono *in vivo* oraz *in vitro* znaczne zmniejszenie lub wręcz zahamowanie ekspresji wielu białek, które mogą brać udział w wyżej wymienionych procesach fizjologicznych. Jednocześnie inne białka ulegają specyficznej ekspresji tylko w komórkach zmutowanych, np. w komórkach mutantu poczwórnego wzrósł poziom białek szoku cieplnego zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Obecność tych białek jest charakterystyczna dla komórek w stacjonarnej fazie wzrostu. Dodanie egzogennych białek P1/P2 do komórek mutantów powodowało ekspresję białek typowych dla szczepu dzikiego [15, 47, 49].

III-2. Funkcje domen białka P0

Białko P0 jest podstawowym składnikiem kompleksu eukariotycznego „palca” rybosomalnego. Jego bakteryjnym odpowiednikiem jest białko L10. W komórkach drożdży białko to jest kodowane przez pojedynczy gen. Koniec karboksylowy P0 to odcinek podobny strukturalnie do białek P i prawdopodobnie uczestniczy on w procesie wiązania z tymi białkami

[45, 50]. Odcinek ten zawiera konserwatywną sekwencję aminokwasową DDDMGFGLFD. W rybosomach dzikich szczepów drożdży C-koniec P0 reaguje z dwoma dimerami białek P1 i P2. P0 jest niezbędne do aktywności rybosomu, a więc do przeżycia komórki, gdyż nie uzyskano ani haploidalnego, ani diploidalnego szczepu ze zmutowanym genem kodującym to białko. Warunkowo letalny mutant, posiadający gen kodujący P0 pod kontrolą promotora GAL1, nie rośnie na podłożu z glukozą [15, 45, 47, 51].

Usunięcie białka P0 powoduje zmniejszenie ilości aktywnych podjednostek 60S, co objawia się gwałtownym spadkiem ilości i wielkości polisomów, a także tworzeniem polisomów zawierających niepełne kompleksy inicjacyjne (ang. *halfmers*), obserwowane po przeniesieniu warunkowo letalnego mutantu P0 na podłoże z glukozą. W takich warunkach defektywne podjednostki 60S ulegają degradacji [15, 28, 47].

W wyniku kolejnych delecji regionu 3' genu kodującego białko P0 w warunkowo letalnym szczepie *S. cerevisiae* otrzymano serię mutantów syntetyzujących skrócone formy białka P0. Usunięcie końcowego 21-aminokwasowego peptydu zawierającego wspomnianą sekwencję konserwatywną nie powoduje znacznych zaburzeń w funkcjonowaniu P0 i tworzeniu kompleksu P0-(P1/P2) na rybosomie. Postępująca redukcja C-końcowego odcinka P0 w coraz większym stopniu zaburza stabilność kompleksu „palca” rybosomalnego, co powoduje utratę aktywności rybosomu objawiającą się obniżoną szybkością wzrostu komórek. Jeśli białka P są związane z rybosomem C-końcowa domena P0 nie jest niezbędna do aktywności rybosomu, jednak gdy białka P nie są związane z P0 domena ta jest konieczna do aktywności rybosomu i przeżycia komórki [15, 28, 33, 47].

Delecja 87 aminokwasów od strony C-końca P0 znacznie osłabia trwałość jego oddziaływania z P1 i P2. Usunięta sekwencja zawiera prawdopodobnie strukturę palców cynkowych obecną w kompleksie P0-(P1/P2), ważną w procesie wiązania P0 z P1 i P2 [18, 47]. Pomimo faktu, że ta środkowa część białka P0 stabilizuje oddziaływanie białek P1/P2 z rybosomem, nie jest ona konieczna do syntezy białka. W tym przypadku kompleks P0-(P1/P2) jest niestabilny, ale białka P1/P2 spełniają swoją funkcję, chociaż ze zmniejszoną wydajnością [45].

Delecja 132 aminokwasów reprezentujących cały wspomniany odcinek białka P0, odpowiadający N-końcowej domenie białek P, całkowicie hamuje aktywność P0. W tym przypadku białko P0 nie jest

zdolne do interakcji z białkami P1, P2 i do wiązania z rybosomem. Prawdopodobnie taki mutant białka P0 ulega degradacji, rybosomy tracą aktywność, a w konsekwencji komórki nie przeżywają w obecności glukozy. Zatem N-koniec opisanego odcinka białka P0, odpowiadającego strukturą białkom P1-P2, odgrywa kluczową rolę w oddziaływaniach pomiędzy białkami kwaśnymi oraz w tworzeniu struktury „palca” na rybosomie. Prawdopodobnie jest on też niezbędny do interakcji białka P0 z rRNA [45].

III-3. Rola białek kwaśnych w procesie translacji

W warunkach standardowych białka L7/L12 są niezbędne do aktywności rybosomów [16, 17]. Rybosomy pozbawione tych białek wykazują aktywność tylko w pewnych ściśle określonych warunkach [15, 17, 45, 52-54]. Wykazano, że kompleks L7/L12 spełnia ważną rolę w procesie syntezy białek. Przemawiają za tym następujące fakty:

1. Białka L7/L12 podczas translacji stymulują właściwości katalityczne czynnika translacyjnego IF-2.
2. Proces hydrolizy GTP zależnej od czynnika EF-G i EF-Tu zachodzi przy obecności minimum dwóch kopii L7/L12 na rybosomie [3].
3. Kompleks (L7/L12)₄L10 wraz z białkiem L11 oraz odpowiednim fragmentem 23S rRNA stanowi część miejsca warunkującego hydrolizę GTP na rybosomie [53,55].
4. „Rozpad” aparatu translacyjnego, po zakończeniu syntezy peptydu zachodzi pod wpływem czynników terminacyjnych, ale tylko w obecności białek L7/L12 na rybosomie [56, 57].

Białka L7/L12 biorą udział w kontroli dokładności translacji. Mutacje w genie *rplL* kodującym białko L12 okazały się bezpośrednią przyczyną zwiększonej ilości nieprawidłowo włączonych aminokwasów. Ponadto pozbawienie białek L7/L12 domeny C-końcowej powoduje całkowite zahamowanie syntezy białka [56, 57].

Eukariotyczne białka kwaśne biorą też udział w regulacji aktywności czynników elongacyjnych [5, 12, 15, 19, 28, 36, 45]. W związku z tym przypuszcza się, że białka te pełnią taką samą rolę, jak ich prokariotyczne odpowiedniki, białka L7/L12 [13, 15, 58]. Obecność białek kwaśnych na rybosomie wpływa zarówno pozytywnie jak i negatywnie na translację różnych rodzajów mRNA. Białka te stymulują aktywność rybosomu w procesie translacji, ale mogą też hamować translację określonych rodzajów mRNA, gdyż w zmutowanych szczepach pojawiają się nowe białka. Istnieją dowody świadczące o

pewnej roli podjednostek 60S w kontroli inicjacji translacji [59]. Brak białek kwaśnych na rybosomie może wywierać wpływ na funkcję podjednostki 60S poprzez uzależnienie jej działania od specyficznych cech strukturalnych niektórych rodzajów mRNA. Zaobserwowano bowiem, że rybosomy pozbawione białek P w mniejszym stopniu rozszczepiają dwuniciowe struktury mRNA, co powoduje zmniejszenie wydajności lub całkowite zahamowanie ich translacji [47].

Interesujący jest fakt, że w określonych warunkach metabolicznych wzrasta ilość rybosomów nie zawierających białek P. Pomiedzy ilością białek P1/P2 na rybosomie a aktywnością rybosomu istnieje ciekawa zależność. Częsteczki rybosomów, zarówno zaangażowane w translację (polisomy) jak też otrzymane z metabolicznie aktywnych komórek (logarytmiczna faza wzrostu), zawierają większą ilość białek kwaśnych [19]. Za ledwie połowę ilości komórkowych białek kwaśnych zawierają rybosomy drożdżowe w fazie stacjonarnej a zjawisko to dotyczy w równej mierze wszystkich białek P1 i P2 [19]. Rybosomy takie biorą udział w kontroli translacji typowej dla komórek z fazy stacjonarnej [15, 47].

IV. Potranslacyjne modyfikacje białek P

IV-1. Fosforylacja białkowych składników „palca”

Jedną z bardziej interesujących właściwości eukariotycznych białek kwaśnych P1/P2 jest ich fosforylacja [60].

Dotychczas nie stwierdzono fosforylacji białek kwaśnych *Procarvota in vivo*. Bakteryjne białka L7/L12 mogą być fosforylowane *in vitro* przez egzogenne kinazy białkowe [15, 61]. Fosforylację eukariotycznych białek kwaśnych podjednostki 60S po raz pierwszy zaobserwowano w retikulocytach królika i komórkach wątroby szczura [62, 63], a następnie potwierdzono u innych *Eucaryota* [60, 64]. Jedynym odnotowanym dotąd wyjątkiem jest *Tetrahymena pyriformis* [15]. Do dnia dzisiejszego szereg problemów związanych z fosforylacją pozostaje nadal niewyjaśniony. Wiadomo jednak, że procesy fosforylacji i defosforylacji są mechanizmami regulującymi powinowactwo białek do rybosomu, a przez to wpływają na jego aktywność oraz poziom translacji [19, 65]. Kwaśne białka rybosomowe ulegają reakcji fosforylacji zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. W cytoplazmie organizmów eukariotycznych zaobserwowano pulę zdefosforylowanych białek P1/P2. W czasie translacji u drożdży [64] oraz wątrobie szczura [66] zachodzi wymiana pomiędzy pulą

cytozolową a białkami obecnymi na rybosomie. Podobny proces wymiany białek kwaśnych zachodzi prawdopodobnie w komórkach roślinnych w warunkach stresu cieplnego [67]. Wydaje się także, iż proces fosforylacji determinuje w warunkach *in vitro* wiązanie białek kwaśnych do rybosomu [68]. Dotychczasowe badania wskazywały, że defosforylacja białek kwaśnych przez traktowanie ich fosfatazą alkaliczną *in vitro* znosi zdolność białek P do rekonstrukcji aktywnych rybosomów [35, 68]. Ostatnio uzyskane wyniki sugerują ponadto znaczenie fosforylacji tych białek w ich oddziaływaniu z czynnikami elongacyjnymi [69].

Przedstawione powyżej dane wskazują, że zarówno fosforylacja białek P jak i ilość tych komponent białkowych w cząstce rybosomu jest istotnym mechanizmem, który może regulować ilość aktywnych jednostek rybosomowych, a zarazem szybkość syntezy białka [70]. Tezę tę potwierdza fakt, że ilość białek kwaśnych na rybosomach drożdżowych izolowanych z logarytmicznej fazy wzrostu jest prawie dwukrotnie większa niż ta znaleziona na rybosomach izolowanych z komórek fazy stacjonarnej [19].

Oczywiście, w opisanym mechanizmie regulacji syntezy białka kluczową rolę muszą odgrywać enzymy odpowiedzialne za fosforylację i defosforylację białek P. Jak dotychczas nasza wiedza o kinazach specyficznych dla białek P jest niewielka i żadna jeśli chodzi o fosfatazy białkowe.

IV-2. Kinazy białkowe modyfikujące białka P

Z komórek *Saccharomyces cerevisiae* wyizolowano i scharakteryzowano pięć różnych niezależnych od cAMP kinaz białkowych fosforylujących kwaśne białka rybosomowe: kinazę białkową 60S (PK60S) [61], kinazy RAP I-III [58, 71] oraz kinazę kazeinową typu 2 (CK2) [72, 73]. Wszystkie kinazy reprezentują grupę enzymów niezależnych od cyklicznych nukleotydów, Ca^{2+} , kalmoduliny i fosfolipidów. PK60S i kinazy RAP są białkami monomerycznymi, fosforylującymi reszty serynowe przy udziale ATP jako donora reszt fosforanowych. CK2 ma strukturę oligomeryczną, modyfikuje reszty serynowe i treoninowe przy użyciu zarówno ATP jak i GTP. Aktywność CK2 jest hamowana przez niskie stężenia heparyny [74-80]. Enzymów tych używano do fosforylacji białek P z komórek *S. cerevisiae*. Wykazano wysoką specyficzność PK60S, która modyfikuje jedynie białka P1B/B' i P2A. Pozostałe fosfotransferazy modyfikują z podobną intensywnością wszystkie białka P [58, 81]. Seryna zlokalizowana na C-końcu drożdżowych białek P jest modyfikowana

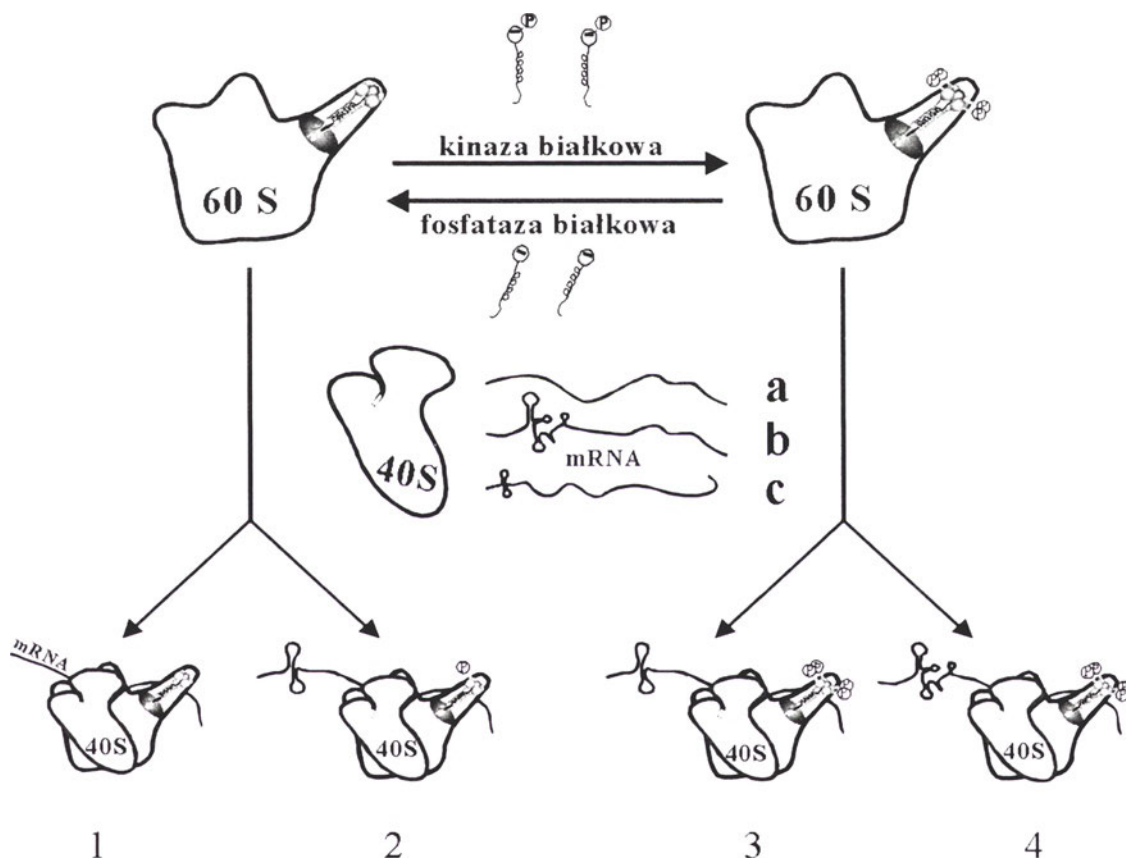
przez wszystkie wymienione kinazy białkowe [58, 82, 83].

Z kielków kukurydzy oczyszczono i scharakteryzowano kinazę modyfikującą kwaśne białka rybosomowe (ARP-K, ang. *acidic ribosomal protein kinase*). Enzym fosforyluje białko P2, jedno z dwóch białek kwaśnych rybosomu 80S tej rośliny [84]. Wybiórczość enzymu w stosunku do substratu potwierdza fakt występowania kinaz białkowych o wysokiej specyficzności. ARP-K jest monomerem białkowym o $M_r = 38$ kDa. Charakterystyka enzymatyczna tej kinazy jest podobna do opisywanych dla CK2. Enzym wykorzystuje ATP i GTP, a jego aktywność może być modulowana przez inhibitory i aktywatory typowe dla CK2. Oprócz białka P2 kinaza ARP-K fos-

talyczna tego enzymu wykazuje podobieństwo do mitogenicznie stymulowanej kinazy białka rybosomowego S6 oraz PKA i PKC. Równolegle z ekspresją genu *atpk1* obserwowano wysoką aktywność metaboliczną i proliferacyjną komórek.

IV-3. Metylacja

N-Terminalny region białka P1 jest bardzo podatny na degradację przez proteazy. Właściwość ta prawdopodobnie jest wynikiem metylacji reszty aminokwasowej (zazwyczaj seryny) poprzedzającej pierwszą metioninę N-końca polipeptydu. Prawidłowość tę przypisuje się tylko białkom P1 [21]. W ten sposób wyjaśniono pochodzenie białka L44'



Ryc. 3. Schemat proponowanej regulacji aktywności translacyjnej rybosomu 80S przez białka P1/P2. Rybosomy, których „palec” w zależności od stanu fizjologicznego komórki: jest całkowicie (1) lub częściowo pozbawiony białek P1/P2 (2), białka te są częściowo (3) lub w pełni ufosforylowane (4) w różny sposób oddziałują z elementami aparatu translacyjnego czego skutkiem jest translacja różnych mRNA (a-c). Zmiany struktury „palca” wynikające z różnej jego kompozycji białkowej a także zmian jego ładunku w wyniku fosforylacji/defosforylacji, zmieniają gamitur syntetyzowanych białek. Skutkiem tego może być ich wpływ na różne szlaki metaboliczne.

fosforyluje także kazeinę oraz w mniejszym stopniu histon.

Inną kinazą białkową fosforylującą białka P jest obserwowany u *Arabidopsis* enzym zwany Atpk1 [85]. Wynikiem ekspresji genu *atpk1* w komórkach owadów i roślin były dwie pary polipeptydów: jedna określona jako p70 (68 i 70 kDa) i druga p85 (82 i 85 kDa). Autorzy sugerują, że p70 to cytoplazmatyczna forma kinazy specyficznej dla białek P. Domena ka-

(YP1b'). Uważa się, że białko YP1b' jest produktem degradacji białka YP1β (Ax) pozbawionym pierwszych ośmiu N-końcowych aminokwasów (Tab. 1), powstającym podczas izolacji białka [21].

V. Uwagi końcowe

Eukariotyczny kompleks P0-P1/P2, czyli „palec” dużej podjednostki rybosomalnej, zawiera pięć

strukturalnie i funkcjonalnie podobnych C-końców (cztery pochodzące z dwu dimerów P1/P2, a jeden z białka P0). Tworzą one pentameryczną strukturę (P1)₂(P2)₂P0 analogiczną do bakteryjnej (L7/L12)₄L10 [51, 60, 70]. Aktywność rybosomów drożdżowych zależna jest od obecności przynajmniej jednej kopii konserwatywnego C-końcowego peptydu białek P silnie związanego z rybosomem. W przypadku braku białek P1/P2 (mutanta poczwórnego) strukturę tę zapewnia białko P0. Podobnie bakteryjne rybosomy całkowicie pozbawione analogicznej struktury są nieaktywne. Odcinek białka P0, odpowiadający strukturą białkom P1/P2, odgrywa kluczową rolę w oddziaływaniach pomiędzy białkami kwaśnymi i w tworzeniu struktury „palca” na rybosomie oraz w interakcji białka P0 z rRNA [28, 45]. Rybosom wykazuje optymalną aktywność dzięki równoczesnej obecności pięciu domen C-końcowych białek P, chociaż samo białko P0 może, do pewnego stopnia, warunkować jego działanie [47].

Fakt fosforylacji kwaśnych białek rybosomowych stwierdzono 20 lat temu, ale badania tego procesu posuwały się bardzo powoli. Powodem tego był mały zasób wiedzy na temat kinaz białkowych zaangażowanych w ten proces i mechanizmów ich regulacji, a także brak dramatycznych funkcjonalnych efektów fosforylacji białek P.

Kwaśne białka rybosomowe *Saccharomyces cerevisiae* są fosforylowane *in vitro* przez kinazy: PK60S, RAP I-III i CK2 z różną specyficznością. Podobnie jak u zwierząt modyfikacji w tych białkach ulega C-terminalna reszta serynowa [58, 82, 83, 86].

Zdefosforylowane białka P wyekstrahowane z rybosomu nie były zdolne do rekonstrukcji zależnej od EF2 aktywności rybosomu. Ta inaktywacja kwaśnych białek rybosomowych powoduje niezdolność zdefosforylowanych polipeptydów do związania się z rdzeniem rybosomowym [35,68]. Podobnie, zdefosforylowane białka P z wątroby szczura nie są zdolne do rekonstrukcji aktywnych rybosomów, odzyskując tą aktywność po fosforylacji *in vitro* [68]. Wpływ fosforylacji/defosforylacji na powinowactwo białek kwaśnych do rybosomu sugeruje, że modyfikacja ta jest kluczową w tym procesie (Ryc. 3). Uzyskane wyniki sugerują ponadto, że zmiany konformacji struktury „palca” poprzez wpływ na jego kompozycję lub przez zmianę jego ładunku w wyniku fosforylacji, zmienia powinowactwo rybosomu do różnych mRNA [47]. Zmiana garnituru syntetyzowanych białek wpływa na ekspresję różnych białek. Skutkiem tego może być ich wpływ na różne szlaki metaboliczne, wszędzie tam, gdzie relatywne

stężenie różnych komponent jest krytyczne dla ich przebiegu.

Jak dotąd nie stwierdzono, które z kinaz i fosfataz są odpowiedzialne w warunkach *in vivo*, za modyfikację tych białek. Enzymatyczny system fosforylacyjno/defosforylacyjny jest więc aspektem wymagającym dalszych badań, których celem jest uzyskanie klarownej odpowiedzi na temat mechanizmu działania maszyny syntetyzującej białko.

Artykuł otrzymano 23 września 1999 r.

Zaakceptowano do druku 30 grudnia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Stöffler-Meilike M, Stöffler G (1990) W: Hill WE, Dalhberg A, Garrett RB, More PB, Schelisinger D, Warner JR (red) *The ribosome: structure, function and evolution*, American Society for Microbiology, Washington DC, str. 123
2. Sobkiewicz A, Twardowski T (1998) *Post Biochem* 44: 55-63
3. Möller W, Maassen JA (1986) W: Hardesty B, Kramer G (red) *Structure, function, and genetics of ribosomes*. Springer-Verlag, New York, str. 309-325
4. Radermacher M, Wagenknecht T, Verschoor A, Frank J (1987) *EMBO J* 6: 1107-1113
5. van Agthoven AJ, Krick J, Amons R, Möller W (1978) *Eur J Biochem* 91: 553-556
6. Lavergne J-P, Conquet F, Reboud JP, Reboud A-M (1987) *FEBS Lett* 216: 83-88
7. van Agthoven AJ, Maassen JA, Möller W (1977) *Biochem Biophys Res Commun* 77: 989-998
8. Wool IG, Stöffler G (1974) W: Nomura M in. (red) *Ribosomes*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, str. 309-325
9. Möller W, Slobin LI, Amons R, Richter D (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10563-10567
10. Leijonmarck M, Liljas A (1987) *J Mol Biol* 195: 555-580
11. Bilgin N, Kirsebom LA, Ehrenberg M, Kurland CG (1988) *Biochimie* 70: 611-618
12. Mc Connell WP, Kaplan NO (1980) *J Biochem* 104: 5359-5366
13. Möller W (1991) *Biochimie* 73: 1093-1100
14. Tsurugi K (1993) *Biochem Arch* 9: 297-302
15. Ballesta JPG, Remacha M (1996) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 55: 157-193
16. Planta RJ, Mager WH (1998) *Yeast* 14: 471-477
17. Dabbs ER (1991) *Biochimie* 73: 639-645
18. Tsurugi K, Mitsui K (1991) *Biochem Biophys Res Commun* 174: 1318-1323
19. Saenz-Robles M T, Remacha M, Vilella M D, Zinker S, Ballesta JPG (1990) *Biochim Biophys Acta* 1050: 51-55
20. Remacha M, Saenz-Robles MT, Vilella MD, Ballesta JPG (1988) *J Biol Chem* 263: 9094-9101
21. Santos C, Ortiz-Reyes B, Narada T, Remacha M, Ballesta JPG (1993) *Biochemistry* 32: 4231-4236
22. Towbin G, Siegmund M, Gordon J (1982) *J Biol Chem* 257: 12709-12715
23. Wool IG, Chan YL, Glück A, Suzuki K (1991) *Biochimie* 73: 861-870
24. Newton CH, Shimmin LC, Yee J, Dennis PP (1990) *J Bacteriol* 172: 579-588
25. Rich BE, Steitz JA (1987) *Mol Cell Biol* 7: 4065-4074
26. Otaka E, Suzuki K, Hashimoto T (1990) *Protein Seq Data Anal* 3(1):11-19

27. Elkon K, Bonfa E, Llovet R, Danho W, Weissbach H, Brot N (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:5186-5189
28. Santos C, Ballesta JPG (1994) *J Biol Chem* **269**: 15689-15696
29. Fabien N, Moreira A, Lavergne JP, Desbos A, Surgey P, Alves de Olivera C, Gonzalo P, Venot A, Bienvenu J, Perrier H, Reboud JP, Monier JC (1999) *J Autoimmun* **13**:103-110
30. Shimmin LC, Ramirez G, Matheson AT, Dennis PP (1990) *J Mol Evol* **29**: 448-462
31. Shijman AG, Levitus G, Levin MJ (1992) *Immunol Lett* **33**: 15-20
32. Levin MJ, Kaplan D, Ferrari I, Arteman P, Vazquez M, Panebra A (1993) *FEMS Immunol Med Microbiol* **7**:205-210
33. Payo JM, Santana-Roman H, Remacha M, Ballesta JPG, Zinker S (1995) *Biochemistry* **34**: 7941-7948
34. Briones E, Briones C, Remacha M, Ballesta JPG (1998) *J Biol Chem* **273**: 31956-31961
35. Juan-Vidales F, Saenz-Robles MT, Ballesta JPG (1984) *Biochemistry* **23**: 390-396
36. Liljas A (1991) *Internat Rev Cytol* **124**: 103-136
37. Casiano C, Matheson AT, Traut RR (1990) *J Biol Chem* **265**: 18757-18763
38. Elkon KB, Skelly S, Parnassa A, Möller W, Danho W, Weissbach H, Brot N (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7419-7423
39. Uchiumi T, Wahba AJ, Traut RR (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5580-5584
40. Strycharz WA, Nomura M, Lake JA (1978) *J Mol Biol* **126**: 123-140
41. Montesano L, Glitz DG (1988) *J Biol Chem* **263**: 4932-4939
42. Verschoor A, Frank J (1990) *J Mol Biol* **214**: 737-743
43. Remacha M, Santos C, Ballesta JPG (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 2182-2190
44. Remacha M, Santos C, Bermejo B, Naranda T, Ballesta JPG (1992) *J Biol Chem* **267**: 12061-12067
45. Remacha M., Jimenez-Diaz A., Santos C., Briones E., Zambrano R., Rodriguez-Gabriel M.A., Guariones E., Ballesta J.P.G. (1995) *Biochem Cell Biol* **73**: 959-968
46. Beltrame M, Bianchi ME (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 2341-2348
47. Remacha M, Jimenez-Diaz A, Bermejo B, Rodriguez-Gabriel MA, Guarinos E, Ballesta JPG (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 4754-4762
48. Bermejo B, Remacha M, Ortiz-Reyes BL, Santos C, Ballesta JPG (1994) *J Biol Chem* **269**: 3968-3975
49. Fuge EK, Braun EL, Werner-Washburne M (1994) *J Bacteriol* **176**: 5802-5813
50. Shimmin LC, Newton CH, Ramirez C, Yee J, Downing WL, Louie A, Matheson AT, Dennis PP (1989) *Can J Microbiol* **35**:164-170
51. Santos C, Ballesta JPG (1994) *J Biol Chem* **269**: 15689-15696
52. Ballesta JPG, Vasquez D (1972) *FEBS Lett* **28**: 337-342
53. Kotelansky VE, Domagatsky SP, Gudkov AT, Spirin AS (1977) *FEBS Lett* **73**: 6-11
54. Glick BR (1977) *FEBS Lett* **73**: 1-5
55. Petterson I (1979) *Nucl Acid Res* **6**: 2637-2646
56. Bilgin N, Kirsebom LA, Ehrenberg M, Kurland CG (1988) *Biochimie* **70**: 611-618
57. Kirsebom LA, Amons R, Isaksson LA (1986) *Eur J Biochem* **156**: 669-675
58. Rodriguez-Gabriel MA, Bou G, Briones E, Zambrano R, Remacha M, Ballesta JPG (1999) *Folia Microbiol* **44**: 153-163
59. Sachs AB, Davis RW (1989) *Cell* **58**: 857-867
60. Bielka H (1982) *The Eucariotic ribosome*, New York
61. Pilecki M, Grankowski N, Jacobs J, Gąsior E (1992) *Eur J Biochem* **206**: 259-267
62. Kabat D (1970) *Biochemistry* **9**: 4160-4174
63. Loeb JE, Blat C (1970) *FEBS Lett* **10**: 105-108
64. Zinker S, Warner JR (1976) *J Biol Chem* **251**: 1799-1807
65. Remacha M, Jimenez-Diaz A, Santos C, Briones E, Zambrano R, Rodriguez Gabriel MA, Guariones E, Ballesta JPG (1995) *Biochem Cell Biol* **73**: 959-968
66. Tsurugi K, Ogata K (1985) *J Biochem* **98**: 1427-1431
67. Scharf K-D, Nover L (1987) *Biochim Biophys Acta* **909**: 44-57
68. MacConnell WP, Kaplan NO (1982) *J Biol Chem* **257**: 5359-5366
69. Vard C, Guillot D, Bargas P, Lavergne JP, Reboud JP (1997) *J Biol Chem* **272**: 20259-20262
70. Ballesta JPG, Remacha M, Naranda T, Santos C, Bermejo B, Jimenez-Diaz A, Ortiz-Reyes B (1993) W: Brown AJP, Tuite MF, McCarthy JEG (red) *Protein synthesis and Targeting in Yeast*, tom H 71, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 67-80
71. Szyszka R, Bou G, Ballesta JPG (1995) *Biochim Biophys Acta* **1293**: 213-221
72. Kudlicki W, Grankowski N, Gąsior E (1976) *Mol Biol Rep* **3**: 121-129
73. Kudlicki W, Grankowski N, Gąsior E (1978) *Eur J Biochem* **84**: 493-498
74. Glover CVC (1998) *Progr in Nucl Acid Res* **59**: 95-133
75. Pinna LA (1990) *Biochim Biophys Acta* **1054**: 267-284
76. Tuzon PT, Traugh JA (1991) *Adv in Second Mess and Phosphoprot Res* **23**: 123-164
77. Allende JE, Allende CC (1995) *FASEB J* **9**: 313-323
78. Issinger O-G (1993) *Pharmacol Ther* **59**: 1-30
79. Meggio F, Grankowski N, Kudlicki W, Szyszka R, Gąsior E, Pinna LA (1986) *Eur J Biochem* **159**: 31-38
80. Szyszka R (1999) *Folia Microbiol* **44**: 142-152
81. Szyszka R, Boguszewska A, Grankowski N, Ballesta JPG (1995) *Acta Biochim Polon* **42**: 357-362
82. Boguszewska A, Szyszka R, Grankowski N (1997) *Acta Biochim Polon* **44**: 191-200
83. Zambrano R, Briones E, Remacha M, Ballesta JPG (1997) *Biochemistry* **36**: 14439-14446
84. Sepuvelde E, Aguilar R, Sanchez de Jimenez E (1995) *Physiol Plant* **94**: 715-721
85. Zhang S-H, Broome MA, Lawton MA, Hunter T, Lamb CJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 17593-17599
86. Hasler P, Brot N, Weissbach H, Parnassa AP, Elkon KB (1991) *J Biol Chem* **266**: 13815-13820

Polimorfizm enzymów detoksykacyjnych

Polymorphism in detoxifying enzymes

RENATA JASKUŁA-SZTUL*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Transferazy glutationowe [EC 2.5.1.18]
 - II-1. Inaktywacja kancerogenów przez GST
 - II-2. Struktura i klasyfikacja GST
 - II-3. Polimorficzne formy GST
- III. N-acetylotransferazy [EC 2.3.1.5]
 - III-1. Katalityczna rola NAT
 - III-2. Molekularne podstawy polimorfizmu acetylacji
- IV. Mikrosomalna hydrolaza epoksydowa [EC 3.3.2.3]
 - IV-1. Formy molekularne mEH
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: acetylo-CoA — acetylokoenzym A; GST — transferaza glutationowa; EPHX1 — gen mikrosomalnej hydrolazy epoksydowej; mEH — mikrosomalna hydrolaza epoksydowa; NAT — N-acetylotransferaza; ST — sulfotransferaza; UDP-GL — urydynodifosforoglukuronylotransferaza.

I. Wstęp

Współczesny człowiek jest narażony w życiu codziennym na działanie wielu czynników środowiskowych, z których część, poza bezpośrednim wpływem toksycznym w określonych warunkach ma zdolność indukowania nowotworów. Dane epidemiologiczne wskazują, że 70-90 % wszystkich przypadków chorób nowotworowych jest uwarunkowane środowiskowo, na co składa się styl życia (palenie tytoniu i sposób odżywiania), bezpośrednia ekspozycja w miejscu pracy oraz ekspozycja wynikająca ze skażenia środowiska. Barierą biologiczną zmniejszającą efekt rakotwórczy czynników egzogennych są enzymy metabolizujące kancerogeny. Większość enzymów biorących udział w biotransformacji cechuje polimorfizm, czego konsekwencją jest to, iż osoby wykazujące wysoką aktywność enzymów aktywujących kancerogeny (enzymy I fazy) oraz brak lub

Contents:

- I. Introduction
- II. Glutathione transferases [EC 2.5.1.18]
 - II-1. Inactivation of carcinogens by GST
 - II-2. Structure and classification GST
 - II-3. Polimorphic forms of GST
- III. N-acetylotransferases [EC 2.3.1.5]
 - III-1. Catalytic properties of NAT
 - III-2. Molecular basis of acetylation polymorphism
- IV. Microsomal epoxide hydrolase [EC 3.3.2.3]
 - IV-1. Molecular forms of mEH
- V. Summary

niską aktywność enzymów detoksykujących (enzymy II fazy) cechują się zwiększonym ryzykiem zapadalności na nowotwory związane z ekspozycją na kancerogeny środowiskowe. Dzięki genetycznemu różnicowaniu aktywności oraz ekspresji genów kodujących enzymy metabolizujące kancerogeny, osoby podobnie ekspozowane wykazują osobniczo zmienną wrażliwość na egzogenne czynniki chemiczne [1, 2]. Tak rozumiana zmienność osobnicza mieści się w kategoriach polimorfizmu genetycznego populacji ludzkiej.

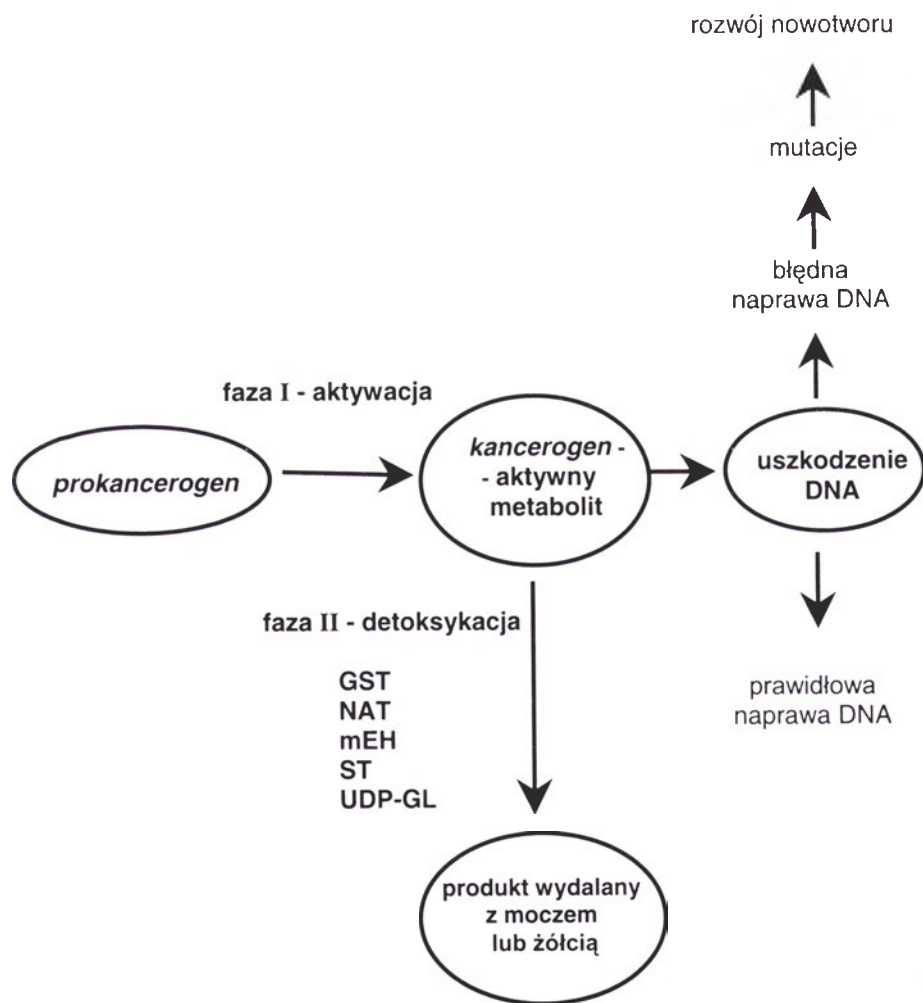
Podczas aktywacji metabolicznej wyspecjalizowane układy enzymatyczne (przede wszystkim enzymy cytochromu P-450, patrz artykuł K. Kobylńskiej w *Postęпах Biochemii* [3]) przeprowadzają reakcje w kierunku lepiej rozpuszczalnych i łatwiej wydalanych z ustroju, a jednocześnie wysoce reaktywnych kancerogenów posiadających w cząsteczce takie grupy funkcyjne jak: hydroksylowa, aminowa, karboksylowa czy epoksydowa. Przykładowo, aminy są metabolizowane do hydroksyloamina wielocykliczne węglowodory aromatyczne do pochodnych epoksydowych. Tak zaktywowane metabolity mogą tworzyć addukty z nukleofilowymi grupami DNA, RNA i białek komórkowych. Konsekwencjami biologicznymi obecności adduktów w tych cząsteczkach mogą być: zahamowanie lub obniżenie szybkości replikacji DNA, niewłaściwe parowanie zasad podczas replikacji oraz generacja miejsc apurynowych zwiększających labilność cząsteczki DNA.

*Dr biochemii; Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32

Addukty, które nie zostaną odpowiednio szybko usunięte (jeśli replikacja DNA jest szybsza od naprawy) prowadzą do mutacji w łańcuchu DNA (w tym aktywacji protoonkogenów i inaktywacji genów supresorowych), które mogą inicjować proces kancerogenezy [4, 5]. Jednakże reakcje aktywowanych kancerogenów z DNA są torem pobocznym ciągu reakcji aktywacji/detoksykacji, których głównym zadaniem jest usunięcie substancji obcych z organizmu.

Komórka posiada również wiele mechanizmów enzymatycznych wyspecjalizowanych w dezaktywowaniu elektrofilowych metabolitów, a tym samym w zmniejszaniu ich efektu rakotwórczego. Większość aktywowanych kancerogenów, do których w wyniku

dalane z ustroju z moczem lub żółcią, a przede wszystkim są nieaktywne biologicznie (w przeciwieństwie do silnie hydrofobowych kancerogenów kumulujących się w tkance tłuszczowej) [6]. Dzięki temu reakcje sprzęgania można uważać za rzeczywiste procesy detoksykacji. Z kolei ilość reaktywnych metabolitów dostępnych dla nukleofilowych makromolekuł komórki reprezentuje równowagę pomiędzy reakcjami aktywacji i detoksykacji. Działanie nowotworowe prokancerogenów jest więc wypadkową obu faz metabolizmu. Główne grupy enzymów odpowiedzialnych za metabolizm kancerogenów oraz schemat ich biotransformacji zostały przedstawione na rycinie 1.



Ryc. 1. Szlak metabolizmu kancerogenów. Pełne nazwy enzymów znajdują się w wykazie skrótów.

szeregu reakcji I fazy zostały wprowadzone lub odsłonięte grupy funkcyjne stają się dogodnymi substratami dla enzymów detoksykacyjnych komórki. Do tej grupy należą enzymy, które katalizują reakcje metylacji lub sprzęgania ze związkami endogennymi: kwasem glukuronowym, siarkowym, octowym, glutationem lub pewnymi aminokwasami. Produkty sprzęgania zwykle jako pochodne kwasów organicznych są dobrze rozpuszczalne w wodzie, łatwo wy-

Enzymy II fazy metabolizmu stanowią heterogenną grupę, do której J a k o b y i Z i e g l e r [7] zaliczyli ponad 20 odrębnych grup enzymów detoksykacyjnych. Oprócz takich cech wspólnych jak zdolność usuwania aktywnych grup funkcyjnych kancerogenów i powinowactwo do związków lipofilowych, enzymy te charakteryzują się szeroką i nakładającą się specyficznością substratową oraz nierównomierną dystrybucją w tkankach i narządach

najbardziej narażonych na kontakt z kancerogenami. Organem wyspecjalizowanym w procesach detoksyzacji jest wątroba.

Spośród grupy enzymów II fazy metabolizmu substancji rakotwórczych najważniejszymi z punktu widzenia kancerogenezy wydają się być enzymy polimorficzne w populacji ludzkiej, wykazujące międzyosobnicze różnicowanie aktywności i o potencjalnym związku z rozwojem chorób nowotworowych.

II. Transferazy glutationowe [EC 2.5.1.18]

Transferazy glutationowe stanowią rodzinę enzymów, których funkcja detoksykacyjna polega przede wszystkim na katalitycznym sprzęganiu endogennego glutationu (trójpeptyd γ -glutamylcysteinylglicynowy) z elektrofilowymi metabolitami związków egzogennych [8]. Enzymy te uważane są za jeden z ważniejszych systemów obrony przed kancerogennym działaniem substancji chemicznych [9-11] bowiem inaktywują między innymi pochodne epoksydowe, aflatoksyny, α, β — nienasycone aldehydy i ketony oraz aromatyczne i alifatyczne chlorki. Izoenzymy GST są również odpowiedzialne za biosyntezę fizjologicznie aktywnych związków endogennych takich jak leukotrieny C_4 , prostaglandyny E_2 oraz wiązanie hydrofobowych składników, jakimi są hormony sterydowe [12].

Transferazy glutationowe są enzymami powszechnie występującymi w świecie żywych organizmów. Posiada je większość tlenowych mikroorganizmów, wszystkie badane dotąd zwierzęta i rośliny. Najwyższe stężenia tych enzymów wykazuje wątroba ssaków i odpowiednio stanowią one 5% i ponad 10% zawartości wszystkich białek cytoplazmatycznych wątroby człowieka i szczura [8].

II-1. Inaktywacja kancerogenów przez GST

Inaktywacja związków kancerogennych, zachodząca dzięki właściwościom katalitycznym tych enzymów prowadzi do powstania dobrze rozpuszczalnych w wodzie kwasów merkapturowych wydalanych z moczem. Pierwszym etapem tworzenia tych związków jest enzymatyczne przeniesienie przez transferazy glutationowe aktywnej grupy kancerogenu (zawierającej elektrofilowy atom węgla, azotu lub siarki) na nukleofilową grupę tiolową zredukowanego glutationu w cytoplazmie. Takie koniugaty glutationu usuwane są aktywnie z komórek i ulegają dalszym przekształceniom na drodze enzymatycznej hydrolizy. Odłączone zostają kolejno reszty: γ -gluta-

mylowa przez glutationazę, a następnie glicylowa przez transpeptydazę, powstający zaś w wyniku tych reakcji koniugat cysteinowy ulega N-acetylacji. Produktem takich przemian jest kwas premerkapturowy, który w słabo kwaśnym środowisku samorzutnie przekształca się do odpowiedniego kwasu merkapturowego wydalanego z moczem [13].

Oprócz właściwości katalitycznych transferazy glutationowe spełniają rolę białek transportowych biorąc udział w przenoszeniu wielu lipofilnych ligandów w tym np. kancerogennych metabolitów benzo(a)pirenu takich jak: 3-hydroksy-benzo(a)-piren, i dwuhydrodiolę w pozycjach 4,5-, 7,8-, 9,10-. Ten sposób wychwytywania cząsteczek elektrofilowych i lipofilnych umożliwia ich transport w obrębie komórki i wydalanie na zewnątrz [14]. Ligandami transferaz glutationowych są również niektóre leki metabolizowane przez wątrobę i substancje endogenne jak bilirubina, toksyczny metabolit hemu [15].

Poza grupą substratów dla GST, istnieje również duża grupa związków, które mogą wiązać się kowalencyjnie z GST. Takie reakcje skutecznie wiążą kancerogeny (np. metabolity dwumetyloaminoazobenzenu i 3-metylocholanotrenu), prowadząc jednak do nieodwracalnej inaktywacji enzymu [16].

II-2. Struktura i klasyfikacja GST

Wyizolowane z komórek ssaków cytoplazmatyczne transferazy glutationowe są dimerami, a mikrosomalne trimerami o ciężarze podjednostek odpowiednio 25 kD i 17 kD. Każda podjednostka składa się z dwóch domen, których miejsca aktywne spełniają różne funkcje. Domena I odpowiada za polarną interakcję (w tzw. miejscu G) pomiędzy glutationem i enzymem, a domena II wiąże elektrofilowy substrat (w tzw. miejscu H). Porównanie pierwszorzędowych struktur izoenzymów transferaz glutationowych wskazuje, że domena II charakteryzuje się większą zmiennością sekwencji, co prawdopodobnie związane jest z różnymi właściwościami katalitycznymi w/w izoenzymów [17].

W obrębie danej klasy enzymy mogą występować zarówno w formie homo jak i heterodimerów. Nie obserwowano jak dotąd heterodimerów zbudowanych z podjednostek różnych klas [18].

Występowanie wielu form transferaz glutationowych po raz pierwszy zanotowali Boyland i Chasseaud [19]. Badając rolę tego enzymu w tworzeniu kwasów merkapturowych potwierdzili istnienie izoenzymów o różnej specyficzności substratowej. Dalsze próby w kierunku klasyfikacji transfe-

raz glutationowych poczynił H a b i g i wsp. [20], którzy oznaczyli rozdzielone i oczyszczone przez siebie transferazy homogenatu wątroby szczura kolejnymi literami alfabetu w zależności od kolejności eluowania podczas chromatografii kolumnowej na CM-celulozie. Oznaczone kolejno transferazy A, B, C, D, E wykazywały również szeroką i nakładającą się specyficzność substratową, różniły się właściwościami immunochemicznymi i aktywnościami katalitycznymi. Dalsze kryteria podziału rodziny transferaz glutationowych takie jak: homologia sekwencji aminokwasów, lokalizacja na chromosomie, punkt izoelektryczny oraz specyficzność tkankowa doprowadziły do wyodrębnienia czterech klas form cytoplazmatycznych: α (GST A), μ (GST M), π (GST P) i θ (GST T) oraz formy mikrosomalnej (MIC1) ostatecznie porządkując ich nomenklaturę i klasyfikację [21].

W obrębie wszystkich klas form cytoplazmatycznych znanych jest po kilka form izoenzymatycznych. Loci genowe transferaz glutationowych (w tym polimorficzne) oraz ich lokalizację na chromosomach przedstawia rycina 2.

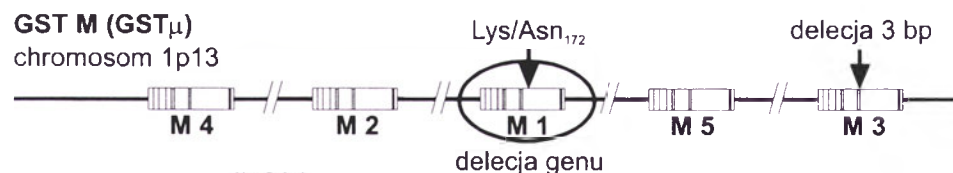
GST A (GST α)

chromosom 6p12



GST M (GST μ)

chromosom 1p13



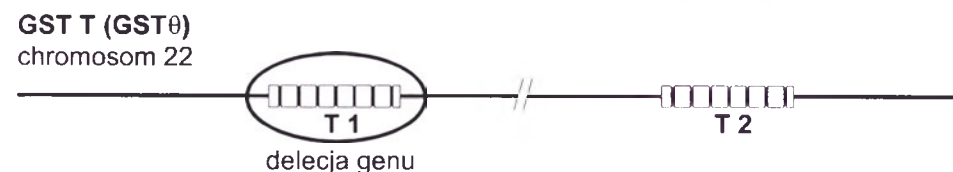
GST P (GST π)

chromosom 11q13



GST T (GST θ)

chromosom 22



Ryc. 2. Loci genowe transferaz glutationowych i ich lokalizacja na chromosomach.

W grupie form cytoplazmatycznych GST, homologia sekwencji aminokwasów w tej samej klasie wynosi ponad 50% (zwykle ponad 75%), a pomiędzy klasami 25-30% niezależnie od gatunku ssaka. Mikrosomalne GST nie wykazują strukturalnego podobieństwa do żadnej z form cytoplazmatycznych. Wyniki M a n n e r v i k a i wsp. [22] wskazują, że różnice pomiędzy cytoplazmatycznymi klasami GST u jednego gatunku ssaka są większe niż różnice pomiędzy izoenzymami z tej samej klasy różnych gatunków.

Tak więc klasy GST prawdopodobnie rozeszły się i wyspecjalizowały przed ewolucją większości gatunków ssaków. Podobieństwo struktury pierwszorzędowej transferaz glutationowych należących do jednej klasy wyjaśnia, dlaczego przeciwciiała poliklonalne często wykazują reakcje krzyżowe z izoenzymami tej samej klasy i nie reagują krzyżowo z formami należącymi do innych klas. Różnice we właściwościach immunochemicznych izoenzymów GST, szczególnie widoczne przy zastosowaniu przeciwciiała monoklonalnych umożliwiają ocenę fenotypu GST i jednocześnie określenie stopnia ryzyka zachorowania na nowotwór związany np. z brakiem konkretnego izoenzymu [23].

K a m i s a k a i wsp. [24] po raz pierwszy wykazali, że cytoplazmatyczne GST charakteryzują się odmiennymi punktami izoelektrycznymi. Doświadczenia lat późniejszych [25-27] pozwoliły podzielić transferazy glutationowe na cztery klasy wykazujące najczęściej różne punkty izoelektryczne: zasadowe izoenzymy klasy α (pI = 8.5-10.5), prawie obojętne izoenzymy klasy μ (pI = 6.2-7.3) i kwaśne izoenzymy klasy π i θ (pI = 4.5-5.0).

U zwierząt laboratoryjnych (myszy i szczurów) nie stosuje się podobnej klasyfikacji, ponieważ punkty izoelektryczne GST mieszczą się w zakresie zasadowym [22].

Transferazy glutationowe człowieka oprócz tego, iż wykazują specyficzność tkankową różnią się także dystrybucją w tkankach płodowych i tkankach ludzi dorosłych, a ponadto wykazują zróżnicowanie międzyosobnicze. Charakterystyczny dla każdej tkanki skład izoenzymów GST oraz aktywność katalityczna

mogą zmieniać się w rozwoju osobniczym i być modulowane przez szereg czynników endogennych (hormony, interferon) i egzogennych (kancerogeny i specyficzne induktory). Biorąc pod uwagę również specyficzność substratową izoenzymów GST przypuszcza się, iż ilościowe i jakościowe różnice w ich dystrybucji są ważne dla wrażliwości tkanki na kancerogeny. Dane doświadczalne wskazują, iż część izoenzymów GST ulega ekspresji już we wczesnym życiu płodowym, a sprzężanie z glutationem jest często pierwszym etapem inaktywacji reaktywnych związków przechodzących przez łożysko.

Wiele doświadczeń potwierdziło ekspresję izoenzymów klasy π w większości badanych narządów ludzkich: płucu, pęcherzu moczowym, okrężnicy, w tkankach jąder i prostaty, erytrocytach i limfocytach krwi obwodowej [28, 29]. Wykazano, iż izoenzymy π stanowią główną część (90%) wszystkich transferaz glutationowych płuca [30] oraz niewielką część tych transferaz w wątrobie i nadnerczach osób dorosłych [30, 31]. Ta sama grupa izoenzymów wykazuje jednak najwyższą aktywność w wątrobie płodowej. Kilka zasadowych form GST wyizolowano z frakcji cytozolicznej wątroby osób dorosłych, których z kolei nie znaleziono w wątrobie płodowej. Izoenzymy klasy α nie wykazują również ekspresji w płucach, mózgu, erytrocytach i łożysku na żadnym etapie rozwoju [32]. Izoenzymy klasy μ są grupą najpowszechniej ulegającą ekspresji. Ich obecność potwierdzono w wątrobie, mózgu, płucach, sercu, śledzionie, nerkach, mięśniach szkieletowych, żołądku, śluzówce jelit i limfocytach, jednak brak w płodowej wątrobie i nadnerczach [31, 33]. Z kolei dla klasy θ potwierdzono ekspresję w wątrobie i erytrocytach [34, 35].

II-3. Polimorficzne formy GST

W obrębie klasy μ dotychczas znaleziono pięć genów ulegających ekspresji w tkankach człowieka i oznaczanych odpowiednio *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* i *GSTM5* [36]. Geny te zlokalizowano na chromosomie 1p13 [37], a polimorfizm potwierdzono tylko dla dwóch z nich: *GSTM1* i *GSTM3*.

Pierwsze badania polimorfizmu *GSTM1* wskazały, że gen ten ulega ekspresji w wątrobie tylko u około połowy badanej populacji [32]. Późniejsze analizy molekularne genu *GSTM1* w kierunku specyficznego substratu (tlenku *trans*-stylbenu) potwierdziły całkowitą delecję tego genu wielkości 5400 par zasad skupionych w 8 eksonach i 7 intronach [37-40]. Tak więc homozygotyczna delecja *GSTM1* (obu alleli) oznaczana jako GST M1 (-), jest

równoznaczna z brakiem aktywnego białka enzymatycznego kodowanego przez ten gen. Ekspresja *GSTM1* jest cechą dominującą dziedziczną autosomalnie [41]. Badania fenotypowe jak i genotypowe tego ciekawego polimorfizmu wykazały znaczne zróżnicowanie częstości genotypu GST M1(-) w różnych populacjach światowych. Przykładowo, w populacji kaukaskiej ok. 50% osób posiada delecję obu alleli tego genu potwierdzoną brakiem aktywności enzymatycznej GST M1 [38]. Z kolei wśród czarnych Amerykanów genotyp GST M1(-) wykazuje 35% tej populacji [42], a wśród Tajów 62% osób [43]. Zjawisko delecji całego genu *GSTM1* najczęściej tłumaczone jest konwersją między genami o dużej homologii oraz leżącymi blisko siebie. Wysoka homologia sekwencji nukleotydów — 99% (poza jedną substytucją i jedną insercją) pomiędzy genami *GSTM1* i *GSTM2* oraz sprzężenie między nimi (*GSTM1* znajduje się po stronie 3' *GSTM2*) sugerują, iż wysoka częstość zdefektowanych genotypów GST M1 wynika z przesunięcia pozycji koniugujących chromosomów i nierównego crossing-over pomiędzy dwoma loci [36]. Kolejny polimorfizm genu *GSTM1* wynika z obecności dwóch alleli GST M1A i GST M1B różniących się tylko jedną zasadą w eksonie siódmym (C-T). Tranzycja ta zamienia lizynę na asparaginę w pozycji 172 kodonu [37, 44]. Wiele doświadczeń potwierdza, iż poza różnicą migracji w polu elektrycznym izoenzymów GST M1A i GST M1B ich właściwości katalityczne są zbliżone [37, 45].

Innym genem klasy μ wykazującym polimorfizm jest gen *GSTM3*, dla którego zidentyfikowano dwa allele: GST M3A i GST M3B. Analiza sekwencji tego genu pokazała, iż mutacja allele GST M3B jest trójnukleotydową delecją sekwencji palindromowej (powtórzenia CT poprzedzone powtórzeniami GA). Interesujące było odkrycie, iż mutacja ta generuje sekwencję 5'-AAGATA-3', która jest z kolei rozpoznawana przez negatywny czynnik transkrypcyjny YY1 redukujący ekspresję genu. Jest to z kolei związane z obniżoną aktywnością izoenzymu GST M3 [46]. Wykazano, że ta występująca w wielu innych genach sekwencja (np. w protoonkogenie *c-myc*) reguluje ich ekspresję poprzez czynnik YY1 [47]. Różnice ekspresji i aktywności form polimorficznych *GSTM3* znaleziono w płucach i mózgu [48, 49]. Jedyna wykonana dotychczas analiza częstości genotypów dotyczy populacji brytyjskiej i wykazuje, że homozygoty GST M3 A stanowią 70,9 %, heterozygoty GST M3 A/B — 25,8 % i homozygoty GST M3 B — 3,4 % [50].

Klasa transferaz glutationowych θ (GST T) jest najmłodsza klasą, w której zidentyfikowano dwa

geny oznaczane *GST T1* oraz *GST T2* oba na chromosomie 22 [51, 52]. Jednak tylko *GST T1* wykazuje polimorfizm, a jest on związany z delecją genu, podobnie jak *GST M1* klasy μ [35]. Komplementarne DNA (cDNA) genu *GST T1* składa się z 1002 par zasad zawierających region kodujący wielkości 720 par zasad i region nie kodujący końca 3' wielkości 282 par zasad [35]. Sekwencje introbowe do tej pory nie zostały poznane. Genotyp delecyjny *GST T1* (-) związany jest z niską aktywnością lub jej brakiem w stosunku do specyficznych substratów jakimi są monohalometanowce (np. chlorek metylu) i tlenek etylenu [51, 53]. Częstość zdefektowanego *GST T1* waha się od 38 % w populacji niemieckiej [35] do 10% w populacji szwedzkiej [53].

W klasie π transferaz glutationowych (*GST P*) znaleziono dotychczas tylko jeden gen oznaczany jako *GST P1* i zlokalizowany na chromosomie 11q13 [54]. Z kolei nieaktywny transkrypcyjnie pseudogen (*GST P1 P*) znajduje się na chromosomie 12 [21]. Komplementarne DNA tego locus zawiera 630 nukleotydów kodujących 210 aminokwasów [54, 55]. Jedyny gen tej klasy wykazuje polimorfizm wynikający z trzycy A-C, C-T i C-T odpowiednio w nukleotydach 313, 341 i 555. Trzycy te zmieniają kodon 104 z ATC (izoleucyna) na GTC (walina) i kodon 113 z GCG (alanina) na GTG (walina). Substytucja nukleotydu 555 jest mutacją neutralną, która nie zmienia aminokwasu (pozostaje seryna), a mutacja nukleotydu 341 jest zawsze sprzężona z mutacją nukleotydu 313 [55].

Na podstawie takiego wzoru mutacji lub ich braku dla locus *GST P1* wyróżniono trzy allele: *GST P1 A* (brak mutacji), *GST P1 B* (mutacja nukleotydu 313) oraz *GST P1 C* (mutacja nukleotydu 313 i 341). Oba zmienione aminokwasy znajdują się w miejscu aktywnym enzymu o wysokim powinowactwie do substancji elektrofilowych. Stwierdzono, iż tak zmienione białko (Ile-Val i/lub Ile-Val i Ala-Val) ma czterokrotnie obniżoną aktywność katalityczną, co wiąże się z fenotypem wolnej koniugacji w porównaniu z formą nie zmutowaną. Posiadanie jednak przynajmniej jednego allele *GST P1 A* warunkuje fenotyp szybkiej koniugacji [30].

III. N-acetylotransferazy [EC 2.3.1.5]

Funkcją detoksykacyjną N-acetylotransferaz jest katalizowanie reakcji N-acetylacji, która polega na przeniesieniu grupy acetylowej z acetylokoenzymu A na odpowiednią substancję obcą. Jest to najczęstsza reakcja sprzęgania amin

aromatycznych, hydrazydów, a także niektórych amin alifatycznych.

N-acetylacja jest więc w organizmie głównym szlakiem metabolizmu wielu substancji egzogennej: niektórych produktów naturalnych takich jak kofeina, półproduktów syntetycznych (benzydyna, β -naftyloamina), składników dymu tytoniowego (4-aminobifenyl i β -naftyloamina) oraz innych środowiskowych zanieczyszczeń (2-aminofluoren), produktów pirolizy żywności (aminy heterocykliczne) i powszechnie używanych leków (izoniazyd, sulfome-tazy-na, prokainamid).

Intensywne badania aktywności N-acetylotransferaz rozpoczęły się w latach 50-tych tego stulecia, kiedy to wynaleziono lek przeciwgruźliczy — izoniazyd metabolizowany przez te enzymy. Wtedy też zaobserwowano różnice międzypersoniczne we wrażliwości na lek (neuropatie kończyn), będące skutkiem zróżnicowanej szybkości jego usuwania w postaci N-acetyloizoniazidu. Badania rodzin udowodniły, iż fenotyp taki wynika z polimorfizmu pojedynczego autosomalnego genu, a szybka eliminacja leku jest cechą dominującą.

N-acetylotransferazy, podobnie jak transferazy glutationowe należą do enzymów powszechnie występujących w przyrodzie. Znaleziono je u bakterii *Sallmonella typhimurium* [56] oraz u wszystkich badanych dotąd kręgowców [57]. Enzymy te są monomerami o masie cząsteczkowej ok. 33-34 kD i stanowią mniej niż 1/20 000 ciężaru wszystkich białek cytoplazmatycznych [8].

III-1. Katalityczna rola NAT

Funkcje katalityczne N-acetylotransferaz scharakteryzowano po raz pierwszy na podstawie zależności od acetylokoenzymu A N-acetylacji amin aromatycznych (Ryc. 3a) [58]. Kolejne doświadczenia sugerowały, iż te same lub podobne enzymy przeprowadzają zależną od acetylokoenzymu A O-acetylację hydroksyloamin (Ryc. 3b) oraz niezależne od acetylokoenzymu A przeniesienie grupy acetylowej (Ryc. 3c).

Generalnie, N-acetylacja amin aromatycznych przekształca je w mniej aktywne amidy aromatyczne. Jednakże utlenianie amidów w kierunku związków bardziej reaktywnych jest trudne energetycznie [59]. Alternatywnie aminy aromatyczne mogą ulegać utlenianiu a powstałe hydroksylaminy poprzez reakcje O-acetylacji są przekształcane dalej do reaktywnych pochodnych tworzących addukty z DNA [60]. Tak więc sam proces acetylacji dla organizmu może być korzystny lub szkodliwy.

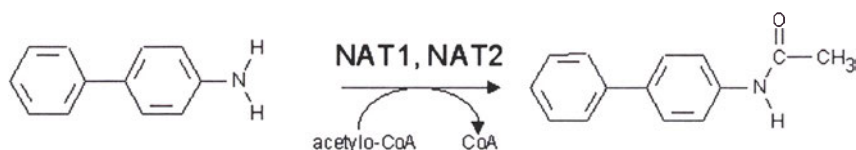
III-2. Molekularne podstawy polimorfizmu acetylacji

Geny kodujące N-acetylotransferazy człowieka zlokalizowane są na ramieniu krótkim chromosomu 8 (8p21.3-23.1) i zawierają 3 loci: dwa funkcjonalne i niezależnie regulowane geny oznaczane *NAT1* i *NAT2* oraz pseudogen *NATP* [61, 62]. Każdy z funkcjonalnych genów składa się z bezintronowego segmentu kodującego wielkości 870 par zasad. Odległość między tymi regionami wynosi ponad 25 tys. par zasad. Badania z użyciem ukierunkowanej mutagenazy ustaliły, że cysteina w pozycji 68 łańcucha aminokwasowego obu enzymów bezpośrednio bierze udział w przeniesieniu grupy

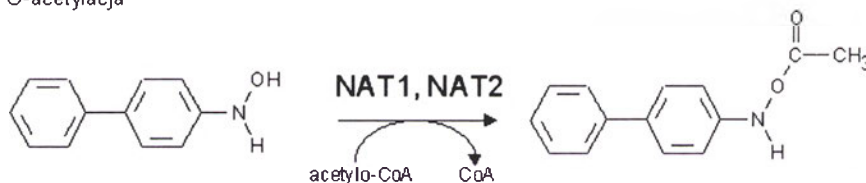
Międzyosobnicze różnice w szybkości acetylacji przy udziale enzymów *NAT1* i *NAT2* doprowadziły do analizy molekularnych uwarunkowań takiego polimorfizmu.

Na podstawie wzoru mutacji punktowych *NAT2* wyróżniono cztery allele, w tym jeden warunkujący szybką acetylację oraz trzy allele warunkujące wolno acetylujący fenotyp [43, 66, 70, 71]. W genie tym znaleziono sześć różnych mutacji, z których cztery tranzycje prowadzą do zmiany aminokwasu: C-T w pozycji 481 (Thr w Ile), G-A w pozycji 590 (Arg w Gly), A-G w pozycji 803 (Lys w Arg) i G-A w pozycji 857 (Gly w Glu). Z danych doświadczalnych wynika, że mutacje te znacznie obniżają aktywność katalityczną enzymu [68]. Pozostałe dwie mutacje

a) N-acetylacja



b) O-acetylacja



c) N,O-acetylacja



Ryc. 3. Funkcje katalityczne N-acetylotransferaz: a) zależna od acetylokoenzymu A N-acetylacja amin aromatycznych, b) zależna od acetylokoenzymu A O-acetylacja hydroksyloamin, c) niezależna od acetylokoenzymu A przeniesienie grupy acetylowej

acetylowej [63]. Mimo, iż klonowanie oraz sekwencjonowanie tych genów wskazało 81% homologię sekwencji aminokwasów, to różnica 55 aminokwasów (19 %) warunkuje odmienną, choć nakładającą się specyficzność substratową i różną stabilność enzymów [64]. Takie substraty jak kwas *p*-aminobenzoesowy i kwas *p*-aminosalicylowy są specyficzne dla enzymu *NAT1*, a izoniazyd (hydrazyna) oraz sulfametazyna (amina aromatyczna) dla enzymu *NAT2* [57]. Z kolei takie kancerogenne aminy aromatyczne jak 2-aminofluoren i benzydyna podlegają N-acetylacji katalizowanej przez oba enzymy [61].

Ekspresję enzymu *NAT1* potwierdzono przede wszystkim w wątrobie i limfocytach [65], a *NAT2* w wątrobie [66], pęcherzu moczowym [67], jelitach [68], przełyku, płucach i prostaty [69].

punktowe C-T w pozycji 282 i T-C w pozycji 341 są mutacjami neutralnymi i nie zmieniają kodowania aminokwasu [72]. Wzór sprzężeń mutacji locus *NAT2* jaki przedstawia tabela 1 ustalono dla ponad tysiąca osób różnych subpopulacji kaukaskich [72-75]. Ponadto dalsze analizy sekwencji tego genu wskazują na istnienie kolejnych mutacji punktowych, których konsekwencje fenotypowe nie są jeszcze ustalone [65]. Częstość fenotypów wolno acetylujących w różnych populacjach światowych waha się od 5% wśród kanadyjskich Eskimosów, przez 10% u Japończyków i 50-60% w subpopulacjach kaukaskich do 90% w populacjach arabskich [43, 66, 76].

Z kolei doświadczenia związane z porównaniem genotypu z fenotypem ustaliły korelację między nimi wynoszącą 93,3%, przy czym osoby o fenotypie

szybko acetylującym posiadały przynajmniej jeden allel nie zmutowany (100% korelacji genotypu z fenotypem szybko acetylującym) [43].

Badania na poziomie molekularnym wyjaśniły również podstawę fenotypowego polimorfizmu NAT1. Enzym ten do niedawna był charakteryzowany jako forma monomorficzna [77]. Na podstawie wzoru mutacji (3 mutacje punktowe i 9 nukleotydo-wa delecja w regionie 3' nie ulegającym translacji, który obejmuje również sygnał poliadenylacji) scharakteryzowano cztery allele: NAT1*4 (forma nie zmutowana), NAT1*3, NAT1*10 i NAT1*11. Fen-

Tabela 1.

Wzór sprzężeń mutacji genu NAT2.

Allel	Nukleotydy w pozycji:					
	282	341	481	590	803	857
*4	C	T	C	G	A	G
*5B	C	C	T	G	G	G
*6A	T	T	C	A	A	G
*7B	T	T	C	G	A	A

typ szybkiej acetylacji warunkuje tylko jeden allel NAT1*10, w którym mutacja punktowa kreuje zmieniony sygnał poliadenylacji. Prawdopodobnie nowy sygnał poliadenylacji (warunkujący dłuższą sekwencję poli[A]) obecny tylko w allelu NAT1*10 zwiększa stabilność transkryptu i przez to wpływa na aktywność tego izoenzymu. Badania populacji brytyjskiej pokazały, iż 29 % osób posiada co najmniej jeden allel NAT1*10 związany z szybką acetylacją [68].

IV. Mikrosomalna hydrolaza epoksydowa [EC 3.3.2.3]

Mikrosomalna hydrolaza epoksydowa (mEH) jest jedną z czterech hydrolaz epoksydowych (mikrosomalna, cholesterolu, cytoplazmatyczna i leukotrienu A₄) różniących się właściwościami immunochemicznymi, ciężarem cząsteczkowym i specyficznością substratową. Produkt białkowy jednego genu mikrosomalnej hydrolazy epoksydowej (*EPHX1*) katalizuje hydratację cyklicznych i alifatycznych epoksydów (produktów niektórych cytochromów P450) w kierunku mniej reaktywnych i polarnych *trans*-dihydrodioli. W wyniku takiego enzymatycznego uwodnienia mogą powstawać metabolity pod-

legające reakcjom koniugacji i wydaleni z organizmu [78]. Z drugiej jednak strony dalsza epoksydacja grupy diolowej może przekształcać związek w kancerogeny diol-epoksyd [8].

Mikrosomalną hydrolazę epoksydową zidentyfikowano u wielu kręgowców, a podobieństwo sekwencji aminokwasów u człowieka, królika i szczura oszacowano na 75-83% [79]. Oprócz wątroby i mózgu, gdzie znaleziono najwyższe aktywności mEH [80] obecność tego enzymu potwierdzono w nadnerczach [81], limfocytach i mononuklearnych leukocytach [82] oraz płucach [78]. Wysoki stopień struktu-

ralnego podobieństwa mEH między odmiennymi gatunkami ssaków w powiązaniu z ekspresją w wielu tkankach wskazuje na ważną funkcjonalną rolę tego enzymu.

Specyficzność substratowa mEH jest bardzo szeroka poczynając od najprostszycch związków alifatycznych takich jak tlenek oktenu aż do wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych np. różnych epoksydów benzo(a)pirenu.

IV-1. Formy molekularne mEH

W przeciwieństwie do wielogenowych rodzin transferaz glutationowych lub enzymów związanych z cytochromem P450, mikrosomalna hydrolaza epoksydowa jest kodowana przez jeden gen *EPHX1* zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 1 [79]. Międzyosobnicze zróżnicowanie aktywności tego enzymu [83, 84] sugerowało zmienność na poziomie molekularnym. Sekwencjonowanie oraz klonowanie *EPHX1* wskazało, iż gen ten koduje 455 aminokwasów a zmiennością charakteryzują się tylko dwa kodony. Wynikiem pierwszej substytucji T-A jest zastąpienie tyrozyny przez histydyne w pozycji 113 łańcucha aminokwasowego w eksonie 3, a drugiej substytucji A-G zastąpienie histydyny przez ar-

gininę w kodonie 139 w eksonie 4. Obie mutacje wpływają na zmianę ilości immunoreaktywnego białka, jego stabilność oraz aktywność enzymatyczną. Ekspresja *in vitro* konstruktów z histydyną w pozycji 113 wskazywała spadek aktywności o 39% a z arginina w pozycji 139 wzrost aktywności mEH o 25% w porównaniu z białkiem pozbawionym mutacji. Z kolei pośredni poziom aktywności (spadek o 13%) obserwowano, gdy komplementarne DNA zawierało obie mutacje: T-A i A-G. Doświadczenia z użyciem specyficznych dla mEH przeciwciał poliklonalnych wskazały podobnie, spadek, wzrost i niewielki spadek specyficzności odpowiednio dla form enzymatycznych z histydyną w pozycji 113, arginina w pozycji 139 oraz arginina i histydyną w tych pozycjach jednocześnie. Bezpośrednie określenie wzoru ekspresji *in vivo* jest jednak maskowane diploidalną ekspresją alleli mEH, co z kolei utrudnia ocenę wpływu poszczególnych mutacji na aktywność enzymu poza stanem haploidalnym. Dalsze analizy oparte na populacyjnych badaniach zmienności sekwencji aminokwasowej sugerują występowanie czterech alleli: Tyr¹¹³/His¹³⁹, His¹¹³/Arg¹³⁹, Tyr¹¹³/Arg¹³⁹, His¹¹³/His¹³⁹ [84].

V. Podsumowanie

Detoksykacyjna rola transferaz glutationowych, N-acetylotransferaz i mikrosomalnej hydrolazy epoksydowej w metabolizmie ksenobiotyków, a w tym kancerogenów, polega przede wszystkim na przeprowadzeniu reaktywnych metabolitów w formy nieaktywne biologicznie, dobrze rozpuszczalne w wodzie i łatwo wydalane z ustroju. Enzymy te kodowane są przez kilka wielogenowych rodzin, a te z kolei podlegają odmiennej regulacji poprzez czynniki endo i egzogenne. Tak więc ocena polimorfizmu i równocześnie defektu tylko jednego z opisanych genów kodujących enzymy detoksykacyjne wydaje się być nie wystarczająca, aby ustalić stopień ryzyka zachorowania na nowotwór. Dopiero badania wielu genów należących do obu faz metabolizmu kancerogenów środowiskowych: aktywacji i detoksykacji czyli ustalenie genotypów ryzyka w połączeniu z badaniami poziomu adduktów DNA i uszkodzeń cytogenetycznych pozwolą na identyfikację osób szczególnie podatnych na rozwój choroby nowotworowej.

*Artykuł otrzymano 13 września 1999 r.
Zaakceptowano do druku 3 stycznia 2000 r.*

Piśmiennictwo

- Harris CC (1991) *Cancer Res* (supl.) **51**: 5023-5044
- Pelkonen O (1992) *Scand J Work Environ Health* **18** (supl.): 17-21
- Kobylińska K (1994) *Postępy Biochemii* **40**: 248-252
- Harris CC, Weston A, Willey JC, Trivers GE, Mann DL (1987) *Environ Health Perspect* **75**: 109-119
- McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames B (1975) *Proc Nat Acad Sci USA* **72**: 5135-5139
- Jakoby WB (1978) *Adv Enzymol RAMB* **46**: 383-414
- Jakoby WB, Ziegler DM (1990) *J Biol Chem* **265**: 20715-20718
- Joseph PD, Mannervik B, De Montellano PO (1997) W: *Molecular Toxicology*, Oxford University Press, str. 152-194
- Pickett CB, Lu AYH (1989) *Ann Rev Biochem* **58**: 743-764
- Armstrong RN (1991) *Chem Res Toxicol* **4**: 131-140
- Smith G, Stanley LA, Sim E, Strange RC, Wolf CR (1995) *Cancer Surv* **25**: 27-65
- Taylor JB, Oliver J, Sherrington R, Pemble SE (1991) *Biochem J* **274**: 587-593
- Singer B, Grunberger D (1993) W: *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum Press, New York, str 47-52
- Listovsky I, Abramovitz M, Homma H, Niitsu Y (1998) *Drug Metabol Rev* **4**: 305-318
- Litwack G, Ketterer B, Arias IM (1971) *Nature* **234**: 466-467
- Smith GJ, Ohl VS, Litwack G (1977) *Cancer Res* **37**: 8-14
- Rushmore TH, Pickett CB (1993) *J Biol Chem* **268**: 11475-11478
- Ji X, Pinghui Z, Armstrong RN, Gilliland GL (1992) *Biochemistry* **31**: 10169-10184.
- Boylard E, Chasseaud LF (1969) *Adv Enzymol RAMB* **32**: 172-219
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) *J Biol Chem* **249**: 7130-7139
- Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Dillio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, Pearson WR, Pickett CB, Sato K, Widersten M, Wolf R (1992) *Biochem J* **282**: 305-308
- Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, Jornvall H (1985) *Proc Nat Acad Sci USA* **82**: 7202-7206
- Zhong S, Howie AF, Ketterer B, Taylor J, Hayes JD, Beckett GJ, Wathen CG, Wolf CR, Spurr NK (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1553-1537
- Kamisaka K, Habig WH, Ketley JN, Arias IM, Jacoby WB (1975) *Eur J Biochem* **60**: 153-161
- Guthenberg C, Mannervik B (1981) *Biochim Biophys Acta* **661**: 255-260
- Harada S, Abai M, Tanaka N, Agarwal DP, Goede HW (1987) *Hum Genet* **75**: 322-325
- Suzuki T, Coggan M, Shaw DC, Board P (1987) *Ann Hum Genet* **51**: 95-106
- Koskelo K, Valmet E, Tenhuen R (1981) *Scand J Clin Lab Inv* **41**: 683-689
- Kano T, Sakai M, Muramatsu M (1987) *Cancer Res* **47**: 5626-5630
- Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GCW, Wolf CR (1997) *Carcinogenesis* **118**: 641-644
- Mannervik B, Guthenberg C, Jensson H, Warholm M, Alin P (1983) W: Larsson A (red) *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects*, Raven Press, New York, str 92-103
- Warholm M, Guthenberg C, Mannervik B, Pacifici GM, Rene A (1981) *Acta Chem Scand* **B35**: 225-227
- Howie AF, Bell D, Hayes PC, Hayes JD, Beckett GJ (1990) *Carcinogenesis* **11**: 295-300
- Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B (1991) *Biochem J* **274**: 409-414

35. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) *Biochem J* **300**: 271-276
36. Pearson WR, Vorachek WR, Xu S, Berger R, Hart I, Vannais D, Patterson D (1993) *Am J Hum Genet* **53**: 220-233
37. Zhong S, Wyllie AM, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK (1993) *Carcinogenesis* **14**: 1821-1824
38. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WL (1988) *Proc Nat Acad Sci USA* **85**: 7293-7297
39. Comstock KE, Sanderson BJS, Claflin G, Henner WD (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 3670
40. Taylor JB, Oliver J, Sherrington R, Pemble SE (1991) *Biochem J* **274**: 587-593
41. Seidegard J, Pero RW (1985) *Hum Genet* **69**: 66-68
42. Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, Kadlubar FF, Lucier GW (1993) *Carcinogenesis* **14**: 1689-1692
43. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW (1993) *J Nat Cancer I* **85**: 1159-1164
44. Fryer AA, Zhao L, Aldersea J, Pearson WR, Strange RC (1993) *Biochem J* **295**: 313-315
45. Widersten M, Pearson WR, Engström A, Mannevik B (1991) *Biochem J* **276**: 519-524
46. Inskip A, Elexperu-Camiruaga J, Buxton N, Dias PS, MacIntosh J, Campbell D, Jones PW, Yengi L, Talbot JA, Strange RC, Fryer AA (1995) *Biochem J* **312**: 713-716
47. Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T (1991) *Cell* **67**: 377-388
48. Campbell E, Takahashi Y, Abramovitz M, Peretz M, Listowsky I (1990) *J Biol Chem* **265**: 9188-9193
49. Strange RC, Fryer AA, Matharoo B, Zhao L, Broome J, Campbell D, Jones P, Cervello-Pastor I, Singh R (1992) *Biochim Biophys Acta* **1139**: 222-228
50. Yengi L, Inskip A, Gilford J, Aldersea J, Bailely L, Smith A, Lear JT, Heagerty AH, Bowers B, Hand P, Hayes JD, Jones PW, Strange RC, Fryer AA (1996) *Cancer Res* **56**: 1974-1977
51. Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B (1991) *Biochem J* **274**: 409-414
52. Hussey AJ, Hayes JD (1992) *Biochem J* **286**: 929-935
53. Warholm M, Rene A, Alexandrie AK, Gemma M, Rannug A (1995) *Pharmacogenetics* **5**: 252-254
54. Moscow JA, Townsend AJ, Goldsmith ME, Whang-Peng J, Vickers PJ, Poisson R, Le-gault-Poisson S, Myers CE, Cowan KH (1988) *Proc Nat Acad Sci USA* **85**: 6518-6522
55. Ali-Osman F, Akende O, Antoun G, Mao O, Bulamwini J (1997) *J Biol Chem* **272**: 10004-10012
56. Watanabe M, Nohmi T, Ishidate MJr (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **147**: 974-979
57. Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret JM, Price-Evans DA, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer UA, Relling MV, Sim E, Suzuki T, Yasushi Y (1995) *Pharmacogenetics* **5**: 1-17
58. Miller EC, Miller JA, Hartmann HA (1961) *Cancer Res* **21**: 815-831
59. Guengerich FP, MacDonald TL (1992) W: Mariano PS (red) *Advances in electron transfer chemistry*, JAI Press, Greenwich CT, str 116-127
60. Guengerich FP (1992) *Pharmacol Therapeut* **54**: 17-61
61. Grant DM, Blum M, Beer M, Meyer UA (1991) *Mol Pharmacol* **39**: 184-189
62. Hickman D, Risch A, Buckle V (1994) *Biochem J* **297**: 441-445
63. Dupret JM, Grant DM (1991) *J Biol Chem* **267**: 7381-7385
64. Dupret JM, Goodfellow GH, Janezic SA, Grant DM (1994) *J Biol Chem* **269**: 26830-26835
65. Lang NP (1997) *Envir Health Perspect* **105**: 763-766
66. Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T (1990) *J Biol Chem* **265**: 12757-12760
67. Risch A, Wallace DMA, Bathers S, Sim E (1995) *Hum Mol Genet* **4**: 231-236
68. Bell DA, Badawi AF, Lang NP, Ilett KF, Kadlubar FF, Hirvonen A (1995) *Cancer Res* **55**: 5226-5229
69. Hein DW, Rustan TD, Doll MA, Bucher KD, Ferguson R, Feng Y, Furman EJ, Gray K (1992) *Toxicol Lett* **64/65**: 123-130
70. Blum M, Grant DM, McBride W (1990) *DNA Cell Biol* **9**: 193-203
71. Vatsis KP, Martell KJ, Weber WW (1991) *Proc Nat Acad Sci USA* **88**: 6333-6337
72. Cascorbi I, Drakoulis N, Brokmöller J, Maurer A, Sperling K, Roots I (1995) *Am J Hum Genet* **57**: 581-592
73. Hickman D, Sim E (1991) *Biochem Pharmacol* **42**: 1007-1014
74. Hein DW, Rustan TD, Ferguson RJ, Doll MA, Gray K (1994) *Arch Toxicol* **68**: 129-133
75. Brockmöller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I (1996) *Cancer Res* **56**: 3915-3925
76. Puga A, Nebert DW, McKinnon RA, Menon AG (1997) *Crit Rev Toxicol* **27**: 199-222
77. Vatsis KP, Weber WW (1993) *Arch Biochem Biophys* **301**: 71-76
78. Seidegard J, Ekström G (1997) *Envir Health Perspect* **105**: 791-799
79. Skoda RC, DeMierre A, McBride O, Gonzalez FJ, Meyer UA (1988) *J Biol Chem* **263**: 1549-1554
80. Gherzi-Egea JF, Perrin R, Leininger-Muller B, Grassiot MC, Jeandel C, Floquet J, Cuny G, Siest G (1993) *Biochem Pharmacol* **45**: 647-658
81. Papadopoulos D, Jornvall H, Rydstrom J, De-Pierre JW (1994) *Biochim Biophys Acta* **1206**: 253-262
82. Seidegard J, DePierre JW, Pero RW (1984) *Cancer Res* **44**: 3654-3660
83. Mertes I, Fleischmann R, Glatt HR, Oesch F (1985) *Carcinogenesis* **6**: 219-223
84. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski C (1994) *Hum Mol Genet* **3**: 421-428

Receptory sprzężone z białkami G (GPCR), metody badań oddziaływań ligand-receptor

G Protein-coupled receptors (GPCR), ligand-receptor interactions studies

MAREK JASIONOWSKI¹ ZBIGNIEW GRZONKA²
LESZEK ŁANKIEWICZ³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Receptory sprzężone z białkami G (GPCR)
 - II-1. Struktura GPCR
 - II-2. Miejsce wiązania liganda w receptorach
 - II-3. Regulacja funkcji receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR)
- III. Białka G — typy, mechanizm działania i efekторы
- IV. Eksperymentalne metody badania receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR)
- V. Badania oddziaływań ligand-receptor na przykładzie PACAP
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AC — cyklaza adenylanowa, α AR — receptor α -adrenergiczny, β AR — receptor β -adrenergiczny, BP — benzofenon, cAMP — cykliczny adenozymonofosforan, cGMP — cykliczny guanozymonofosforan, DAG — diacyloglicerol, GC — cyklaza guanylanowa, GDP — guanozynodifosforan, GIP — peptyd inhibujący gastrynę, GLP-1 — peptyd glukagonopodobny 1, GnRH — hormon uwalniający gonadotropinę, GPCR — receptory sprzężone z białkami G, GRKs — kinazy receptorów sprzężonych z białkami G, GTP — guanozynotrifosforan, IP₃ — inozyto-1,4,5-trifosforan, mGluR — metabotropowy receptor glutaminianergiczny, PACAP — przysadkowy peptyd aktywujący cyklazę adenylanową, PKA — kinaza białkowa A, PKC — kinaza białkowa C, PTH — parathormon, TM — transmembrana, TRH — hormon uwalniający tyreotropinę, VIP — naczyniowo-aktywny peptyd jelitowy.

I. Wstęp

Przekazywanie sygnałów ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki, poprzez błonę komórkową, odbywa się za pomocą oddziaływań

Contents:

- I. Introduction
- II. G Protein coupled receptors (GPCR)
 - II-1. Structure of GPCR
 - II-2. Ligand binding-site of the receptors
 - II-3. Regulatory mechanism in GPCR
- III. G Proteins — types, signal transduction and effectors
- IV. Experimental studies of GPCR
- V. Ligand-receptor interactions studies in PACAP
- VI. Summary

cząsteczek niosących sygnał z ich specyficznymi receptorami błonowymi. Opierając się na strukturalnych i funkcjonalnych kryteriach receptory błonowe można podzielić na trzy duże klasy: receptory jonotropowe, receptory o endogennej aktywności enzymatycznej oraz receptory metabotropowe [1].

Ostatnie z nich — receptory metabotropowe — sprzężone z białkami G (*GPCR* — *G Protein Coupled Receptors*) tworzą najliczniejszą rodzinę receptorów błonowych. Receptory należące do tej klasy oddziałują z różnorodnymi neurotransmiterami i neuropeptydami, począwszy od małych biogennych amin, takich jak adrenalina i histamina, poprzez peptydy (na przykład substancja P czy bradykinina), aż do dużych hormonów glikoproteinowych, takich jak na przykład hormon luteinizujący. Stwierdzono, że około 80% znanych hormonów i neurotransmiterów uruchamia przekazywanie sygnałów poprzez aktywację tej grupy receptorów [2]. Droga przekazu sygnału dla rodziny GPCR jest zapoczątkowana przyłączeniem agonisty do jego specyficznego receptora błonowego. Interakcja ta powoduje zmianę konformacji receptora, co pozwala na oddziaływanie z heterotrimerycznym białkiem G po stronie wewnątrzkomórkowej i utworzenie kompleksu ago-

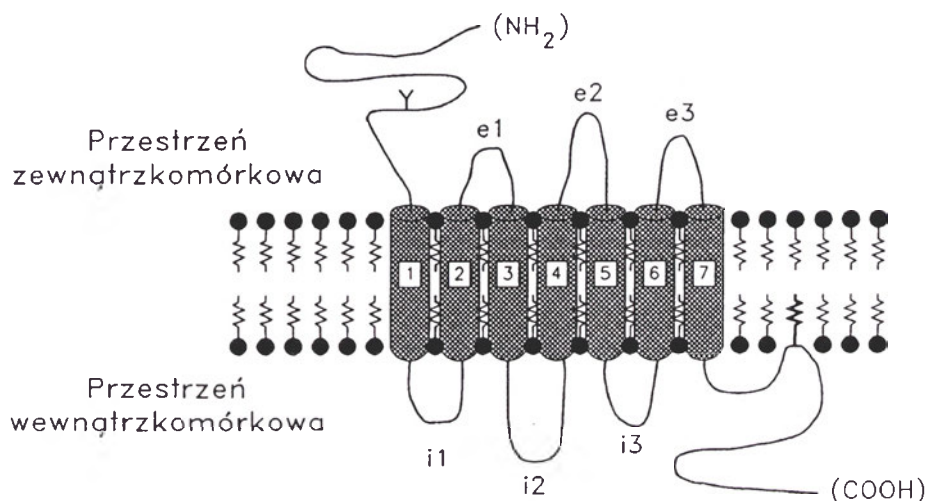
¹Dr, ²Prof. dr hab., ³Dr hab., Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, ul. J. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk

nista-receptor-białko G. Aktywacja białka G zapoczątkowuje wewnątrzkomórkową odpowiedź: stymulację lub inhibicję różnorodnych enzymów, zwanych efektorami, oraz kanałów jonowych. Efektorami katalizującymi wytwarzanie tak zwanych wtórnych przekaźników informacji (*second messenger*), działających już wewnątrz komórki, są między innymi: cyklaza adenylanowa, cyklaza guanylanowa, fosfolipazy C i A₂ oraz fosfodiesteraza cGMP.

Głównym tematem pracy jest omówienie niektórych eksperymentalnych metod stosowanych do analizy oddziaływań ligand — receptor, takich jak: kon-

domen helikalnych, miejsc N-glikozylacji, mostków disulfidowych stabilizujących strukturę białka receptorowego oraz miejsc palmitoilacji. Schematyczną budowę receptorów GPCR przedstawia rycina 1.

Pojedynczy łańcuch polipeptydowy, zawierający N-końcową wolną grupę aminową po stronie zewnątrzkomórkowej, a C-końcową po stronie cytoplazmatycznej [8, 9], siedmiokrotnie „przebija” podwójną warstwę lipidową błony komórkowej, poczynając od strony zewnątrz- i kończąc po stronie wewnątrzkomórkowej, tworząc w ten sposób siedem



Ryc. 1. Schematyczna budowa receptorów sprzężonych z białkami G

struowanie chimer receptorowych, wprowadzanie mutacji punktowych. Ponadto na przykładzie pracy własnej dotyczącej interakcji przysadkowego peptydu aktywującego cyklazę adenylanową (PACAP) z jego receptorem I typu (należącego do rodziny receptorów GPCR) chcemy dokładnie przedstawić metodę szczególnie dogodną w badaniach oddziaływań ligand — receptor, a mianowicie znakowanie metodą fotopowinowactwa (*photoaffinity labelling*).

II. Receptory sprzężone z białkami G (GPCR)

II-1. Struktura GPCR

Receptory metabotropowe sprzężone z białkami G, pomimo różnorodności ligandów stymulujących szeroką gamę wtórnych przekaźników informacji, wykazują znaczną strukturalną homologię. Są one integralnymi białkami błonowymi, utworzonymi z pojedynczego łańcucha peptydowego, zawierającego zwykle od 400 do 600 reszt aminokwasowych, chociaż występują tu dość znaczne różnice [3-7].

Wśród wspólnych cech receptorów tej rodziny należy wymienić występowanie: transmembranowych

helikalnych transmembranowych domen (TM1-TM7). Helisy oddzielone są poprzez hydrofilowe pętle: trzy zewnętrzne (e1-e3) i trzy wewnątrzkomórkowe (i1-i3). Pętle zewnętrzne i wewnątrzkomórkowe nie wykazują znaczącej homologii sekwencyjnej, w przeciwieństwie do silnie konserwatywnych fragmentów transmembranowych.

Ukierunkowana mutagenaza punktowa (*site-directed mutagenesis*) oraz analiza struktury licznych receptorów wykazała, iż większość receptorów rodziny GPCR jest glikoproteinami i zawiera (przeważnie w N-terminalnym zewnątrzkomórkowym segmencie) od jednego do dziewięciu potencjalnych miejsc N-glikozylacji reprezentowanych sekwencją Asn-X-Ser/Thr, gdzie X może stanowić dowolną resztę aminokwasową, z wyjątkiem Pro lub Asp [10-12].

Prawie wszystkie receptory sprzężone z białkami G zawierają reszty cysteiny w pierwszej i drugiej zewnątrzkomórkowej pętli. Mutacje tych reszt cysteiny (na przykład w receptorze β_2 -AR Cys106/Cys191 oraz Cys184/Cys190) powodują zmianę funkcji receptorów [13-17]. Analizy biochemiczne wskazują na tworzenie mostka bądź mostków disulfidowych między pierwszą i drugą zewnątrzkomór-

kową pętlą [18, 19], co jest bardzo ważne w utrzymaniu aktywnej struktury receptora.

Zdecydowana większość receptorów wykazuje również obecność wysoce konserwatywnej reszty cysteiny we fragmencie C-końcowego cytoplazmatycznego segmentu receptora. Jest to miejsce palmitoilacji w receptorach α i β -adrenergicznych (α AR i β AR) [20, 21] oraz rodopsynie [22]. Grupa palmitoilowa pełni funkcję „kotwiczącą” C-terminalny cytoplazmatyczny segment receptora w błonie, utrzymując tym samym trzeciorzędową strukturę tego regionu. Podstawienie reszty Cys 322 lub Cys 323 resztą seryny w rodopsynie [14], reszty Cys 341 resztą leucyny w β AR [23], bądź reszty Cys 442 resztą alaniny w receptorze α_{2A} adrenergicznym [20], usuwa potencjalne miejsce palmitoilacji, lecz nie powoduje dużych strukturalnych i funkcjonalnych zmian tych receptorów (nie osłabia istotnie aktywacji białka G). Natomiast substytucja reszty Cys 341 resztą Ala lub resztą Gly w receptorze β_2 AR powoduje utratę zdolności receptora do aktywacji białek G [21]. Sugeruje to, iż natura łańcucha bocznego (hydrofobowy, bądź palmitoilowana reszta cysteiny w tej pozycji) jest ważna w zachowaniu funkcji receptora.

Analiza sekwencyjna nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G pozwoliła zauważyć wyróżniające się motywy strukturalne. Na tej podstawie GPCR zostały zakwalifikowane do trzech podrodziny [24, 25]: (i) podrodzina rodopsyny i receptorów β -adrenergicznych, (ii) podrodzina receptorów sekretyny i naczyniowoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), do której należą również receptory glukagonu, receptory peptydu glukagonopodobnego 1 (GLP-1), receptory przysadkowego peptydu aktywnego cyklazę adenylanową (PACAP), receptory parathormonu (PTH), receptory peptydu inhibującego gastrynę (GIP) oraz receptory kalcytoniny i hormonu uwalniającego gonadotropinę (GnRH) [26], (iii) podrodzina metabotropowych receptorów glutaminianergicznych (mGluR 1-7), do której należą również dwa receptory zależne od jonów wapnia [27, 28].

II-2. Miejsce wiązania liganda w receptorach

W przeciwieństwie do strukturalnego podobieństwa receptorów rodziny GPCR, ich naturalne ligandy o właściwościach agonistycznych pod względem strukturalnym są bardzo zróżnicowane, począwszy od pojedynczego fotonu światła, poprzez małe hormony i cząsteczki neurotransmiterów, jak na przykład katecholaminy, acetylocholina, serotoni-

na i histamina, aż do hormonów glikoproteinowych o masie cząsteczkowej około 28 kDa [29].

(i) Miejsce wiązania małych cząsteczek

Dane dotyczące receptorów rodopsyny i receptorów β -adrenergicznych, wskazują, że hydrofilowe pętłe zewnątrzkomórkowe nie są ważne w wiązaniu liganda, sugerując jednocześnie, że miejscem wiązania substancji agonistycznych powinny być hydrofobowe domeny transmembranowe [30, 31]. Agonistami bądź antagonistami dla receptorów adrenergicznych są biogenne zasady, co sprawia, że w miejscu wiązania w receptorze powinna występować reszta lub reszty aminokwasowe o charakterze kwaśnym, w celu utworzenia pary jonowej ze sprotonowaną grupą aminową liganda [32-36].

(ii) Miejsce wiązania dużych cząsteczek (peptydów)

Naturalnymi ligandami peptydowych receptorów, należących do rodziny GPCR, są peptydy, począwszy od małych peptydów, takich jak tripeptyd TRH (hormon uwalniający tyreotropinę), do dużych, zbudowanych z 20 do 40 reszt aminokwasowych, jak na przykład glukagon. Agoniści peptydowi są zdecydowanie większymi cząsteczkami w porównaniu z biogennymi aminami, dlatego też w wiązanie takiego liganda zaangażowane są również zewnątrzkomórkowe pętłe receptora, stanowiące dodatkowe „punkty kontaktu” agonisty z receptorem [37-40]. Dla dużych ligandów miejsce wiązania z receptorem bywa różne; zawiera jednak zawsze określone strukturalne determinanty receptora, które pochodzą zarówno z transmembranowych, jak i zewnątrzkomórkowych domen.

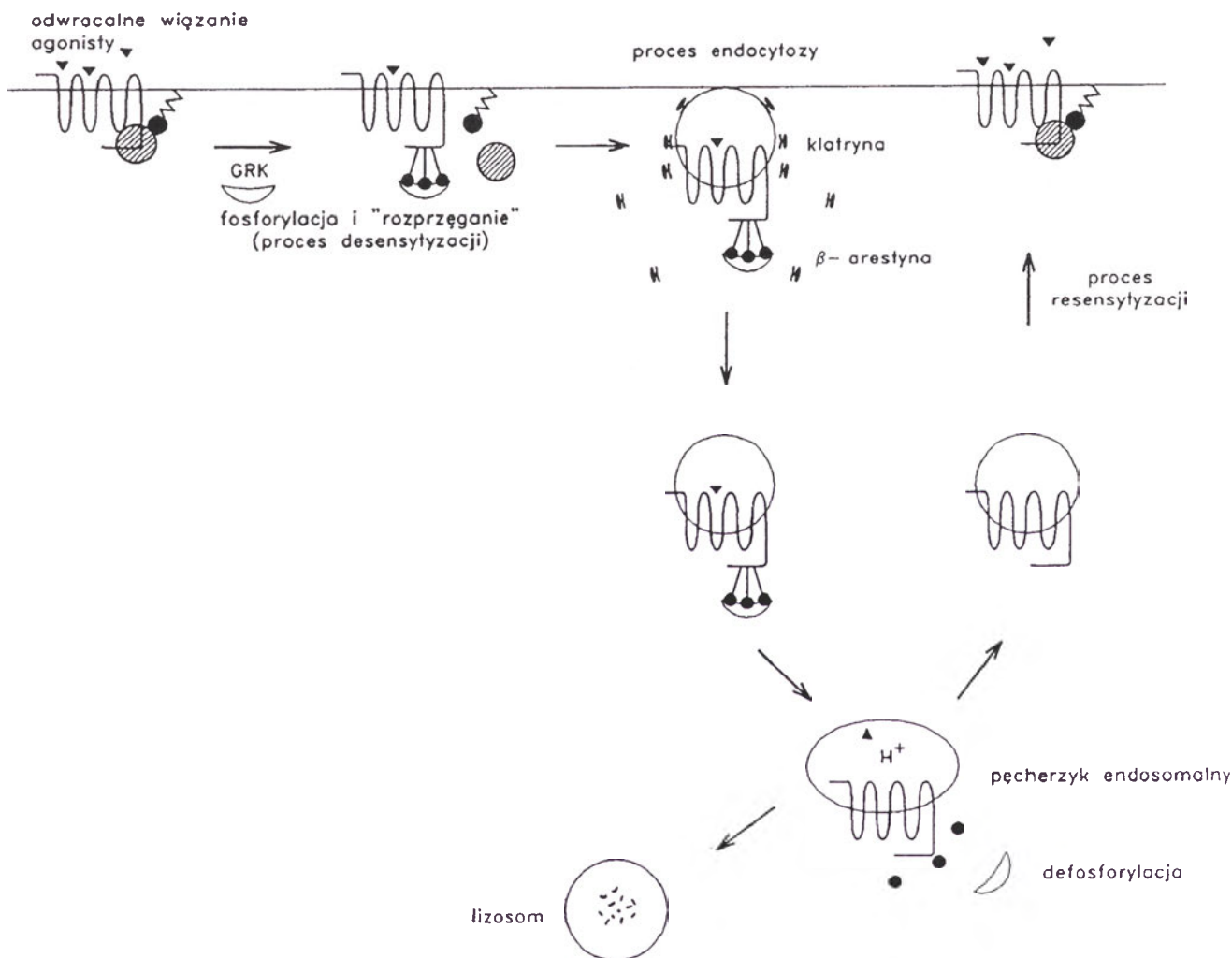
II-3. Regulacja funkcji receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR)

W normalnych warunkach komórki są zdolne do szybkiej odpowiedzi na bodziec zewnętrzny. Taki mechanizm regulacyjny występuje również na poziomie receptorów. Trwałe połączenie białka G z receptorem jest warunkiem koniecznym do dalszego przekazu informacji. Uniemożliwienie lub osłabienie tego wiązania przerywa cały szlak sygnalizacyjny. Oddzielenie receptora od białka G leży u podstaw tak zwanego procesu *desensytyzacji receptora*, który to proces uniemożliwia przekazywanie sygnału przez następne cząsteczki agonisty i utrudnia zbyt intensywne jego działanie. Procesem desensytyzacji kieruje kilka molekularnych mechanizmów [41, 42]. Są to: fosforylacja powodująca w następstwie od-

dzielenie receptora od białka G, endocytoza powodująca odwracalne usunięcie funkcjonalnych receptorów z membrany i tak zwana „down-regulacja” (*down-regulation*), która powoduje obniżenie całkowitej liczby receptorów z ich jednoczesną destrukcją. Schematycznie proces regulacji funkcji receptorów GPCR przedstawia rycina 2.

Po połączeniu agonisty z receptorem następuje fosforylacja receptora na resztach seryny i treoniny, głównie w trzeciej cytoplazmatycznej pętli i segmencie C-terminalnym. W proces ten zaangażowane są serynowe i treoninowe kinazy białkowe, zwane kina-

Benovic i współpracownicy udowodnili, iż fosforylacja receptora β_2AR przez βARK nie utrudnia bezpośrednio aktywacji białka G_s [44]; powoduje ją funkcjonalny kofaktor GRKs — β -arestyna [45] — białko występujące w kilku izoformach wysoce swoistych dla określonych receptorów. β -Arestyna wiąże się z ufosforylowanym receptorem, jednocześnie uniemożliwiając interakcję między receptorem a białkiem G, powodując w konsekwencji desensytyzację receptora [46, 47]. Następnie kompleks ligand-receptor ulega internalizacji (przy udziale klatryny) i endocytozie. Błona komórkowa wgłębia



Ryc. 2. Proces regulacji funkcji receptorów sprzężonych z białkami G

zami receptorów sprzężonych z białkami G (GRKs - *G-protein receptor kinases*): kinaza rodopsyny (GRK 1) i kinazy receptora β -adrenergicznego $\beta ARK-1$ (zwane GRK2) oraz kinazy $\beta ARK-2$ (zwane również GRK3) [43], jak również kinazy zależne od wtórnych przekazników (*second-messenger depended kinases*) — kinaza białkowa A (*PKA-protein kinase A*) oraz kinaza białkowa C (*PKC-protein kinase C*).

się, a receptor zostaje oplaszczony regularną strukturą białkową zwaną triskalionem. Triskalion jest zbudowany z kompleksowego białka — klatryny — rozmieszczonego na podobieństwo heksagonalnej sieci wokół czasteczki receptora. W endocytozie biorą udział również β -arestyny (receptor β_2AR), występujące jako białka adaptorowe (*adaptor-like proteins*). Proces endocytozy ma miejsce zarówno w desensytyzacji, jak również w resensytyzacji receptora

[48]. Po „oddysocjowaniu” klatryny, w pęcherzykach endosomalnych następuje dysocjacja liganda z kompleksu ligand-receptor, a następnie przy udziale endosomalnych fosfataz może nastąpić defosforylacja receptora umożliwiająca oddysocjowanie β -arestyny. Ligand jest degradowany, a funkcjonalnie aktywny receptor powraca do błony komórkowej (proces resensytyzacji).

Down-regulacja jest procesem wolniejszym niż endocytoza, ale prowadzącym w konsekwencji do nieodwracalnego zmniejszenia całkowitej liczby receptorów w błonie komórkowej, co spowodowane jest długotrwałą (od kilku godzin do kilku dni) ekspozycją receptora na działanie substancji agonistycznej. Działa tu podstawowa zasada regulacji o typie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Im większe stężenie agonisty na błonie komórkowej i im częściej działa on na komórkę, tym bardziej przeważa proces internalizacji (usuwania) receptorów. Gęstość recep-

torów maleje, komórka niejako broni się przed nadmiernym pobudzeniem lub hamowaniem chemicznym. Tak więc endocytoza może stanowić wstępny etap *down-regulacji*, ale może również występować niezależnie, ze względu na możliwość resensytyzacji [49, 50].

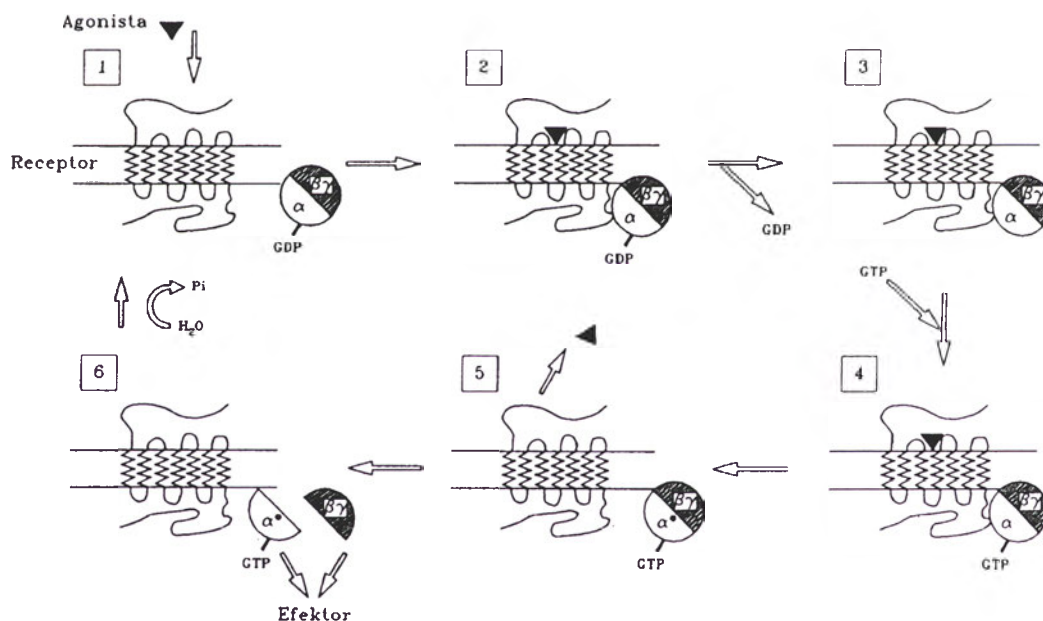
III. Białka G — typy, mechanizm działania i efekty

Obecnie wiadomo, iż setki receptorów błonowych, należących do wspólnej rodziny receptorów siedmiotransmembranowych, „angażują” białka G,

które z kolei należą do nadrodziny białek wiążących GTP, jako czynnika niezbędnego do zainicjowania wewnątrzkomórkowego łańcucha reakcji prowadzącego do odpowiedzi biologicznej.

Białka G są heterotrimerami zbudowanymi z podjednostki α (G_α), która wiąże i hydrolizuje GTP, oraz podjednostek β (G_β) i γ (G_γ) tworzących trwały kompleks ($G_{\beta\gamma}$). Clapham nazwał białka G jedną z najważniejszych naturalnych maszyn, która zbudowana jest z „dźwigni” (receptor), „wyłącznika” (G_α) i „śmigła” ($G_{\beta\gamma}$) [51].

Ostatnio rozwiązana struktura krystalograficzna heterotrimeru $G_{\alpha\beta\gamma}$ dostarcza szczegółowych informacji dotyczących budowy odpowiednich podjednostek białka G [52-54]. Informacje te, jak również szczegóły dotyczące mechanizmu działania białek G i układu efektorów związanych z białkami G, może Czytelnik znaleźć w „Postęпах Biochemii” [55], „Wiadomościach Chemicznych” [56] i w książce pt:



Ryc. 3. Model mechanizmu działania białek G

„Receptory — struktura, charakterystyka, funkcja” [57]; z tego względu w niniejszej pracy przedstawiony zostanie tylko ogólny mechanizm ich działania (Ryc. 3).

Ogólnie przyjętym modelem mechanizmu działania białek G, opartym na licznych badaniach, jest model aktywacji cykazy adenylnowej poprzez białka $G_{\alpha s}$ [58, 59]. Nieaktywne białko G jest trimerem z silnie związanym GDP w podjednostce α (etap 1, Ryc. 3). Aktywacja receptora po związaniu agonisty uruchamia oddysocjowanie związanego GDP tworząc w podjednostce α chwilowo tak zwany „stan pusty” (*empty state*) (etap 2 \rightarrow 3, Ryc. 3). W warun-

kach fizjologicznych GDP jest natychmiast wymieniany na GTP (etap 3 → 4, Ryc. 3), co powoduje obniżenie powinowactwa podjednostki α do podjednostki $\beta\gamma$ białka G (etap 5, Ryc. 3), co z kolei prowadzi do oddysocjowania G_α z trimery (etap 6, Ryc. 3). Konsekwencją tego procesu jest możliwość modulacji aktywności efektora poprzez G_α -GTP, która może być dokonywana również za pomocą kompleksu $G_{\beta\gamma}$ (etap 6, Ryc. 3). Na etapie aktywacji efektor następuje zwielokrotnienie sygnału [60]. Uważa się, że pojedyncza cząsteczka agonisty, związana z receptorem, może stymulować poprzez białka G setki, a nawet tysiące cząsteczek wtórnego przekaźnika informacji [61]. Cały proces jest samoregulowany poprzez wewnętrzną aktywność GTP-azową podjednostki G_α . Wkrótce po związaniu z receptorem zachodzi hydroliza GTP z uwolnieniem nieorganicznego fosforanu. Prowadzi to do przejścia podjednostki G_α w stan nieaktywny, wzrostu jej powinowactwa do podjednostki $G_{\beta\gamma}$, reasocjacji heterotrimeru, a w końcowym etapie do wyłączenia sygnału [61] (etap 6 → 1, Ryc. 3).

Receptory sprzężone z białkami G pośredniczą w aktywacji różnorodnych enzymów zwanych efektorami, takich jak: cyklaza adenylanowa (AC), cyklaza guanylanowa (GC), fosfolipazy C i A_2 oraz fosfodiesteraza cGMP. Te z kolei uczestniczą w generowaniu wewnątrzkomórkowych cząsteczek przekaźników wtórnych, do których należą między innymi: cAMP (cykliczny adenozyńmonofosforan), cGMP (cykliczny guanozyńmonofosforan), DAG (diacyloglicerol), IP_3 (inozytolo-1,4,5-trifosforan), kwas arachidonowy i jego metabolity, jak również jony wapnia. Za pośrednictwem tych substancji dochodzi do kaskady reakcji związanych z przekazywaniem większości sygnałów zewnątrzkomórkowych do wnętrza komórki oraz do wielu procesów w obrębie samej komórki.

IV. Eksperymentalne metody badania receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR)

Badania oddziaływań ligand-receptor stanowią bezpośrednią metodę badań receptorów oraz dają odpowiedź na dwie kategorie pytań [62]. Pierwszą z nich stanowią pytania dotyczące farmakologii receptorów, mechanizmu oddziaływania ligand-receptor oraz natury i mechanizmu interakcji efektor-receptor; drugą zaś pytania związane z biologią komórki i dystrybucją receptorów, szczególnie zaś ich stężeniem w różnych tkankach, ich rozmieszczeniem w różnych typach komórek, jak również ich syntezą i degradacją.

Ważnymi metodami stosowanymi w badaniach receptorów są: znakowanie metodą fotopowinowactwa (*photoaffinity labeling*), konstruowanie chimer receptorowych oraz mutacje dokonywane w receptorach.

(i) Znakowanie metodą fotopowinowactwa

Metoda ta jest szeroko stosowana w identyfikacji, lokalizacji oraz izolacji receptorów, jak również w badaniach ich oddziaływań z ligandem [63, 64]. Jest to kategoria „*affinity labeling*” (znakowanie metodą powinowactwa), w której ligand za pomocą światła UV jest aktywowany w centrum wiążącym receptora do wysoce reaktywnego produktu pośredniego. W ten sposób wygenerowane „znaczniki” mają tę przewagę nad chemicznymi (elektrofilowymi) znacznikami, że są do czasu aktywacji stabilne w roztworach wodnych i nie wymagają nukleofilowych centrów w celu wprowadzenia liganda do kieszeni wiążącej receptora.

Koncepcja znakowania metodą fotopowinowactwa po raz pierwszy wprowadzona została w 1962 roku przez Westhemia i współpracowników [65] do znakowania aktywnego centrum chymotrypsyny przy użyciu α -ketokarbenów, jako reaktywnych produktów, wytworzonych z α -diazokarbonylowych prekursorów.

Fotoreaktywne peptydy zawierają zwykle znaczną grupę, którą mogą stanowić radioaktywne izotopy, grupy fluorescencyjne, bądź rzadziej grupy chemiluminescencyjne, w celu detekcji usieciowanego kompleksu. Większość badań prowadzona jest z wykorzystaniem trytu lub jodu-125, z powodu względnie łatwego przygotowywania takich peptydów. Grupy fluorescencyjne mogą być wykorzystane tylko wówczas, gdy receptory występują w stosunkowo wysokich stężeniach.

Radioaktywne fotopeptydy mogą być przygotowane poprzez syntezę *de novo*, w reakcjach katalitycznej wymiany w pierścieniu aromatycznym z użyciem trytu (przed wprowadzeniem fotoznacznika), poprzez wprowadzenie do grupy funkcyjnej radioaktywnego reagenta acylującego, bądź też poprzez wprowadzenie radioaktywnego jonu metalu do ugrupowania kompleksującego, chemicznie związanego z peptydem. Wówczas, gdy konieczna jest wysoka biologiczna aktywność liganda przedkładane jest znakowanie izotopami (na przykład wymiana 1H na 3H , bądź ^{32}S na ^{35}S) nad znakowaniem nieizotopowym (na przykład wprowadzenie ^{125}I w miejsce H).

Ogólny schemat znakowania metodą fotopowinowactwa, w przypadku receptorów hormonów peptydowych, można przedstawić w następujących punk-

tach: (a) związanie peptydowego liganda (L) zawierającego fotoznacznik (X) z receptorem (R), (b) fotoaktywacja znacznika do wysoce reaktywnego produktu X', (c) utworzenie wiązania chemicznego między peptydem a receptorem poprzez X'.



Jednym ze sposobów przygotowania fotoreaktywnych peptydów o wysokiej aktywności biologicznej jest użycie fotoreaktywnych aminokwasów aromatycznych, na przykład: (*p*-azydo)fenyloalaniny, (*p*-azydo-*o*-nitro)fenyloalaniny (Pan), [*p*-(3-trifluorometylo)-diaziryno]fenyloalaniny (Pdp), (*p*-nitro)fenyloalaniny (Pnp), (*p*-diazonio)fenyloalaniny (Phe(N₂⁺), (3-diazo)histydyny [His(N₂)], w miejsce fenyloalaniny bądź tyrozyny. Takie bezpośrednie włączenie fotoreaktywnych grup w łańcuch peptydowy pozwala na uniknięcie problemu wzrostu lipofilowości, które często ma miejsce w przypadku peptydów z łańcuchami bocznymi modyfikowanymi resztą arylową, bądź inną sterycznie dużą grupą. Peptydy takie nie tylko mają zmniejszoną aktywność, ale również wykazują tendencję do niespecyficznego wiązania z receptorem po fotoznakowaniu [63]. Z tego względu bardziej racjonalne jest projektowanie fotopeptydów na bazie fotoreaktywnych aminokwasów. Wyżej wymienione fotoreaktywne aminokwasy aryłowe podczas fotolizy wytwarzają produkty przejściowe (są to głównie karbeny i nitreny), które powstają po fotoeliminacji azotu z cząsteczki diaziryny aryłowej, diazocyklopentadienu, diazoimidazolu, azydku aryłowego lub z grupy α-diazokarbonylowej. Te fotowygenerowane produkty przejściowe reagują następnie z sąsiadującymi grupami funkcyjnymi w reakcjach włączania do wiązań pojedynczych, eliminacji cząsteczki wodoru, cykloaddycji do wiązań wielokrotnych lub w reakcji przykoordynowania do centrów nukleofilowych. Typ powyższych reakcji zależy od multipletowości produktów pośrednich, powstałych w wyniku naświetlania układu [66]. Powyżej opisane fotoreaktywne aminokwasy są używane głównie w syntezie znakowanych peptydów w roztworze. W syntezie peptydów na nośniku stałym ich zastosowanie ma znaczne ograniczenia, związane bądź to z chemiczną labilnością, bądź też z warunkami syntezy na nośniku stałym.

W warunkach syntezy na nośniku, można zastosować bez wątpienia, aryloketonowe pochodne fenyloalaniny, które zostały wprowadzone do badań receptorów w latach 80-tych przez Breslowa [67]. Związki te, często ze strukturalną podjednostką benzofenonu (BP), stanowią w metodzie fotopowino-

wactwa ważną klasę znaczników i charakteryzują się kilkoma istotnymi cechami [68]:

- (a) są chemicznie bardziej stabilne aniżeli azydki aryłowe i diazoestry;
- (b) mogą być używane w otaczającym świetle (stanowi to duże udogodnienie);
- (c) aktywację prowadzi się poprzez naświetlanie światłem o λ=360 nm, przez co unika się stosowania krótszych fal, mogących niszczyć białko;
- (d) są wzbudzane do stanów trypletowych (dirodniki), reagujących z dużą specyficznością i wydajnością z wiązaniami C-H i jednocześnie posiadających bardzo małą reaktywność w stosunku do wody i dużych grup nukleofilowych [69].

W ostatnich latach ligandy z grupą benzofenonu (BP) zostały z powodzeniem wykorzystane w badaniach licznych cząsteczek docelowych, takich jak na przykład receptor substancji P [70], receptor angiotensyny II [71], czy receptor insuliny [72].

Shoelson i współpracownicy [73] zaproponowali nowe podejście do bezpośredniego mapowania oddziaływań ligand-receptor. Metoda ta nazwana globalną analizą fotopowinowactwa (*photoaffinity scanning*) polega na analizie punkt po punkcie interakcji między peptydem a receptorem. W metodzie tej kolejno każda reszta aminokwasowa w ligandzie jest podstawiana przez fotoreaktywny aminokwas, zawierający ugrupowanie benzofenonu (BP), tworząc w ten sposób matrycę, której analiza może dokładniej określić region oddziaływań między receptorem a ligandem.

Zostały opracowane dwa różne sposoby wprowadzania ugrupowania BP; bądź poprzez acylację grupy ε-aminowej reszty lizyny [74], bądź też poprzez substytucję pojedynczej reszty aminokwasowej resztą *p*-benzoilofenyloalaniny (Bz-Phe) [75].

Znakowanie metodą fotopowinowactwa z wykorzystaniem pochodnych BP jest bardzo cennym narzędziem, zarówno w oczyszczaniu receptora, jak również w identyfikacji reszt aminokwasowych w receptorze, odpowiedzialnych za oddziaływania z peptydowym ligandem.

(ii) Konstruowanie chimer receptorowych

Innym ze sposobów prowadzących do zrozumienia, która z części receptora odpowiedzialna jest bądź to za specyficzność danego podtypu receptora, bądź miejsca interakcji z białkiem G, jest konstruowanie różnych chimer receptorowych, w których domena albo domeny jednego białka receptorowego wymieniane są na analogiczne lecz funkcjonalnie różne domeny innego receptora.

Chimery receptorów transmembranowych konstruowane były początkowo na podstawie znajomości genów receptora α_2 i β_2 adrenergicznego [76]. Zostały one wybrane z kilku powodów:

- (1) sekwencje aminokwasowe tych receptorów posiadają wysoką homologię (70% w regionie transmembranowym i około 49% w całej strukturze), co stwarza duże prawdopodobieństwo wystarczającej zgodności do tworzenia trwałych funkcjonalnie chimer;
- (2) podobna jest „charakterystyka” wiązania liganda w obu receptorach, choć występują łatwo dostrzegalne różnice (istnieją selektywni antagoniści dla każdego typu receptora, a kolejność mocy wiązania agonistów z receptorami jest różna);
- (3) α_2 AR i β_2 AR sprzężone są z różnymi białkami G, co prowadzi odpowiednio do inhibicji (G_i) lub stymulacji (G_s) cykazy adenylanowej.

Zaobserwowano, iż systematyczne podstawienia w sekwencji receptora β_2 AR przez odpowiedniki z receptora α_2 AR, w sposób znaczący zmieniały kolejność powinowactwa („mocy”) agonistów, doprowadzając do tego, że powstała hybryda nie wykazywała specyficzności żadnego z wyjściowych receptorów. Jeżeli zaś chodzi o specyficzność antagonistyczną zauważono, że jest ona silnie związana z regionem transmembranowym (TM) receptora, a wymiana TM 7 receptora α_2 AR na transmembranową domenę pochodzącą z receptora β_2 AR spowodowała, iż powstała chimera wykazywała antagonistyczną specyficzność receptora β adrenergicznego. Stosując metodę budowania chimer określano również różne strukturalne determinanty odpowiedzialne za wiązanie się receptora z białkami G. Hybryda, w której w receptorze α_2 AR piąta i szósta transmembranowa domena oraz łącząca je pętla podstawione zostały odpowiednikami z receptora β_2 AR, wykazywała specyficzność wiązania liganda charakterystyczną dla receptora α_2 AR, ale stymulację cykazy adenylanowej taką jaką powoduje receptor β_2 AR [76].

Z powyższych obserwacji wyciągnąć można ważne wnioski:

- (1) miejsca wiązania agonistów i antagonistów w obu receptorach są różne, ale z wydzielnymi determinantami, a główne determinanty specyficzności wiązania agonisty leżą w TM 7;
- (2) determinanty rozpoznające białka G leżą w TM piątej i szóstej oraz łączącej je trzeciej pętli cytoplazmatycznej.

Powyższe badania zapoczątkowały konstruowanie różnorodnych chimer w celu określenia cech warunkujących specyficzność danego podtypu recepto-

ra adrenergicznego. Budowano hybrydy, w których TM 5 i 6 receptora β_2 AR wymieniane były na odpowiadającą sekwencję pochodzącą z receptora α_1 AR. Otrzymano chimery wiążącą ligandy ze specyficznością receptora β_2 AR i uczestniczącą w stymulacji metabolizmu fosfatydyloinozytoloowego z porównywalną wydajnością, jak w natywnym receptorze α_1 AR [77]. Podobnie chimery muskarynowych receptorów cholinergicznym M_1 i M_2 wykazały wagę piątej i szóstej domeny transmembranowej w określeniu specyficzności sprzężenia z białkami G [78]. Skonstruowano także serię chimerycznych receptorów β_1/β_2 AR w celu identyfikacji funkcji kilku domen transmembranowych, szczególnie TM 4. W ten sposób możliwe stało się określenie selektywności wiązania różnych agonistów i antagonistów dla tego podtypu receptora [79].

Doświadczenia z receptorami chimerycznymi wskazują, iż w selektywnym wiązaniu ligandów biorą udział także transmembranowe obszary receptora, podczas gdy pętla cytoplazmatyczna odpowiada za swoiste reakcje z różnymi białkami G. Ponadto wiadomo, że miejsca N-glikozylacji występują w zewnątrzkomórkowym N-końcowym fragmencie, a miejsca fosforylacji znajdują się w różnych obszarach wewnątrzkomórkowych, odgrywając kluczową rolę w regulacji własności receptorów [10, 11, 43].

(iii) Mutacje jako metoda badań receptorów

Proces replikacji DNA, zapewniający identyczną informację genetyczną komórkom potomnym, jest bardzo dokładny, ale niekiedy może zdarzyć się błąd nazwany *mutacją* (mutacją nazywa się jakąkolwiek zmianę w sekwencji nukleotydów genu). Mutacja taka jest następnie powtarzana w czasie replikacji danego łańcucha DNA. Można wyróżnić trzy podstawowe typy mutacji: mutację punktową, samorzutną (spontaniczną) oraz mutację indukowaną. Mutacją punktową nazywa się każdą pojedynczą zmianę sekwencji nukleotydowej genu odrębną od sekwencji nukleotydowej DNA genu uznanego za standardowy. Mutacje powstające samorzutnie, ale też mutacje indukowane dość specyficznymi czynnikami mutagennymi, są losowe i rodzaju zmian w kodonach nie daje się przewidzieć.

Większość badanych mutacji dotyczy genów struktury kodujących zwykle białka enzymatyczne. Przy tego typu mutacjach zwykle efekt mutacji badany jest w postaci zmiany lub utraty aktywności enzymatycznej badanego białka. Mutacje nonsensowne oraz typu zmiany fazy odczytu prowadzą najczęściej do całkowitej utraty aktywności enzymatycznej. Mutacje typu zmiany sensu mogą często nie wpływać na

aktywność enzymu, zmieniać ją lub całkowicie znieść, w zależności od miejsca i rodzaju substytucji aminokwasowej w polipeptydzie [80].

W przypadku receptorów najważniejsze wyniki otrzymuje się z badań zmutowanych białek receptorowych, w których pojedyncza reszta aminokwasowa zamieniona zostaje na drodze mutacji punktowej. Wyselekcjonowane do badań miejsca zmiany zawierają zwykle wiązania wodorowe lub naładowaną resztę w domenach transmembranowych [81], reszty aminokwasowe wysoce konserwatywne we wszystkich receptorach, bądź wysoce konserwatywne w danej podrodzynie receptorów [82], oraz reszty w pozycjach homologicznych do tych, których istotna rola została już wykazana w innych receptorach [83]. Inne dokonywane punktowe zmiany dotyczą także reszt, które są różne wśród receptorów wysoce homologicznych i wykazują międzygatunkową zmienność wiązania antagonisty [84] oraz reszt różniących się w danej podgrupie receptorów, które wiążą ligandy z tej samej klasy, lecz z różnym powinowactwem [85].

Do analizy mutacji punktowych szczególnie odpowiedni i jeden z najlepiej przebadanych jest receptor β_2 AR, ze względu na możliwość jego oddziaływań z szeroką gamą różnych specyficznych ligandów (zarówno agonistów jak i antagonistów), co stwarza możliwość monitorowania zmian we właściwościach wiązania liganda.

Endogenne substancje agonistyczne, takie jak adrenalina (epinefryna) i noradrenalina (norepinefryna), cechują się obecnością pierścienia katecholowego, sprotonowanej grupy aminowej oraz grupy β -hydroksylowej. Badania zależności struktura-aktywność z użyciem syntetycznych ligandów adrenergicznych, zawierających grupę aminową i grupę β -hydroksylową, wykazały istotne znaczenie tych grup w wiązaniu zarówno agonistów, jak i antagonistów, natomiast ugrupowanie katecholowe charakterystyczne jest dla wiązania agonistów. Przeprowadzono zatem punktową mutację w receptorze β AR mającą na celu identyfikację reszt aminokwasowych biorących udział w wiązaniu grupy aminowej, β -hydroksylowej i pierścienia katecholowego. Badania wykazały, iż Ser 204 i Ser 207 w TM 5 [35], reszta Asp 113 w TM 3 [32] oraz reszta Phe 290 w TM 6 [35] receptora β_2 AR zaangażowane są w tworzenie „kieszni” wiążącej aminy biogenne. Mutacje punktowe w miejscu reszt cysteiny (Cys 106, 184, 190, 191) w receptorze β_2 AR, wykazały ich znaczącą rolę w wiązaniu liganda [13, 15]. Tworzą one mostki disulfidowe, konieczne do stabilizacji odpowiedniej konformacji receptora. Powyższy przykład pokazuje ogromną rolę badań dokonywanych za pomocą mu-

tagenezy w poznaniu zależności między strukturą i funkcją receptorów GPCR, jak również w ustaleniach miejsc wiązania ligandów.

Wśród metod biofizycznego badania receptorów (zwłaszcza ich transmembranowych, hydrofobowych α -helikalnych domen) należy wymienić również: analizę rentgenostrukturalną [86, 87], neutronografię [88], mikroskopię elektronową [89] oraz wysokorozdzielczą kriomikroskopię elektronową [90], ale metody te wymagają uzyskania wysoce oczyszczonego materiału (receptora) i to w znacznych ilościach rzędu miligramów.

V. Badania oddziaływań ligand-receptor na przykładzie PACAP

Jednym z receptorów należących do rodziny GPCR jest receptor PAC₁. Jego naturalnym ligandem jest przysadkowy polipeptyd aktywujący cyklazę adenylanową (PACAP) wyizolowany z tkanki podwzgórza owcy [91]. Peptyd ten istnieje w dwóch formach: jako 38-peptyd PACAP (1-38) oraz jako jego krótszy, N-terminalny odpowiednik, składający się z 27 reszt aminokwasowych — PACAP (1-27). Obie formy PACAP pochodzą ze 176 aminokwasowego prekursora [92] i są równie użyteczne w badaniach oddziaływań z receptorem, jak również w badaniach stymulacji cyklazy adenylanowej [93, 94]. PACAP należy do rodziny sekretyny, glukagonu i VIP, a jego krótsza forma, PACAP (1-27), wykazuje największą homologię z VIP (68%), widoczną głównie w N-terminalnym [reszty (1-3) i (6-8)] i środkowym regionie (reszty 14-23). Najważniejsze funkcje, które spełnia PACAP, to stymulowanie produkcji cyklicznego adenylozynomonofosforanu (cAMP) i wzrostu cytozolowego stężenia wapnia, stymulowanie syntezy uwalniania prolaktyny i hormonu wzrostu, jak również gonadotropiny, z komórek przysadki, oraz funkcja podobna do tej, jaką spełnia czynnik wzrostu nerwów, a mianowicie PACAP zapobiega naturalnej śmierci komórki neuronalnej w korzeniu grzbietowym zwojów nerwowych embrionu, odgrywając neurotroficzną rolę we wzroście i rozwoju mózgu [95-98]. Do chwili obecnej odkryto dwa typy receptorów PACAP (trzy podtypy) [99]. Typ I (receptor PAC₁) charakteryzuje się wysokim powinowactwem do obu form przysadkowego peptydu aktywującego cyklazę adenylanową lecz około tysiąckrotnie niższym do VIP, należącego do tej samej rodziny co PACAP. Typ II (dwa podtypy receptora: VPAC₁ i VPAC₂) posiada jednakowe powinowactwo zarówno do PACAP (1-38), PACAP (1-27), jak również VIP [99-101].

Głównym celem przeprowadzonych w naszym Zespole badań było wyjaśnienie, która z domen cząsteczki jest bezpośrednio zaangażowana w wiązanie z receptorem. Narzędziem pozwalającym na uzyskanie odpowiedzi i wykorzystanym w tej pracy, było znakowanie metodą fotopowinowactwa.

W celu określenia domen cząsteczki PACAP (1-27) biorących udział w wiązaniu z receptorem, zsyntezowano serię fotoreaktywnych analogów PACAP [102, 103]. Użyto dwóch różnych dróg inkorporacji fotoreaktywnego ugrupowania benzo-fenonowego (BP); Phe-6 lub Tyr-22 z sekwencji cząsteczki PACAP (1-27) podstawiono *p*-benzoiłofenyloalaniną [Bz-Phe] oraz zmodyfikowano reszty lizyn, odpowiednio w pozycjach 15, 20 lub 21, poprzez zacylowanie ich grup ε-aminowych kwasem *p*-benzoiłobenzoowym, tworząc w ten sposób pięć analogów PACAP (1-27) z fotoreaktywnym aminokwasem, zarówno w N-terminalnej nieuporządkowanej, jak i C-terminalnej helikalnej domenie peptydu (Ryc. 4).

Wszystkie analogi znakowane były radioaktywnym jodem-125 z wykorzystaniem procedury „Iodogen” [104]. Wiązanie fotoreaktywnych analogów oszacowano na podstawie przeprowadzonych testów

konkurencyjnych, polegających na podmianie związanego z receptorem radioliganda — ¹²⁵I-PACAP (1-27) [102, 103]. W Tabeli 1 przedstawiono wyniki badań powinowactwa analogów do receptora oraz wydajność fotoznakowania receptora tymi analogami, przy wykorzystaniu metody fotopowinowactwa.

Wnioski wypływające z przeprowadzonych badań można przedstawić w następujących punktach:

- (i) substytucja Phe w pozycji 6 cząsteczki PACAP (1-27), a więc w jego nieuporządkowanej N-terminalnej domenie, powoduje jedynie niewielkie zmiany w powinowactwie wiązania liganda do receptora;
- (ii) substytucja Tyr w pozycji 22, jak również jednej z trzech reszt lizynowych (w pozycji 15), w α-helikalnej domenie peptydu obniża 10-20-krotnie powinowactwo wiązania peptydu z receptorem, lecz pomimo niższego powinowactwa tych analogów do receptora, “znakują” one receptor PAC₁ z wyższą wydajnością, niż pozostałe fotoreaktywne analogi;
- (iii) reszty lizyny w pozycji 15 i tyrozyny w pozycji 22 są resztami decydującymi o zachowaniu wysokiego powinowactwa wiązania peptydu z re-

PACAP (1-27)

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe⁶-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys¹⁵-Gln-
-Met-Ala-Val-Lys²⁰-Lys²¹-Tyr²²-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂

[Bz-Phe⁶] PACAP (1-27)

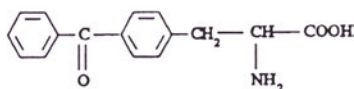
[Lys(ε-pBz₂)¹⁵] PACAP (1-27)

[Lys(ε-pBz₂)²⁰] PACAP (1-27)

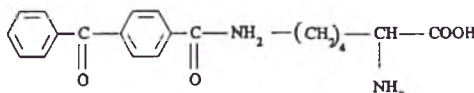
[Lys(ε-pBz₂)²¹] PACAP (1-27)

[Bz-Phe²²] PACAP (1-27)

Bz-Phe



Lys (ε-pBz₂)



Ryc. 4. Badane analogi PACAP (1-27)

Tabela 1.

Powinowactwo do receptora PACAP I typu (PAC₁) pochodzącego z mózgu świni (K_d) oraz wydajności jego fotoznakowania przez fotoreaktywne analogi

Ligand	K_d (nM) ^a	Wydajność fotoznakowania (%) ^b
PACAP (1-27)	0.57 ± 0.12	—
[Bz-Phe ⁶] PACAP (1-27)	1.32 ± 0.24	2
[Lys(ε-pBz ₂) ¹⁵] PACAP (1-27)	7.16 ± 1.90	27
[Lys(ε-pBz ₂) ²⁰] PACAP (1-27)	9.40 ± 0.80	<5
[Lys(ε-pBz ₂) ²¹] PACAP (1-27)	7.73 ± 2.82	8
[Bz-Phe ²²] PACAP (1-27)	4.42 ± 0.35	45

^a Wartości stałych dysocjacji (K_d) wiązania nieznakowanych fotoreaktywnych analogów z membranami pochodzącymi z mózgu świni określono w testach kompetycyjnych z zastosowaniem ¹²⁵I-PACAP (1-27)

^b Wydajności fotoznakowania powinowactwa odnoszą się do procentowej zawartości kompleksu ligand-receptor, który tworzy się jako kowalencyjny addukt po fotoaktywacji liganda

ceptorem i są położone w miejscu (lub blisko miejsca) wiązania się PACAP (1-27) ze swoim receptorem I typu.

VI. Podsumowanie

W przedstawionej pracy opisaliśmy działanie receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR), a zwłaszcza proces wiązania tych receptorów z ligandem. Szczegółowo omówiono niektóre eksperymentalne metody stosowane do badań oddziaływań ligand-receptor, a na przykładzie własnym dotyczącym przysadkowego peptydu aktywującego cyklazę adenylnową (PACAP) pokazano jak wykorzystanie znakowania metodą fotonowinowactwa pozwoliło w sposób zadawalający zidentyfikować domeny peptydu, a nawet reszty aminokwasowe z sekwencji liganda odpowiedzialne za interakcję z receptorem.

Zastosowanie technik biologii molekularnej, genetyki, farmakologii, biochemii, pozwala lepiej zrozumieć molekularne aspekty funkcjonowania receptorów sprzężonych z białkami G oraz roli jaką spełniają. Badania chimer receptorowych czy zastosowanie badań mutagenyzy dają wgląd w mechanizm oddziaływań liganda z receptorem. Również dalszy rozwój technik eksperymentalnych jak badania rentgenostrukturalne, kriomikroskopia oraz badania teoretyczne [56] ułatwiają zrozumienie skomplikowanego mechanizmu transdukcji sygnału przez receptory GPCR. Biorąc pod uwagę wielką fizjologiczną rolę, jaką odgrywają różne receptory należące do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G, zrozumienie mechanizmu ich działania będzie miało nieocenione znaczenie w terapii różnorodnych schorzeń.

Podziękowania

Praca finansowana przez Fundację Współpracy Polsko-Niemieckiej Grant 1384/94/IS

Artykuł otrzymano 11 lutego 1999 r.

Zaakceptowano do druku 9 grudnia 1999 r.

Piśmiennictwo

- Nowak JZ, Zawilska JB (red) (1997) *Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja*, PWN, Warszawa
- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM (1990) *Biochem Biophys Acta* **1031**: 163-224
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S (1991) *Nature (Lond)* **349**: 760-765
- Dias JA (1992) *Biochim Biophys Acta* **1135**: 278-294
- Seeman P (1992) *Receptor Amino Acid Sequences of G-linked Receptors*, Toronto University Press, Toronto
- Abe K, Kusakabe Y, Tanemura K, Emori Y, Arai S (1993) *FEBS Lett* **316**: 253-256
- Cone RD, Mountjoy KG (1992) *Cellular and Molecular Biology of the Adrenal Cortex* **222**: 27-40
- Applebury ML, Hargrave PA (1986) *Vision Res* **26**: 1881-1895
- Wang HY, Lipfert L, Malbon CC, Bahouth S (1989) *J Biol Chem* **264**: 14424-14431
- Rands E, Candelore MR, Cheung AH, Hill WS, Strader CD, Dixon RAF (1990) *J Biol Chem* **265**: 10759-10764
- Fong TM, Yu H, Huang RRC, Strader CD (1992) *Biochemistry* **31**: 11806-11811
- Liu XB, Davis D, Segaloff DL (1993) *J Biol Chem* **268**: 1513-1516
- Dixon RAF, Sigal IS, Candelore MR, Register RB, Rands E, Strader CD (1987) *EMBO J* **6**: 3269-3275
- Karnik SS, Sakmar TP, Chen HB, Khorana HG (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8459-8463
- Fraser CM (1989) *J Biol Chem* **264**: 9266-9270
- Noda K, Saad Y, Graham RM, Karnik SS (1994) *J Biol Chem* **269**: 6743-6752
- Savarese TM, Fraser CM (1992) *Biochem J* **283**: 1-19
- Karnik SS, Khorana HG (1990) *J Biol Chem* **265**: 17520-17524
- Dohlman HG, Caron MG, De-Blasi A, Frielle A, Lefkowitz RJ (1990) *Biochemistry* **29**: 2335-2342
- Kennedy ME, Limbird LE (1993) *J Biol Chem* **268**: 8003-8011

21. O'Dowd BF, Hmatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M (1989) *J Biol Chem* **264**: 7564-7569
22. Papac DI, Thornburg KR, Bullesbach EE, Crouch RK, Knapp DR (1992) *J Biol Chem* **267**: 16889-16894
23. Dixon RAF, Sigal IS, Candelore MR, Register RB., Rands E, Strader CD (1987) *EMBO J* **6**: 3269-3275
24. Birnbaumer M (1995) *J Receptor and Signal Transduction Research* **15**: 131-160
25. Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995) *FASEB J* **9**: 745-754
26. Segre G V, Goldring SR (1993) *Trends Endocrinol Metab* **4**: 309-314
27. Pin JP, Bockaert J (1995) *Curr Opin Neurobiol* **5**: 342-349
28. Danysz W, Frankiewicz T, Parsons CG (1997) W: Nowak JZ, Zawilska JB (red) *Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja*, PWN, Warszawa, str. 161-189
29. Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RAF (1994) *Ann Rev Biochem* **63**: 101-132
30. Thomas DD, Stryer L (1982) *J Mol Biol* **154**: 145-157
31. Dixon RAF, Sigal IS, Rands E, Register RB, Candelore MR, Blake AD, Strader CD (1987) *Nature (Lond)* **326**: 73-77
32. Strader CD, Sigal IS, Candelore MR, Rands E, Hill WS, Dixon RAF (1988) *J Biol Chem* **263**: 10267-10271
33. Fraser CM, Wang CD, Robinson DA, Gocayne JD, Venter JC (1989) *Mol Pharmacol* **36**: 840-847
34. Gantz I, Del Valle J, Wang L, Tashiro T, Munzert G, Guo YJ, Konda Y, Yamada T (1992) *J Biol Chem* **267**: 20840-20843
35. Strader CD, Gaffney T, Sugg EE, Candelore ML, Keys R, Patchett AA, Dixon RAF (1991) *J Biol Chem* **266**: 5-8
36. Vetulani J (1997) W: Nowak JZ, Zawilska JB (red) (1997) *Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja*, PWN, Warszawa, str. 42-63
37. Huang RRC, Yu H, Strader CD, Fong TM (1994) *Biochemistry* **33**: 3007-3013
38. Flanagan CA, Becker I, Davidson JS, Wakefield I, Zhou W, Sealfon SC, Millar RP (1994) *J Biol Chem* **269**: 22636-22641
39. Zhou W, Flanagan C, Ballesteros J, Konvicka K, Davidson JS, Weinstein H, Millar R, Sealfon SC (1994) *Mol Pharmacol* **45**: 165-170
40. Moyle WR, Cambell RK, Myers RV, Bernard MP, Han Y, Wang X (1994) *Nature (Lond)* **368**: 251-255
41. Kobilka B (1992) *Ann Rev Neurosci* **15**: 87-114
42. Lohse MJ (1993) *Biochem Biophys Acta* **1176**: 171-188
43. Lefkowitz RJ (1993) *Cell* **74**: 409-412
44. Benovic JL, Kuhn H, Weyland I, Codina J, Caron M, Lefkowitz RJ (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8879-8882
45. Palczewski K (1994) *Protein Sci* **3**: 1355-1361
46. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) *Science* **248**: 1547-1550
47. Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 8558-8564
48. Jockers R, Silva AD, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S (1996) *J Biol Chem* **271**: 9355-9362
49. Van Zastrow M, Kobilka BK (1992) *J Biol Chem* **267**: 3530-3538
50. Yang J, Logsdon CD, Johansen TE, Williams JA (1993) *Mol Pharmacol* **44**: 1158-1164
51. Clapham D (1996) *Nature (Lond)* **379**: 297-299
52. Lambright DE, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1994) *Nature (Lond)* **369**: 621-628
53. Sondck J, Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1994) *Nature (Lond)* **372**: 276-279
54. Cohlman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR (1994) *Science* **265**: 1405-1412
55. Żylińska L, Rębas E, Lachowicz A, Lachowicz L (1998) *Post Biochem* **44**: 158-163
56. Ciarkowski J, Czaplewski C, Kaźmierkiewicz R, Politowska E (1998) *Wiad Chem* **52**: 432-447
57. Barańska J (1997) W: Nowak JZ, Zawilska JB (red) (1997) *Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja*, PWN, Warszawa, str. 28-41
58. Simon MJ, Strathmann MP, Gautam N (1991) *Science* **252**: 802-808
59. Stryer L (1991) *J Biol Chem* **266**: 10711-10714
60. Taylor CW (1990) *Biochem J* **272**: 1-13
61. Gilman AG (1989) *J Am Med Assoc* **262**: 1819-1825
62. Hulme EC, Birdsall NJ (1992) *Strategy and tactics in receptor binding studies w „Receptor-Ligand Interactions; A practical approach”*, Hulme EC Ed., Oxford University Press Inc., New York, str. 63-176
63. Eberly AN, De Graan PWE (1985) *Methods Enzymol* **109**: 129-156
64. Kelly PA, Katon M, Dijane J, Sakai S (1985) *Methods Enzymol* **109**: 156-170
65. Singh A, Thornton ER, Westheimer FH (1962) *J Biol Chem* **273**: PC3006
66. Bayley H (1983) *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, Amsterdam
67. Breslow R (1980) *Acc Chem Res* **13**: 170-177
68. Turro NJ (1978) *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park (CA), str. 374-377
69. Dorman G, Prestwich GD (1994) *Biochemistry* **33**: 5661-5673
70. Boyd ND, White CF, Cerpa R, Kaiser ET, Leeman SE (1991) *Biochemistry* **30**: 336-342
71. Servant G, Bosse R, Guilleminette G, Escher E (1994) *Peptides*, ESCOM, Leiden, 698-700
72. Shoelson SE, Lee J, Lynch CS, Backer JM, Pilch PF (1993) *J Biol Chem* **268**: 4085-4091
73. Williams KP, Shoelson SE (1993) *J Biol Chem* **268**: 5361-5364
74. Gorka J, McCourt DW, Schwartz BD (1989) *Pept Res* **2**: 376-380
75. O'Neil KT, Erickson-Viitanen S, DeGrado WF (1989) *J Biol Chem* **264**: 14571-14578
76. Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) *Science* **240**: 1310-1316
77. Cotecchia S, Exum S, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2896-2900
78. Kubo T, Bujo H, Akiba I, Nakai J, Mishina M, Numa S (1988) *FEBS Lett* **241**: 119-125
79. Frielle T, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9494-9498
80. Gajewski W (1983) *Genetyka ogólna i molekularna*, PWN, Warszawa
81. Yamano Y, Ohyama K, Chakai S, Guo DF, Inagami T (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 1426-1431
82. Savarese TM, Wang CD, Fraser CM (1992) *J Biol Chem* **267**: 11439-11448
83. Ho BY, Karschin A, Branchek T, Davidson N, Lester HA (1992) *FEBS Lett* **312**: 259-262
84. Fong TM, Yu H, Strader CD (1992) *J Biol Chem* **267**: 25668-25671
85. Fathi Z, Benya RV, Shapira H, Jensen RT, Battey JF (1993) *J Biol Chem* **268**: 14622-14626
86. Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch JP, Landau EM (1997) *Science* **277**: 1676-1681
87. Grigorieff N, Ceska TA, Downing KH, Baldwin JM, Henderson R (1996) *J Mol Biol* **259**: 393-421
88. Nathans J (1987) *Annu Rev Neurosci* **10**: 163-194
89. Gebhard FX, Schertler CV, Henderson R (1993) *Nature (Lond)* **326**: 770-772
90. Kimura Y, Vassilyev DG, Miyazawa A, Kidera A, Matsushima M, Mitsuaka K, Murata K, Hirai T, Fujioshi Y (1997) *Nature (Lond)* **389**: 206-210
91. Miyata A, Arimura A, Dahl RD, Minamino N, Vehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **164**: 567-574

92. Kimura C, Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Itoh Y, Onda H, Miyata A, Jiang L, Sahl RR, Stibbs HH, Arimura A, Fufino MA (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **166**: 81-89
93. Buscail L, Gourlet P, Cauvin A, De Neef P, Gossen D, Arimura A, Miyata A, Coy DH, Robberrecht P, Christophe J (1990) *FEBS Lett* **262**: 77-81
94. Gourlet P, De Neef P, Woussen-Colle MC, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Robberrecht P, Christophe J (1991) *Biochim Biophys Acta* **1066**: 245-251
95. Tatsuno I, Somogyvari-Vigh A, Mizuno K, Gottschall PE, Hidaka H, Arimura A (1991) *Endocrinology* **129**: 1797-1804
96. Rawlings SR, Canny BJ, Leong DA (1993) *Endocrinology* **132**: 1447-1452
97. Goth MI, Lyons CE, Canny BJ, Thorner MO (1992) *Endocrinology* **130**: 939-944
98. Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Weill C, Fiore RC, Tatsuno I, Bay V, Brenneman DE (1994) *Ann NY Acad Sci* **739**: 228-243
99. Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Roberrecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA (1998) *Pharmacol Rev* **50**: 265-270
100. Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991) *Endocrinology* **129**: 2787-2789
101. Shivers BD, Gores TJ, Gottschall PE, Arimura A (1991) *Endocrinology* **128**: 3055-3065
102. Cao YJ, Kojro E, Gimpl G, Jasionowski M, Kasprzykowski F, Łankiewicz L, Fahrenholz F (1997) *Eur J Biochem* **244**: 400-406
103. Cao YJ, Kojro E, Jasionowski M, Łankiewicz L, Grzonka Z, Fahrenholz F (1998) *Ann NY Acad Sci* **865**: 82-91
104. *Methods in Enzymology* (1990) Deutscher MP ed., Academic Press Inc., San Diego **182**

Zgłaszanie prac doświadczalnych do nagrody im. J. K. Parnasa

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przypomina, że wszyscy członkowie Towarzystwa mają prawo do zgłaszania na ręce Zarządu Głównego Towarzystwa kandydatur do Nagrody im. Jakuba Karola Parnasa na najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w polskim laboratorium i opublikowaną w 1999 roku. Termin zgłaszania kandydatur upływa z dniem 30 kwietnia 2000. Zgłoszone prace zostaną przekazane Komisji ds. Nagrody im. Jakuba Karola Parnasa.

Sprawozdanie z pobytu w Rumunii w ramach Grupy Roboczej FEBS-u utworzonej dla poprawy sytuacji w dziedzinie biochemii w krajach Centralnej i Wschodniej Europy

Grupa Robocza FEBS-u, w skład której wchodzi profesorowie: G. Dirheimer (przewodniczący FEBS-u), J. E. Celis (sekretarz generalny FEBS-u), I. Mowbray (skarbnik FEBS-u), P. N. Campbell (koordynator FEBS-u do spraw pomocy krajom Europy Wschodniej) oraz członkowie: A. El'skaya (Ukraina), J. Barańska (Polska), I. Safarik (Republika Czeska) i S. Szedlacsek (Rumunia) spotkała się w Bukareszcie w dniach 6-9 lutego 2000 r. Program pobytu obejmował wizyty w Instytucie Biochemii oraz Biologii Komórki i Patologii, należących do Rumuńskiej Akademii Nauk, oraz wizytę na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Bukareszcie, podlegającym Ministerstwu Oświaty. Wizytowano także Instytut Żywności i Chemii Farmaceutycznej, mające charakter Instytutów Resortowych. Ponadto Grupa spotkała się z przedstawicielami Ministerstwa Oświaty i prezesem Rumuńskiej Akademii Nauk, prof. E. Simionem. W wyniku tych wizyt i spotkań oraz dogłębnych dyskusji powstało pogłębione opracowanie: „Report of the FEBS Working Group to explore ways of improving assistance to Central and Eastern Europe”, dostępne na stronie internetowej Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: www.ptbioch.edu.pl. W Raporcie tym przedstawiono szereg propozycji zmierzających do poprawy sytuacji i usprawnienia pracy rumuńskich kolegów. Spotkania Grupy Roboczej w poszczególnych krajach Europy Centralnej i Wschodniej będą odbywały się corocznie.

Członek Grupy Roboczej FEBS-u,
Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
Profesor Jolanta Barańska

Rola katepsyn cysteinowych oraz ich inhibitorów w procesach fizjologicznych i nowotworowych

The role of cysteine cathepsins and their inhibitors in physiological and neoplastic processes

IZABELA BERDOWSKA¹, MACIEJ SIEWIŃSKI²

Spis treści:

- I. Ogólna charakterystyka katepsyn cysteinowych oraz ich inhibitorów
 - I-1. Lizosomalne proteazy cysteinowe
 - I-2. Białkowe inhibitory proteaz cysteinowych
 - I-3. Udział katepsyn cysteinowych w procesach fizjologicznych
- II. Katepsyny cysteinowe i ich inhibitory w nowotworach
 - II-1. Hipotetyczny mechanizm działania proteaz cysteinowych w nowotworach
 - II-2. Potencjalne mechanizmy prowadzące do wzrostu aktywności katepsyn cysteinowych w nowotworach
 - II-3. Inhibitory proteaz cysteinowych jako czynniki antynowotworowe

Contents:

- I. Characterization of cysteine cathepsins and their inhibitors
 - I-1. Lysosomal cysteine proteases
 - I-2. Proteinous inhibitors of cysteine proteases
 - I-3. Participation of cysteine cathepsins in physiological processes
- II. Cysteine cathepsins and their inhibitors in tumours
 - II-1. Hypothetical mechanism of cysteine proteases activity in tumours
 - II-2. Potential mechanisms leading to the rise in activity of cysteine cathepsins in tumours
 - II-3. Inhibitors of cysteine proteases as antitumorigenic agents

Wykaz stosowanych skrótów: bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; CA-074 — L-trans-epoksybursztynilo-L-izoleucylo-L-prolino-propylamid; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; E-64 — epoksybursztynilo-L-leucylo-4-guanidynobutan; IFN- γ — interferon gamma; PAI-1/2 — inhibitor aktywatora plazminogenu typu urokinazy; PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostu; 12-(S)- HETE — kwas 12(S)-hydroksy-eikozotetraenowy; TIMP - tkankowy inhibitor metaloproteaz; TNF- α — czynnik martwicy nowotworów; tPA — tkankowy aktywator plazminogenu; uPA — aktywator plazminogenu typu urokinazy; VEGh — białko gruczołu von Ebnera; Z-F-F-CHN₂ — karbobenzoksy-fenylalaninylofenylalanino-diazometyloketon.

I. Ogólna charakterystyka katepsyn cysteinowych oraz ich inhibitorów

I-1. Lizosomalne proteazy cysteinowe

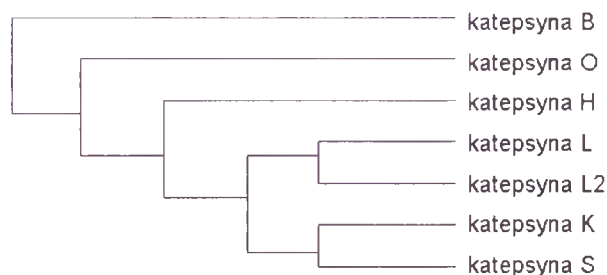
Do grupy enzymów katalizujących hydrolizę białek zaliczamy proteazy cysteinowe, serynowe,

aspartylowe i metaloproteazy. Proteazy cysteinowe występujące u ssaków można podzielić na dwie nadrodziny, z których pierwszą stanowią kaspazy, a drugą nadrodzina papainy proteaz cysteinowych. Kaspazy nie wykazują podobieństwa strukturalnego z nadrodziną papainy. Jedyną cechą wspólną jest występowanie cysteiny w centrum aktywnym [1]. Rola tych enzymów w procesach zapalnych i programowanej śmierci komórki jest coraz lepiej poznawana i doczekała się ostatnio wielu prac poglądowych (m. in. w „Postęпах Biochemii”: [2, 3]). Do nadrodziny papainy proteaz cysteinowych można zaliczyć:

1. Kalpainy (omówione w „Postęпах Biochemii”: [4]).
2. Hydrolazy bleomycyny — które poprzez inaktywację bleomycyny chronią ludzkie komórki nowotworowe przed jej toksycznością. Występują prawdopodobnie w cytosolu w postaci heksamerów, przypominających budową proteasom 20 S [1, 5].
3. Rodzinę papainy — dobrze zbadaną grupę enzymów mającą ponad 80 przedstawicieli w bazie danych [1].

¹Dr, ²Dr hab., Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław, e-mail: iza@bioch.am.wroc.pl

Obecna praca traktuje o należących do tej trzeciej grupy lizosomalnych proteazach cysteinowych, nazywanych też katepsynami cysteinowymi. Właściwości tych enzymów omówiono w „Postęпах Biochemii” wiele lat temu [6], jednak od tego czasu pojawiło się sporo nowych informacji. Dotychczas sklonowano i zsekwencjonowano 11 ludzkich katepsyn cysteinowych: katepsyna B [7], L [8], H [9], S [10], O [11], K [12], C [13], W [14], F [15], L2 [16] i Z [17] (dane zebrano w Tab. 1). W 1998 roku pojawiły się doniesienia, w których opisano nowe katepsyny: V [18] i X [19]. Okazały się one jednak identyczne z katepsynami L2 i Z odkrytymi nieco wcześniej przez Santamarię i in. [16, 17] (V = L2 i X



Ryc. 1. Dendrogram oparty na sekwencji aminokwasowej dojrzałych form ludzkich katepsyn cysteinowych (na podstawie [18]).

= Z). Porównując sekwencje aminokwasowe A d a c h i W. i in. [18] skonstruowali dendrogram obrazujący stopień podobieństwa enzymów (Ryc. 1). Brak na nim katepsyn W, F, Z i C. Katepsyna W wykazuje jedynie 21-31% homologii z innymi enzymami [14], za wyjątkiem katepsyny F, do której jest podobna w 58% [15]. Katepsyna F natomiast wykazuje około 40% homologii z katepsynami B, L, K, S, H i O [15]. Dojrzała katepsyna Z jest w około 30% identyczna z ludzkimi katepsynami B, C, H, L, K, O, S i W, a ponadto zawiera bardzo krótki proregion, co może świadczyć o jej przynależności do nowej podgrupy proteaz papainopodobnych [19]. Odrębnym nieco enzymem jest katepsyna C, która w przeciwieństwie do pozostałych lizosomalnych proteaz cysteinowych papainopodobnych ma strukturę wielopodjednostkową: składa się z 4 identycznych monomerów o $M_r=50$ kD zawierających 3 różne łańcuchy polipeptydowe i ma zdolność do równoczesnego przyłączania 4 cząsteczek substratu [20]. Struktura genu katepsyny C pozwala przypuszczać, że upodobniła się ona do innych członków tej rodziny przez konwergencję. Podczas gdy inne katepsyny cysteinowe mają geny zbudowane z około 10 eksonów przedzielonych intronami, to gen katepsyny C składa się jedynie z dwóch eksonów i jednego intronu [21, 22].

Powszechnie w wielu tkankach występują katepsyny B, L, H, F, O, Z i C, natomiast ograniczoną loka-

lizację stwierdzono w przypadku katepsyn S, K, W i L2. Katepsyny S i W występują w narządach i komórkach związanych z układem immunologicznym, jak śledziona, węzły chłonne, leukocyty, przy czym katepsyna W głównie w limfocytach T cytotoksycznych [14, 23]. Katepsyna L2 ulega ekspresji przede wszystkim w grasicy, jądrach, nabłonku rogowki i w nowotworach [18, 16], a charakterystycznym miejscem występowania katepsyny K są osteoklasty [12] (patrz Tab. 1). Niedawno zidentyfikowano w lizosomach człowieka proteazę cysteinową nie należącą do rodziny papainy — legumainę, która do tej pory uważana była za enzym występujący tylko u roślin strączkowych i kilku bezkręgowców [24].

I-2. Białkowe inhibitory proteaz cysteinowych

Praca pogładowa dotycząca inhibitorów proteaz cysteinowych ukazała się w „Postęпах Biochemii” w 1987 roku [25]. W organizmie człowieka istnieje kilka rodzajów tych białek, które można podzielić na trzy rodziny: stefiny, cystatyny i kininogeny [26-31]. Pokrewieństwo tych inhibitorów przedstawiono na rycinie 2. Do najmniejszych inhibitorów o masie około 11 kD należą stefiny A i B, przy czym niektórzy zaliczają do tej rodziny również białko p21 kodowane przez protoonkogen *ras*. Wydaje się jednak, że białko to mogło się upodobnić do stefin w wyniku konwergencji [28]. Cystatyny to białka o masie około 14 kD występujące głównie w płynach fizjologicznych [28]. Najbardziej rozpowszechniona jest cystatyna C, której obecność zarejestrowano zarówno poza-, jak i wewnątrzkomórkowo we wszystkich tkankach [27, 28]. Duże stężenie tego inhibitora występuje zwłaszcza w płynie mózgowo-rdzeniowym [28]. Charakterystycznymi dla śliny inhibitorami są natomiast cystatyny S, SN, SA i D [30]. Niedawno odkryto nowe cystatyny; F występującą głównie w śledzionie i leukocytach [32] i E/M znajdującą się w wielu tkankach, a zwłaszcza w nabłonku [33, 34]. Ten drugi inhibitor został wyizolowany równocześnie przez dwa zespoły naukowe, które nadały mu nazwę cystatyna E [34] i cystatyna M [33]. Obydwie cystatyny F i E/M różnią się od pozostałych tym, że

zawierają reszty węglowodanowe, co zwiększa ich masę do ponad 20 kD [33, 34]. Ponadto struktura cystatyny F jest prawdopodobnie stabilizowana przez trzy mostki disiarczkowe, podczas gdy pozostałe cy-

cha niezmiennego p41, który hamuje katepsynę L i H [37, 38]. Zdolność do hamowania katepsyn cysteinowych wykazano również w przypadku białka VEGh. Należy ono do lipokalin ślinowych (białek

Tabela 1.

Charakterystyka katepsyn cysteinowych

Katepsyna	EC [131]	Lokalizacja na chromosomie	Liczba aminokwasów preprokatepsyny *	Występowanie
B	3.4.22.1	8p22 [73]	339 (17+62+260) [131]	P; wątroba, tarczyca, nerki, śledziona [134]
L	2.4.22.15	9q22 [132]	333 [63]	P; wątroba, tarczyca, nerki [134]
H	3.4.22.16	15q24 [131]	335 [14]	P; śledziona, nerki, wątroba [135]
S	3.4.22.27	1q21 [133]	331 (114+217) [131]	O; śledziona, węzły chłonne, serce, mózg, jelita, płuca [23]
O	3.4.22.-	-	321 [11]	P; wątroba, nerki, łożysko, jajniki [11]
K	3.4.22.38	1q21 [131]	329 (15+99+215) [131]	O; osteoklasty [62, 69], fibroblasty maziowe [70]
W	3.4.22.-	11q13 [21]	376 (21+106+249) [14]	O; śledziona, węzły chłonne (zwłaszcza limfocyty T cytotoksyczne) [14]
F	3.4.22.-	-	302 (88+214) [15]	P; serce, mięśnie szkieletowe, mózg, jądra, jajniki [15]
Z	3.4.22.-	20q13 [17]	303 (23+38+242) [17]	P; wątroba, nerki, łożysko, płuca [17, 19]
L2	3.4.22.-	-	334 [16]	O; rogówka [18], jądra, grasica [16]
C	3.4.14.1	11q14 [22]	200 kD ** (4 podjedn. x 50 kD) [20]	P; nerki, łożysko, płuca [22]

Objaśnienia: EC — *enzyme commission*; klasyfikacja zgodna ze wskazaniami Komitetu Nomenklatury Międzynarodowego Związku Biochemii i Biologii Molekularnej (NC-IUBMB); O — występowanie ograniczone do specyficznych narządów; P — występowanie powszechne w wielu organach; wymieniono narządy charakteryzujące się najwyższą ekspresją enzymu; *w nawiasach podano ilość aminokwasów sekwencji sygnałnej, propeptydu i enzymu dojrzałego (w katepsynie F nie stwierdzono peptydu sygnałnego, a w rubryce dotyczącej katepsyny S przedstawiono długość peptydu sygnałnego i propeptydu łącznie); **dla katepsyny C zamiast liczby aminokwasów podano jej masę cząsteczkową.

statyny (C, D, S, SA, SN i E/M) mają po dwa mostki [29, 33, 34]. Jeszcze jedną cechą odróżniającą cystatynę E/M jest niższy stopień podobieństwa do innych inhibitorów tej rodziny (tylko 30-35% identyczności) i odmienne umiejscowienie genu (na chromosomie 11, a nie na 20, jak u pozostałych) [32]. Trzecia rodzina inhibitorów proteaz cysteinowych; kininogeny, jest dobrze znana ze względu na rolę w zapaleniu i kaskadzie krzepnięcia krwi [35]. Jedną z ich funkcji stanowi uwalnianie kinin (np. bradykininy) [31], a ponadto posiadają własności inhibitorowe, mając zdolność do przyłączania dwóch katepsyn cysteinowych [36].

Istnieją również białka charakteryzujące się zdolnością hamowania proteaz cysteinowych, których nie można zaliczyć do żadnej z tych trzech rodzin. Ostatnio wyodrębniono taką grupę inhibitorów, dla których zaproponowano nazwę „tyropiny” (inhibitory proteaz zawierające domenę typu I tyreoglobuliny) [37]. Do tyropin należy fragment łańcu-

mających zdolność do wiązania ligandów hydrofobowych) [39]. Podobnie, badając właściwości antygeny raka płaskonabłonkowego SCCA1, wykazano, że należy on do inhibitorów proteaz cysteinowych [40]. Antygen ten, wykorzystywany jako wskaźnik świadczący o bardziej zaawansowanych stadiach raka, istnieje w dwóch formach: SCCA1 i 2. Na podstawie sekwencji aminokwasowej obydwa białka zaliczono do nadrodziny inhibitorów proteaz serynowych, zwanych serpinami. Okazało się jednak, że tylko SCCA2 hamuje enzymy należące do tej grupy (jak katepsyna G). SCCA1 natomiast hamował katepsyny S, L i K, a nie wykazywał aktywności wobec trypsyny, czy aktywatora plazminogenu uPA [40].

I-3. Udział katepsyn cysteinowych w procesach fizjologicznych

Do niedawna główną rolą, jaką przypisywano katepsynom cysteinowym, była końcowa proteoliza

białek w lizosomach, zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i wchłanianych z zewnątrz na drodze endocytozy [41, 42] (o proteolizie lizosomalnej w kontekście proteolizy wewnątrzkomórkowej traktuje artykuł opublikowany w „Postęпах Biochemii”: [43]). Ostatnio, wraz z odkrywaniem i charakterystyką nowych przedstawicieli tej rodziny, staje się jasne, że biorą one udział w wyspecjalizowanych procesach. Przekształcając wiele proenzymów, prohormonów i neuropeptydów w formy aktywne [44-48], biorą udział w procesach zapłodnienia [49, 50] i rozwoju płodu [51], jak również w proliferacji komórek [50] i ich różnicowaniu się [51-54]. Stwierdzono ponadto ich udział w prezentacji antygenów [41, 55-60], przemianach tkanki chrzęstnej i kostnej [61-65] oraz w apoptozie [66-68] (Tab. 2).

W procesach prowadzących do prezentacji antygenów w kompleksie z cząsteczkami MHC klasy II biorą prawdopodobnie udział katepsyny S, L i B. Katepsyna B (podobnie jak proteazy aspartylowe) uczestniczy w proteolizie białek z utworzeniem peptydów antygenowych [55], natomiast katepsyny S i L degradują łańcuch niezmienny Ii [58, 59]. Łańcuch ten pełni istotną funkcję podczas syntezy i dojrzewania białek $\alpha\beta$ MHCII; przyłączając się do nich w retikulum endoplazmatycznym stabilizuje kompleks i zapobiega przedwczesnemu wiązaniu się peptydów antygenowych. Istotnym etapem jest więc degradacja łańcucha i zwolnienie rowka, do którego następnie przyłącza się peptyd. Kiedy to nastąpi, cały kompleks wędruje na powierzchnię błony komórki prezentującej antygen. W świetle najnowszych badań wydaje się, że zarówno katepsyna S, jak i L biorą udział w proteolizie łańcucha Ii, uczestniczą one jednak w stosunkowo późnych etapach degradacji. Zahamowanie aktywności tych enzymów powodowało bowiem gromadzenie się krótkich N-końcowych polipeptydów Ii [58, 59]. Na wcześniejszym etapie proteolizy muszą więc działać inne enzymy. Wydaje się ponadto, że katepsyny S i L swoje funkcje spełniają w odmiennych rodzajach komórek. Katepsyna L jest niezbędna do degradacji Ii w nabłonkowych komórkach kory grasicy, ale nie w komórkach prezentujących antygen pochodzących ze szpiku kostnego, gdzie właśnie katepsyna S miałaby pełnić główną rolę [59]. Udział katepsyny S w prezentacji antygenów stwierdzono w komórkach dendrytycznych [60] i limfocytach B [57]. Podanie myszom specyficznego inhibitora dla tej katepsyny selektywnie zahamowało jej aktywność w splenocytach, powodując nagromadzenie się produktu przejściowego proteolizy łańcucha niezmiennego, osłabienie wiązania się cząsteczek MHC klasy II z antygenem i zahamowa-

nie prezentacji antygenów [58]. Natomiast myszy pobawione genu kodującego katepsynę L wykazywały

Tabela 2.

Udział katepsyn cysteinowych w procesach fizjologicznych i patologicznych

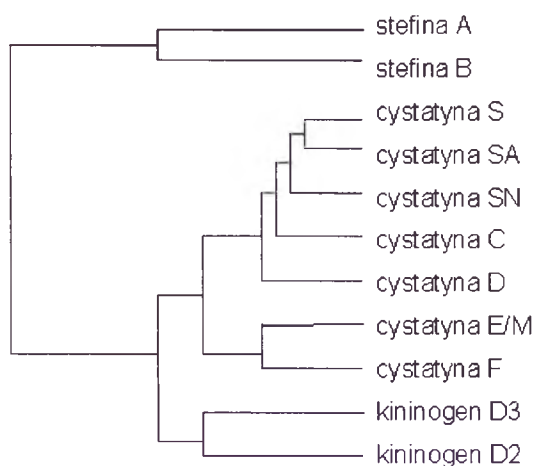
Funkcja fizjologiczna	Katepsyna
prezentacja antygenów w kompleksie z MHCII	B [55], L [59], S [57, 58, 60]
przemiany tkanki chrzęstnej i kostnej	K [63, 64, 69]
apoptoza	B [66, 68]
aktywacja proenzymów, prohormonów	B, H, L [44-48]
aktywacja proteaz serynowych w komórkach układu odpornościowego	C [22]
zapłodnienie i rozwój płodu	L [49-51]
różnicowanie się komórek	L [51], B [53]
Funkcja patologiczna	Katepsyna
nowotwory (przegląd w [79, 80, 136]):	
sutka	B, L, H [137], L2 [16]
jelita grubego	B, L [138], L2 [16]
płuc	B, L [139]
głowy i szyi	B, L, H * [140]
gruczołu krokowego	B [141]
jajnika	B [82]
trzustki	B [142], L [143]
żołądka	B, L [144]
wątroby	B [145]
czerniak	B, L, H [87]
glejaki	B, L, S [79], H [95]
inne choroby	
piknodysostoza	K [65]
choroba reumatoidalna	K [70]
zapalenie przyzębia	B, L, H [76, 77]
miopatie	B [75], L [74]
stwardnienie rozsiane	B [146]
choroby mózgu związane z odkładaniem się złogów amyloidu (np. choroba Alzheimera)	B, L, H [73]

Objaśnienia: * Wykazano obniżoną ekspresję katepsyny H w tkance nowotworowej w porównaniu z prawidłową.

obniżoną o około 70% ilość limfocytów TCD4+ zarówno w grasicy, jak i w obwodowej części układu limfatycznego [59]. Okazało się, że brak aktywnej katepsyny L w komórkach nabłonkowych kory grasi-

cy powodował gromadzenie się fragmentów łańcucha II, co zaburzało prezentację antygeny i selekcję pozytywną limfocytów [59].

Funkcja fizjologiczna, jaką przypisuje się katepsynie K związana jest z przemianą tkanki kostnej, w której zachodzi dynamiczny proces resorpcji i odtworzenia kości. Faza resorpcji przeprowadzana jest przez osteoklasty, które przywierają do powierzchni kości i doprowadzają do wytworzenia kompartmentu pozakomórkowego; tzw. dołka resorpcyjnego. Do dołka, w którym utrzymywane jest niskie pH, osteoklast wydziela proteazy. W tym kwaśnym środowisku powierzchnia mineralna kości ulega rozpuszczeniu i macierz białkowa zostaje udostępniona proteazom. Druga faza, „remodelowanie” polega na rekrutacji osteoblastów do odpowiednich miejsc, od-



Ryc. 2. Dendrogram przedstawiający pokrewieństwo ewolucyjne ludzkich inhibitorów katepsyn cysteinowych (na podstawie [32]).

budowie i mineralizacji macierzy białkowej [69]. Katepsyna K prawdopodobnie bierze udział w resorpcji macierzy białkowej, na co wskazuje specyficzna ekspresja tego enzymu w osteoklastach [62] oraz jego zdolność do proteolizy kolagenu typu I i II oraz osteonektyny budujących kości [63, 64]. Nieprawidłowości w ekspresji katepsyny K mogą być związane z chorobami kości lub stawów. Jedną z nich jest piknodysostoza, rzadkie schorzenie dziedziczne jako cecha recesywna. Charakteryzuje się sklerotyczną dysplazją szkieletu, co objawia się m. in. niskim wzrostem, łamliwymi i gęstymi kośćmi długimi, deformacjami czaszki. W schorzeniu tym liczba osteoklastów jest prawidłowa, ale zwiększony jest obszar demineralizacji kości otaczający poszczególne osteoklasty. W osteoklastach występują duże, nieprawidłowe wakuole cytoplazmatyczne zawierające włókna kolagenu kości. U pacjentów z tą chorobą znaleziono mutacje w genie katepsyny K. Jedna polega na „wyłączeniu” prawidłowego kodonu stop (w wyniku tranzykcji A do G zmienia się on w kodon dla tryptofanu), co powoduje produkcję polipeptydu dłuższego o 19 aminokwasów. W komórkach trans-

fekowanych tym zmutowanym genem nie stwierdzono obecności białka, co świadczy o tym, że mutacja powoduje nieprawidłowości w syntezie i dojrzewaniu lub stabilności enzymu. Druga mutacja polega na powstaniu przedwczesnego kodonu stop, co powoduje skrócenie polipeptydu o 89 aminokwasów. Ponieważ wraz z nimi enzym traci histydynę i asparaginę wchodzące w skład centrum aktywnego, efektem tej mutacji jest pozbawienie aktywności [65]. Wyniki te wskazują, że brak funkcjonalnej katepsyny K może być przyczyną osteosklerozy. Odwrotnie, choroby, w których obserwuje się nadmierną degradację tkanki kostnej, jak osteoporoza lub zapalenie stawów, mogą wynikać z podwyższonej aktywności enzymu. Argumentem przemawiającym za słusznością tej hipotezy jest fakt, że katepsyna K ulega ekspresji

w fibroblastach mazi stawowej, czyli komórkach przyczyniających się do degradacji kości w chorobie reumatoidalnej. Ponadto wykazano wzrost ekspresji enzymu w błonie maziowej pacjentów z tym schorzeniem [70]. Istnieją różne teorie próbujące wytłumaczyć rolę katepsyny K produkowanej przez fibroblasty maziowe w goście stawowym. Może być ona ograniczona do proteolizy fragmentów macierzy, które powstają w wyniku trawienia przez inne komórki, po ich internalizacji, lub też sama katepsyna K może być wydzielana i trawić składniki macierzy pozakomórkowo [70]. Można sądzić, że terapią odpowiednią w osteoporozie, lub zapaleniu stawów będzie hamowanie nadmiernej aktywności katepsyny K za pomocą specyficznego inhibitora (obecnie trwają prace nad jego stworzeniem), lub blokowanie ekspresji genu antysensownym RNA [65, 70].

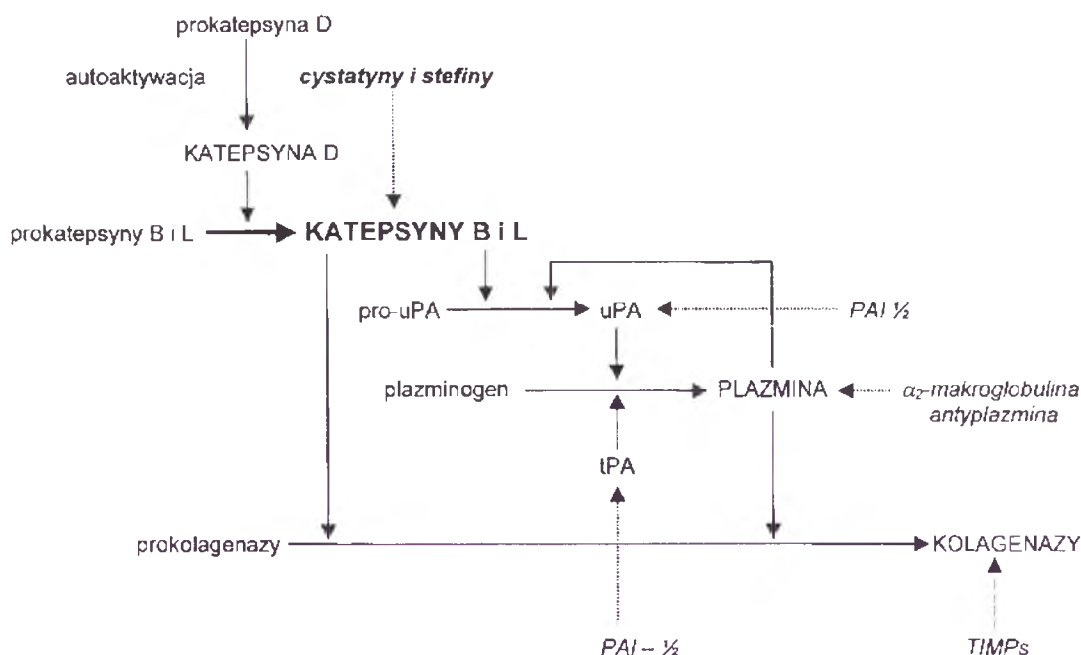
Programowana śmierć komórki jest zjawiskiem szeroko badanym w ostatnich latach. Pojawiły się sygnały, że oprócz kaspaz również katepsyny cysteinowe mogą tu odgrywać pewną rolę. Sprawę komplikuje fakt, że niektóre z inhibitorów kaspaz hamują aktywność katepsyny B *in vitro* i w hodowlach komór-

kowych w takich stężeniach, jakich zwykle używa się do hamowania kaspaz [66, 71]. Katepsyna B wydaje się uczestniczyć w apoptozie hepatocytów spowodowanej zastojem żółci, co jest cechą wielu przewlekłych chorób wątroby u ludzi. Enzym ten jest prawdopodobnie uaktywniany w następstwie pobudzenia receptora FAS i kaspazy 8 i jest, podobnie jak kaspaza 8 niezbędny, żeby zaszła apoptoza [66]. Czynnikiem działającym odwrotnie, czyli zapobiegającym śmierci komórek okazała się natomiast stefina A [67]. O udziale katepsyny B w apoptozie neuronów świadczy natomiast efekt, jaki wywołał specyficzny inhibitor tego enzymu CA-074. Przez dożylne podanie CA-074 udało się powstrzymać śmierć około 67% neuronów w obszarze CA1 hipo-

II. Katepsyny cysteinowe i ich inhibitory w nowotworach

II-1. Hipotetyczny mechanizm działania proteaz cysteinowych w nowotworach

Wiele zebranych dotychczas informacji wskazuje na istotny udział enzymów proteolitycznych w procesie wzrostu nowotworów i przerzutowaniu. Proteazy współdziałają ze sobą w degradacji struktur budujących macierz pozakomórkową i błony podstawne otaczające nowotwór, co ułatwia komórkom nowotworowym proliferację i rozsiewanie. Ważną rolę odgrywają tu katepsyny (głównie B i L). Zgodnie z istniejącą od kilku lat koncepcją uważa się, że ko-



Ryc. 3. Hipotetyczny mechanizm zmian aktywności enzymatycznej w procesach nowotworowych ([73, 78] — zmodyfikowane). Objasnienia: TIMP — tkankowy inhibitor metaloproteaz; tPA — tkankowy aktywator plazminogenu; uPA — aktywator plazminogenu typu urokinazy; PAI — 1/2 inhibitor aktywatora plazminogenu typu urokinazy

kampa mały po indukcji ischemii [68]. Inhibitor ten jest więc obiecującym lekiem, który mógłby ochronić neurony przed śmiercią spowodowaną niedokrwieniem, lub innymi procesami związanymi ze starzeniem się mózgu i chorobami degeneracyjnymi w obrębie ośrodkowego układu nerwowego [68]. Oprócz katepsyny B, w chorobach mózgu, takich jak stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera lub demencja starcza, istotną rolę pełnią prawdopodobnie katepsyny L i H (omówione w [72]). Inne stany patologiczne, w których katepsyny cysteinowe mają swój udział to choroby nowotworowe [73], rozedma płuc [1], dystrofia mięśniowa [74, 75], zapalenie tkanki mięśniowej [76, 77].

mórki nowotworowe wydzielają bądź eksponują na powierzchni prokatepsyny B i L, które następnie po uaktywnieniu przez katepsynę D, przekształcają prekursorzy aktywatora plazminogenu i kolagenaz do enzymów aktywnych. W efekcie tej kaskady aktywacyjnej wzrasta potencjał proteolityczny w otoczeniu nowotworu. Intensywność tych procesów regulują inhibitory aktywatora plazminogenu (PAI), metaloproteaz (TIMPs) i proteaz cysteinowych, będące naturalnymi czynnikami chroniącymi zdrowe tkanki przed nadmierną proteolizą [72, 78, 79] (Ryc. 3). Naruszenie równowagi enzym/inhibitor uważane jest więc za jedną z przyczyn rozwoju nowotworu. W trakcie tego procesu obserwuje się bowiem często

obniżenie stężenia inhibitorów, przy równoczesnym wzroście aktywności proteolitycznej [80]. (Układ związany z działaniem aktywatora plazminogenu w nowotworach opisano niedawno w „Postęпах Biochemii”: [81]).

Spośród lizosomalnych proteaz cysteinowych, najlepiej w progresji nowotworów jest udokumentowany udział katepsyn B i L. Zarówno w tkankach nowotworowych, jak i surowicy pacjentów obserwuje się wzrost ich ekspresji, która często jest dodatnio skorelowana ze stopniem zaawansowania choroby [82-92]. Enzymy te charakteryzują się również zdolnością do degradacji kolagenu typu IV, fibronektyny, lamininy i proteoglikanów budujących struktury pozakomórkowe [89, 90, 93, 94]. Coraz więcej pojawia się informacji o występowaniu innych katepsyn cysteinowych w nowotworach; H [87, 95], S [79], L2. Ta ostatnia jest przy tym szczególnie interesująca ze względu na to, że nie ulegając ekspresji w komórkach prawidłowych sutka i jelita grubego, pojawia się dopiero w komórkach nowotworowych tych organów [16]. Nowotwory, w których stwierdzono podwyższoną ekspresję i/lub aktywność katepsyn cysteinowych przedstawiono w Tabeli 2.

Innym aspektem działania proteaz cysteinowych może być uodpornienie komórek nowotworowych na atak ze strony układu immunologicznego. Wykazano, że prokatepsyna L ekspozycja na powierzchni komórek czerniaka chroni je przed lizą degradującą czynnik C3 komplementu, co prowadzi do nabycia przez komórki zdolności do przerzutowania [96, 97].

II-2. Potencjalne mechanizmy prowadzące do wzrostu aktywności katepsyn cysteinowych w nowotworach

Wiele badań obecnie koncentruje się na wyjaśnieniu mechanizmów prowadzących do nadmiernej ekspresji proteaz cysteinowych w nowotworach, która pociąga za sobą zwykle wzrost aktywności proteolitycznej. Przyczyną nadekspresji enzymu może być amplifikacja genu. Takie zjawisko zaobserwowano w gruczolakoraku przelyku, gdzie w 12% próbek stwierdzono 4-20-krotną amplifikację genu kodującego katepsynę B [98]. Wzrost ekspresji katepsyn cysteinowych wydaje się być także uzależniony od cząsteczek biorących udział w przekazywaniu sygnałów stymulujących wzrost i proliferację komórek. Wiele białek, takich jak cytokiny, ich receptory, białka przekaźnikowe, czynniki transkrypcyjne ulega w nowotworach nadmiernej aktywacji przekształcając się w czynniki onkogenne. Związek pomiędzy nimi a ekspresją proteaz cysteinowych jest

obecnie badany. Chociaż geny katepsyn B i L wykazują strukturę świadcząca o ich konstytutywnej ekspresji, to zawierają też elementy odpowiedzi na czynniki transkrypcyjne, jak AP1, który indukowany jest za pośrednictwem wielu cytokin i czynników wzrostowych, a w przekazywaniu sygnału bierze udział białko Ras [99, 100]. Pobudzający wpływ czynnika AP1 na transkrypcję genów katepsyn B i L wyjaśniałby wzrost ekspresji obydwu enzymów w wyniku aktywacji onkogenu *ras* [101-106]. Zhang i in. [107] oraz Janulis i in. [108] proponują istnienie dwóch fenotypów inwazyjnych, z których pierwszy charakteryzowałby się ekspresją katepsyn L, a drugi ekspresją aktywatora plazminogenu typu urokinazy (uPA). To, który gen ulegałby indukcji, zależałoby od rodzaju drogi sygnalizacyjnej uaktywnianej przez białko Ras i/lub typu onkogenu *ras*. Wydaje się, że enzymy te mogą działać alternatywnie wywołując taki sam efekt, jakim jest zwiększenie potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych, poprzez degradację otaczających je struktur istoty pozakomórkowej [107, 108]. Badając wpływ cytokin i innych cząsteczek sygnalizacyjnych na geny katepsyn, stwierdzono stymulację ich ekspresji, czemu często towarzyszył wzrost sekrecji enzymów. W komórkach NIH3T3 gen katepsyn L aktywowany był przez PDGF, EGF i estry forbolu [100]. Ekspresja genu katepsyn B natomiast wzrastała w linii ludzkich komórek białaczki promielocytowej — HL-60 pod wpływem retinoidów, estrów forbolu i kalcytriolu. W przeciwieństwie do innych induktorów, estry forbolu wydłużały okres półtrwania mRNA katepsyn B. Można stąd wnioskować, że induktory regulują ekspresję mRNA katepsyn B zarówno na poziomie transkrypcji, jak i potranskrypcyjnym [99]. Ishido i in. [100] zaproponowali natomiast hipotetyczny przebieg zdarzeń prowadzący do indukcji ekspresji katepsyn L przez takie cząsteczki, jak EGF, PDGF i estry forbolu. W komórkach prawidłowych do regionu promotorowego genu katepsyn L przyłączają się białka Sp-1 i NF-1, które utrzymują transkrypcję na poziomie podstawowym. W komórkach nowotworowych (np. po transformacji onkogenem *v-src*) i/lub poddanych działaniu czynników wzrostu uaktywnia się gen *egr1*. Powstałe białko Egr1 przyłącza się do regionu promotorowego genu katepsyn L w tym samym miejscu, co czynniki Sp-1 i NF1 wypierając je, i aktywuje gen. Hipoteza ta wydaje się prawdopodobna, gdyż wykazano, że obszar genu katepsyn L, do którego w komórkach nie-transformowanych przyłączają się białka Sp-1 i NF-1, zawiera sekwencję nukleotydową, do której mają powinowactwo białka rodziny Egr. Gen *egr1*

jest przy tym szczególnie interesujący, gdyż aktywowany jest za pośrednictwem EGF, PDGF i estrów forbolu, a ponadto ciągłą aktywację tego genu powoduje transformacja onkogenem *v-src*. [100]. Białko Egr mogłoby więc być pośrednikiem stojącym na szlaku sygnalizacyjnym pomiędzy cytokinami a genem katepsyny L.

Oprócz aktywacji transkrypcji, przyczyną wzrostu syntezy proteaz cysteinowych może być zwiększenie stabilności ich mRNA. Zaobserwowano bowiem, że niekiedy wzrostowi stężenia i aktywności katepsyny B nie towarzyszy wzrost stężenia jej transkryptu (np. w komórkach nabłonkowych piersi MCF-10A transfekowanych onkogenem *ras*) [109]. Takie transkrypty mogą powstawać albo w wyniku modyfikacji w składaniu pre-mRNA, albo pod wpływem czynników zewnętrznych zwiększających ich stabilność. O zachodzeniu alternatywnego składowania świadczy występowanie różnych form mRNA katepsyny B zarówno w tkankach prawidłowych, jak i w nowotworach. Podczas gdy w komórkach prawidłowych, w zależności od ich rodzaju, można spotkać mRNA o długości 2.3 lub 4.0 kpz, to w nowotworowych zdarzają się transkrypty krótsze (np. o długości 1.2 i 1.9 kpz w osteoklastoma albo 1.5 i 3.0 kpz w nowotworach okrężniczo-odbytniczych) lub dłuższe, zawierające dodatkowe eksony 2a/2b w regionie niekodującym (w nowotworach żołądka, prostaty i glejakach) [99]. Zwykle te różnice wynikają z dodawania lub wycinania odcinków mRNA w regionach niekodujących, jak to jest w przypadku transkryptów prawidłowych i niektórych pojawiających się nowotworach. Można przypuszczać, że te „dodatkowe” lub „brakujące” sekwencje nukleotydowe mają wpływ na regulację translacji [99]. Jednak niektóre transkrypty katepsyny B pozbawione są kilku pierwszych eksonów wraz z kodonem inicjującym translację (znaleziono je na przykład w komórkach glejaka) [110]. Ostatnio wykazano, że katepsyna B powstająca z takiego transkryptu jest funkcjonalnym aktywnym enzymem, chociaż pozbawionym sekwencji sygnałnej i ponad połowy propeptydu [111]. Brak sekwencji sygnałnej spowodował zmianę w lokalizacji enzymu; był on mianowicie związany z jądrem i błonami organelli, prawdopodobnie po stronie cytoplazmatycznej. Ponadto ta „nowotworowa” forma katepsyny B wykazywała około 30% aktywności wobec syntetycznego substratu bez konieczności usuwania fragmentu propeptydowego. Wydaje się więc, że skrócona forma katepsyny B w nowotworach jest biologicznie aktywna bez dalszej obróbki proteolitycznej [111].

Zgodnie z istniejącą obecnie koncepcją, katepsyny cysteinowe degradują białka macierzy w nowotworach głównie pozakomórkowo, próbuje się więc wytłumaczyć mechanizm prowadzący do sekrecji tych enzymów. Katepsyny mogą być wydzielane wskutek przeładowania systemu transportującego je do lizosomów, co wynikałoby ze wzmożonej ekspresji enzymów. Inną przyczyną mogą być nieprawidłowości w działaniu tego systemu (zaburzenia w ekspresji receptorów mannozo-6-fosforanu — RMan-6-P lub glikozylacji katepsyn). Brak lub szybką degradację RMan-6-P stwierdzono w liniach komórek nowotworowych [112]. Istnieją też przypuszczenia, że w komórkach nowotworowych przeważa inna droga kierowania proteaz cysteinowych do lizosomów, niezależna od RMan-6-P, która ulega zaburzeniom. Taki mechanizm został udowodniony w przypadku prokatepsyny D i istnieje też prawdopodobnie dla prokatepsyn L i B [99, 113, 114]. Na sekrecję enzymów może mieć wpływ także ich struktura pierwszorzędowa. Zaburzenia w transkrypcji, w wyniku których w nowotworach powstają skrócone formy mRNA, mogą powodować syntezę enzymów pozbawionych peptydu sygnałnego [99]. Takie białka nie wędrowałyby do retikulum endoplazmatycznego, lecz pozostawały w cytoplazmie, skąd w jakiś inny sposób mogłyby wydostawać się poza komórkę. Pokazano ponadto, że w procesie wydzielania prokatepsyny L niezbędny jest 11-aminokwasowy koniec karboksylowy. Brak dwóch aminokwasów w tym regionie blokował bowiem sekrecję, nie zakłócając przy tym transportu do lizosomów [115]. Innym sposobem wydzielania enzymów lizosomalnych może być egzocytoza [116]. Ostatnie badania wskazują, że 10-20% lizosomów znajdujących się w pobliżu błony plazmatycznej komórek prawidłowych jest zdolnych do egzocytozy uruchamianej jonami wapnia [99]. Nadmierny napływ Ca^{2+} do komórek nowotworowych (stymulowany np. działaniem cytokin) może być więc przyczyną tego procesu. Tłumaczyłoby to indukcję sekrecji katepsyn B i L przez cząsteczki sygnalizacyjne powodujące wzrost stężenia jonów wapnia. Zaobserwowano bowiem, że prokatepsyna L wydzielana jest w dużych ilościach przez mysie fibroblasty pod wpływem EGF, PDGF i estrów forbolu [100]. Ludzkie komórki fibroblastopodobne mazi stawowej w wyniku indukcji przez bFGF wydzielają prokatepsynę L, pod wpływem TNF- α i PDGF — prokatepsynę B, a wynikiem działania IFN- γ jest sekrecja obydwu tych enzymów [117]. Również eikozanoidy mogą indukować wydzielanie proteaz cysteinowych, co wy-

kazano w przypadku katepsyny B. Okazało się, że jedna z pochodnych kwasu arachidonowego 12-(S)-HETE indukuje wydzielanie aktywnego enzymu przez ludzkie komórki nabłonkowe piersi transfekowane zmutowanym onkogenem *ras*, ale nie przez komórki macierzyste [99]. Ten sam związek powodował sekrecję aktywnej katepsyny B przez ludzkie komórki nowotworu płuc w hodowli. Podczas gdy komórki tego nowotworu uwalniają konstytutywnie prokatepsynę B, to dopiero pod wpływem 12-(S)-HETE zaczęły wydzielać aktywny enzym, przy czym sekrecja jego formy prekursorowej nie wzrastała [118]. Proces ten zachodzi prawdopodobnie na drodze egzocytozy, gdyż pod wpływem 12-(S)-HETE zaobserwowano przesuwanie się pęcherzyków z katepsyną B w kierunku błony komórkowej i ich wydzielanie [119]. W ten sposób uwolnieniu może ulec do 70% całkowitej wewnątrzkomórkowej aktywności katepsyny B [118]. Opierając się na tych badaniach zaproponowano więc model dwóch odrębnych pul aktywnej katepsyny B: nie ulegającej uwolnieniu oraz wydzielanej na drodze regulowanej egzocytozy [99]. Katepsyna „sekrecyjna” mogłaby znajdować się w wyspecjalizowanych wydzielniczych lizosomach, które ulegałyby egzocytozie. Chociaż nie wykazano jednoznacznie, że takie struktury są w komórkach obecne, zebrano wiele danych przemawiających za ich istnieniem. Znalaziono pęcherzyki wydzielnicze, w których występowały enzymy charakterystyczne dla lizosomów, jak również lizosomy, które wyglądają i zachowują się jak pęcherzyki wydzielnicze i są zdolne do regulowanej egzocytozy [120]. O tym, że egzocytoza lizosomów, bądź organelli lizosomopodobnych może być rzeczywistym mechanizmem kierującym katepsyną na zewnątrz komórki świadczyłoby brak istotnych różnic w budowie pomiędzy katepsyną B lizosomalną a sekrecyjną w nowotworach. Obydwie formy wykazywały taką samą masę cząsteczkową, różniły się jedynie ładunkiem, co może wynikać z innego składu węglowodanowego [116].

Istnieje również hipoteza, że składniki macierzy pozakomórkowej mogą przedostawać się do komórki na drodze endocytozy i ulegać proteolizie wewnątrz lizosomów. *S a m e n i i S l o a n e* [99] zaobserwowali, że w komórkach nowotworu sutka dwóch różnych linii inne jest rozmieszczenie katepsyny B; w linii BT-20 enzym występuje w pęcherzykach rozprzestrzenionych w cytoplazmie i w końcowej części wypustek, natomiast w linii BT-549 znajduje się głównie okołojądrowo. Stwierdzono następnie, że komórki BT-20 degradują macierz pozakomórkowo, natomiast BT-549 wewnątrzkomórkowo.

Wyniki te wskazują, że różne rodzaje komórek nowotworowych mogą wykorzystywać inne mechanizmy prowadzące do degradacji macierzy, w których bierze udział katepsyna B [99].

Procesem prowadzącym do powstania dojrzałych — aktywnych form lizosomalnych proteaz cysteinowych jest ograniczona proteoliza, polegająca na usunięciu propeptydów. Nie wiadomo dokładnie, jakie enzymy biorą udział w odcinaniu propeptydów *in vivo*, może to się odbywać na drodze autoaktywacji lub przy udziale proteaz aspartylowych, takich jak katepsyna D [121, 122], lub serynowych (elastaza, katepsyna G, aktywator plazminogenu) [99]. Istnieją również informacje wskazujące na to, że prokatepsyny mogą być częściowo aktywne w wyniku oddziaływania ze strukturami pozakomórkowymi. Wykazano bowiem, że zarówno prekursorowa, jak i dojrzała forma katepsyny L degraduje białka macierzy pozakomórkowej w obecności glikozoaminoglikanów. Można przypuszczać, że poprzez oddziaływanie glikozoaminoglikanów z zasadowym rejonem propeptydu następuje odsłonięcie centrum aktywnego, co umożliwiłoby oddziaływanie z substratem [100].

Wyższe pH pozakomórkowe teoretycznie powinno dezaktywować wydzielane enzymy lizosomalne, które w warunkach prawidłowych działają w kwaśnym środowisku. Wyniki wielu doświadczeń wskazują jednak, że katepsyna B zachowuje aktywność wobec białek budujących macierz pozakomórkową [93] i substratów syntetycznych [123] w pH obojętnym, a ponadto aktywność tego enzymu może być stabilizowana przez substraty białkowe [93].

Istotnymi czynnikami, które neutralizują aktywność katepsyn cysteinowych, są ich białkowe inhibitory. Artykuł traktujący o roli cystatyn w procesach nowotworowych ukazał się ostatnio w „Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej” [26]. Wiele danych wskazuje, że białka te mogą ograniczać rozwój nowotworu.

II-3. Inhibitory proteaz cysteinowych jako czynniki antynowotworowe

Antynowotworowe działanie inhibitorów proteaz cysteinowych wykazano dotychczas w wielu eksperymentach. Powszechnie wykorzystywanym w badaniach niespecyficznym inhibitorem katepsyn cysteinowych jest E-64 wyizolowany z *Aspergillus japonicus*. Przy jego użyciu zdołano zahamować proliferację komórek ludzkiego nowotworu naskórka [124], jak również powstrzymać inwazję i migrację komórek nowotworowych pęcherza moczowego [125],

jajnika [126], płuc (typu drobnokomórkowego) [127] przez sztuczną błonę podstawną — Matrigel. Ten sam inhibitor hamował ponadto degradację lamininy przez frakcję błonową komórek inwazyjnych nowotworu pęcherza moczowego, oraz obniżał potencjał metastatyczny komórek nowotworowych, gdyż podawanie go myszom zapobiegało przerzutom [125].

Również zachęcające są próby hamowania inwazji komórek nowotworowych za pomocą bardziej specyficznych inhibitorów lub przeciwciał swoistych względem katepsyn B i L. Okazało się na przykład, że oprócz inhibitorów metaloproteaz (Batimastat, Marimastat), które hamują migrację komórek wielu nowotworów przez Matrigel, w niektórych nowotworach bardziej efektywne może być wykorzystanie inhibitorów katepsyn cysteinowych. Ludzkie komórki bezbarwnikowego czerniaka i gruczolakoraka sutka, które produkują i wydzielają duże ilości katepsyny B okazały się bardzo czułe na działanie specyficznego inhibitora tego enzymu; CA-074, natomiast komórki nowotworu płuc (typu wielkomórkowego) wykazujące wysoką ekspresję katepsyny L były bardzo wrażliwe na działanie specyficznego inhibitora dla tej właśnie katepsyny; Z-F-F-CHN₂ i propeptydu katepsyny S (hamującego selektywnie katepsyny S i L) [128]. Stosując natomiast przeciwciała dla katepsyn L i H udało się zahamować w ponad 90% migrację komórek glejaków wielopostaciowych przez Matrigel [95, 129]. Skuteczny okazał się także selektywny inhibitor katepsyny B podany dostnie szczurom, którym uprzednio wszczepiono do żyły wrotnej komórki raka okrężnicy. Komórki te wykazywały aktywność katepsyny B na powierzchni błony. Dzięki podaniu inhibitora, w wątrobie szczurów rozwinęło się o 60 % mniej nowotworów, które ponadto były pięciokrotnie mniejsze [130]. Wyniki te zachęcają do wykorzystania inhibitorów proteaz cysteinowych w terapii antynowotworowej.

Podziękowania

Pani Profesor Janinie Kwiatkowskiej-Korczak autorzy dziękują za cenne uwagi, bardzo pomocne przy przygotowywaniu tego artykułu.

Artykuł otrzymano 10 października 1999 r.
Zaakceptowano do druku 30 grudnia 1999 r.

Piśmiennictwo

- Chapman HA, Riese JR, Shi G-P (1997) *Annu Rev Physiol* **59**: 63-88
- Grzelakowska-Sztabert B (1998) *Post Biochem* **44**: 8-21
- Widłak P (1998) *Post Biochem* **44**: 252-254
- Jakubiec-Puka A (1993) *Post Biochem* **39**: 251-258
- Joshua-Tor L, Xu HE, Johnston SA, Rees DC (1995) *Science* **269**: 945-950
- Korzus G, Turyna B (1988) *Post Biochem* **34**: 23-46
- Chan SJ, San Segundo B, McCormick MB, Steiner DF (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7721-7725
- Gal S, Gottesman MM (1988) *Biochem J* **253**: 303-306
- Ritonja A, Popovic T, Kotnik M, Machleidt W, Turk V (1988) *FEBS Lett* **228**: 341-345
- Shi G-P, Munger JS, Meara JP, Rich DH, Chapman HA (1992) *J Biol Chem* **267**: 7258-7262
- Velasco G, Ferrando AA, Puente XS, Sánchez LM, López-Otín C (1994) *J Biol Chem* **269**: 27136-27142
- Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M, Kokubo T (1995) *Biochem Biophys Res Comm* **206**: 89-96
- Paris A, Strukelj B, Pungercar J, Renko M, Dolenc I, Turk V (1995) *FEBS Lett* **369**: 326-330
- Linnevers C, Smeekens SP, Brömme D (1997) *FEBS Lett* **405**: 253-259
- Wang B, Shi GP, Yao PM, Li Z, Chapman HA, Brömme D (1998) *J Biol Chem* **273**: 32000-32008
- Santamaria I, Velasco G, Cazorla M, Fueyo A, Campo E, López-Otín C (1998) *Cancer Res* **58**: 1624-1630
- Santamaria I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, López-Otín C (1998) *J Biol Chem* **273**: 16816-16823
- Adachi W, Kawamoto S, Ohno I, Nishida K, Kinoshita S, Matsubara K, Okubo K (1998) *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**: 1789-1796
- Nägler DK, Ménard R (1998) *FEBS Lett* **434**: 135-139
- Dolenc I, Turk B, Pungercic G, Ritonja A, Turk V (1995) *J Biol Chem* **270**: 21626-21631
- Wex T, Levy B, Smeekens SP, Ansorge S, Desnick RJ, Bromme D (1998) *Biochem Biophys Res Comm* **248**: 255-261
- Rao NV, Rao GV, Hoidal RJ (1997) *J Biol Chem* **272**: 10260-10265
- Schmid H, Koop M, Utermann S, Lambacher L, Mayer P, Schaefer L (1997) *Biol Chem* **378**: 61-69
- Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt I, Walls C, Barrett AJ (1997) *J Biol Chem* **272**: 8090-8098
- Warwas M, Sawicki G (1987) *Post Biochem* **33**: 231-241
- Warwas M, Haczyńska H (1998) *Post Hig Med Dośw* **52**: 515-526
- Turk V, Bode W (1991) *FEBS Lett* **285**: 213-219
- Calkins CC, Sloane BF (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**: 71-80
- Abrahamson M (1994) *Methods Enzymol* **244**: 685-700
- Henskens YMC, Veerman EC1, Nieuw Amerongen AV (1996) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **377**: 71-86
- Bobek LA, Levine MJ (1992) *Crit Rev Oral Biol Med* **3**: 307-332
- Ni J, Fernandez MA, Danielsson L, Chillakuru RA, Zhang J, Grubb A, Su J, Gentz R, Abrahamson M (1998) *J Biol Chem* **273**: 24797-24804
- Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R (1997) *J Biol Chem* **272**: 903-910
- Ni J, Abrahamson M, Zhang M, Fernandez MA, Grubb A, Su J, Yu G-L, Li Y, Parmelee D, Xing L, Coleman TA, Gentz S, Thotakura R, Nguyen N, Hesselberg M, Gentz R (1997) *J Biol Chem* **272**: 10853-10858
- DeLa Cadena RA, Colman RW (1991) *Trends Pharmacol Sci* **12**: 272-275
- Turk B, Stoka V, Björk I, Boudier Ch, Johansson G, Dolenc I, Colic A, Bieth JG, Turk V (1995) *Protein Sci* **4**: 1874-1880
- Lenarčič B, Bevec T (1998) *Biol Chem* **379**: 105-111
- Ogrinc T, Dolenc I, Ritonja A, Turk V (1993) *FEBS Lett* **336**: 555-559

39. van't Hof W, Blankenvoorde MFJ, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV (1997) *J Biol Chem* **272**: 1837-1841
40. Schick C, Pemberton PA, Shi GP, Kamachi Y, Cataltepe S, Bartuski AJ, Gornstein ER, Brömme D, Chapman HA, Silverman GA (1998) *Biochemistry* **37**: 5258-5266
41. Authier F, Posner BI, Bergeron JJM (1996) *FEBS Lett* **389**: 55-60
42. Authier F, Mort JS, Bell AW, Posner BI, Bergeron JJM (1995) *J Biol Chem* **270**: 15798-15807
43. Staszczak M, Zdunek E (1999) *Post Biochem* **45**: 32-41
44. Tooze J, Hollinshead M, Hensel G, Kern HF, Hofflack B (1991) *Eur J Cell Biol* **56**: 187-200
45. Furuhashi M, Nakahara A, Fukutomi H, Kominami E, Grube D, Uchiyama Y (1991) *Histochemistry* **95**: 231-239
46. Brix K, Lemansky P, Herzog V (1996) *Endocrinology* **137**: 1963-1974
47. Okamura-Oho Y, Zhang S, Callahan JW, Murata M, Oshima A, Suzuki Y (1997) *FEBS Lett* **419**: 231-234
48. Jutras I, Reudelhuber TL (1999) *FEBS Lett* **443**: 48-52
49. Erickson-Lawrence M, Zab Ludoff SD, Wright WW (1991) *Mol Endocrinol* **5**: 1789-1798
50. McDonald JK, Emerick JMC (1995) *Arch Biochem Biophys* **323**: 409-422
51. Hamilton RT, Bruns KA, Delgado MA, Shim J-K, Fang Y, Denhardt DT, Nilsen-Hamilton M (1991) *Mol Repr Develop* **30**: 285-292
52. Jane DT, Dufresne MJ (1994) *Biochem Cell Biol* **72**: 267-274
53. Béchet DM, Ferrara MJ, Mordier SB, Roux M-P, Deval ChD, Obled A (1991) *J Biol Chem* **266**: 14104-14112
54. Tanabe H, Kumugai N, Tsukahara T, Ishiura S, Kominami E, Nishina H, Sugita H (1991) *Biochim Biophys Acta* **1094**: 281-287
55. Katunuma N, Matsunaga Y, Saibara T (1994) *Adv Enz Regul* **34**: 145-158
56. Rodriguez GM, Diment S (1995) *Eur J Immunol* **25**: 1823-1827
57. Riese RJ, Wolf PR, Brömme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA (1996) *Immunity* **4**: 357-366
58. Riese RJ, Mitchell RN, Villadangos JA, Shi GP, Palmer JT, Karp ER, De Sanctis GT, Ploegh HL, Chapman HA (1998) *J Clin Invest* **101**: 2351-2363
59. Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY (1998) *Science* **280**: 450-453
60. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Ebner C, Petzelbauer P, Shi GP, Chapman HA, Stingl G (1998) *J Immunol* **161**: 2731-2739
61. Debari K, Sasaki T, Udagawa N, Rifkin BR (1995) *Calcif Tissue Int* **56**: 566-570
62. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Riemann D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M (1996) *J Biol Chem* **271**: 12511-12516
63. Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA (1996) *J Biol Chem* **271**: 12517-12524
64. Kafienah W, Brömme D, Buttler DJ, Croucher LJ, Hollander AP (1998) *Biochem J* **331**: 727-732
65. Gelb BD, Shi G-P, Chapman HA, Desnick RJ (1996) *Science* **273**: 1236-1238
66. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ (1999) *J Clin Invest* **103**: 137-145
67. Jones B, Roberts PJ, Faubion WA, Kominami E, Gores GJ (1998) *Am J Physiol* **275**: G723-730
68. Yamashita T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E (1998) *Eur J Neurosci* **10**: 1723-1733
69. LaLonde JM, Zhao B, Janson CA, D'Alessio KJ, McQueney MS, Orsini MJ, Debouck CM, Smith WW (1999) *Biochemistry* **38**: 862-869
70. Hummel KM, Petrow PK, Franz JK, Müller-Ladner U, Aicher WK, Gay RE, Brömme D, Gay S (1998) *J Rheumatol* **25**: 1887-1894
71. Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenaebelle P, Beyaert R (1999) *FEBS Lett* **442**: 117-121
72. Berdowska I, Zarzycki-Reich A, Siewiński M (1999) *Adv Clin Exp Med* **8**: 167-175
73. Haczyńska H, Warwas M (1994) *Post Hig Med Dośw* **48**: 729-743
74. Jimi T, Satoh Y, Takeda A, Shibuya S, Wakayama Y, Sugita K (1992) *Brain* **115**: 249-260
75. Tsujinaka T, Kishibuchi M, Yano M, Morimoto T, Ebisui C, Fujita J, Ogawa A, Shiozaki H, Kominami E, Monden M (1997) *J Biochem* **122**: 595-600
76. Kunimatsu K, Yamamoto K, Ichimaru E, Kato Y, Kato I (1990) *J Periodont Res* **25**: 69-73
77. Lah T, Babnik J, Schiffman E, Turk V, Skaleric U (1993) *J Periodontol* **64**: 485-491
78. Schmitt M, Jänicke F, Graeff H (1992) *Fibrinolysis* **6 Suppl 4**: 3-26
79. Rooprai HK, McCormick D (1997) *Anticancer Res* **17**: 4151-4162
80. Kos J, Lah TT (1998) *Oncology Reports* **5**: 1349-1361
81. Błasiak J, Smolarz B, Piestrzeniewicz D (1999) *Post Biochem* **45**: 42-50
82. Haczyńska H, Warwas M, Gerber J, Nowak M (1994) *Ginek Pol Supl 3*: 1187-1191
83. Kręciński T, Siewiński M (1992) *Eur Arch Otorhinolaryngol* **249**: 293-295
84. Scaddan PB, Dufresne MJ (1995) *Invas Metast* **13**: 301-313
85. Hirano T, Manabe T, Takeuchi S (1993) *Cancer Lett* **70**: 41-44
86. Yoshii A, Kageshita T, Tsushima H, Ono T (1995) *Arch Dermatol Res* **287**: 209-213
87. Kageshita T, Yoshii A, Kimura T, Maruo K, Ono T, Himeno M, Nishimura Y (1995) *Arch Dermatol Res* **287**: 266-272
88. Qian F, Chan S-J, Achkar Ch, Steiner DF, Frankfater A (1994) *Biochem Biophys Res Comm* **202**: 429-436
89. Sukoh N, Abe S, Nakajima I, Ogura S, Isobe H, Inoue K, Kawakami Y (1994) *Virchows Archiv* **424**: 33-38
90. Inoue T, Ishida T, Sugio K, Sugimachi K (1994) *Cancer Res* **54**: 6133-6136
91. Khan A, Krishna M, Baker SP, Banner BF (1998) *Mod Pathol* **11**: 704-708
92. Makarewicz R, Drewa G, Szymański W, Skonieczna-Makarewicz I (1995) *Neoplasma* **42**: 21-24
93. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF (1992) *Biochem J* **282**: 273-278
94. Dalet Fumeron V, Boudjennah L, Pagano M (1998) *Arch Biochem Biophys* **358**: 283-290
95. Sivaparvathi M, Sawaya R, Gokaslan ZL, Chintala KS, Jasti SR (1996) *Cancer Lett* **104**: 121-126
96. Jean D, Bar-Eli M, Huang S, Xie K, Rodrigues-Lima F, Hermann J, Frade R (1996) *Cancer Res* **56**: 254-258
97. Frade R, Rodrigues-Lima F, Huang S, Xie K, Guillaume N, Bar-Eli M (1998) *Cancer Res* **58**: 2733-2736
98. Hughes SJ, Glover TW, Zhu XX, Kuick R, Thoraval D, Orringer MB, Beer DG, Hanash S (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12410-12415
99. Yan S, Sameni M, Sloane BF (1998) *Biol Chem* **379**: 125-130
100. Ishidoh K, Kominami E (1998) *Biol Chem* **379**: 131-135
101. Hiwasa T, Sakiyama S (1996) *Cancer Lett* **99**: 87-91
102. Sloane BF, Moin K, Sameni M, Tait LR, Rozhin J, Ziegler G (1994) *J Cell Sci* **107**: 373-384

103. Chambers AF, Colella R, Denhardt DT, Wilson SM (1992) *Mol Carcinogen* **5**: 238-245
104. Hiwasa T, Kominami E (1995) *Biochem Biophys Res Comm* **216**: 828-834
105. Donatien PD, Diment SL, Boissy RE, Orlow SJ (1996) *Int J Cancer* **66**: 557-563
106. Kim K, Cai J, Shuja S, Kuo T, Murnane MJ (1998) *Int J Cancer* **79**: 324-333
107. Zhang JY, Schultz RM (1992) *Cancer Res* **52**: 6682-6689
108. Janulis M, Silberman S, Ambegaokar A, Gutkind JS, Schultz RM (1999) *J Biol Chem* **274**: 801-813
109. Berquin IM, Sloane BF (1996) W: Suzuki K, Bond J (red) *Intracellular Protein Catabolism*. Plenum Press, str. 281-294
110. Sivaparvathi M, Sawaya R, Wang SW, Rayford A, Yamamoto M, Liotta LA, Nicolson L, Rao JS (1995) *Clin Exp Metast* **13**: 49-56
111. Mehtani S, Gong Q, Panella J, Subbiah S, Peffley DM, Frankfater A (1998) *J Biol Chem* **273**: 13236-13244
112. Ren W-P, Sloane BF (1996) W: Dickson RD, Lippman ME (red.) *Breast Cancer: Mammary Tumor Cell Cycle, Differentiation and Metastasis*. Boston, Kluwer, str. 325-352
113. De Stefanis D, Demoz M, Dragonetti A, Hourii JJ, Ogier-Denis E, Codogno P, Baccino FM, Isidoro C (1997) *Cell Tissue Res* **289**: 109-117
114. Lingeman RG, Joy DS, Sherman MA, Kane SE (1998) *Mol Biol Cell* **9**: 1135-1147
115. Chauhan SS, Ray D, Kane SE, Willingham MC, Gottesman MM (1998) *Biochemistry* **37**: 8584-8594
116. Moin K, Cao L, Day NA, Koblinski JE, Sloane BF (1998) *Biol Chem* **379**: 1093-1099
117. Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, Flipo R-M (1997) *Brit J Rheumatol* **36**: 735-743
118. Ulbricht B, Hagmann W, Ebert W, Spiess E (1996) *Exp Cell Res* **226**: 255-263
119. Ulbricht B, Henny H, Horstmann H, Spring H, Faigle W, Spiess E (1997) *Eur J Cell Biol* **74**: 294-301
120. Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, Griffiths G (1998) *J Biol Chem* **273**: 9842-9851
121. Salminen A, Gottesman MM (1990) *Biochem J* **272**: 39-44
122. Mach L, Schwihla H, Stüwe K, Rowan AD, Mort JS, Glossl J (1993) *Biochem J* **293**: 437-442
123. Moin K, Day NA, Sameni M, Hasnain S, Hirama T, Sloane BF (1992) *Biochem J* **285**: 427-434
124. Shoji-Kasai Y, Senshu M, Iwashita S, Imahori K (1988) *Proc Natl Acad Sci USA, Cell Biology* **85**: 146-150
125. Redwood SM, Liu BC-S, Weiss RE, Hodge DE, Droller MJ (1992) *Cancer* **69**: 1212-1219
126. Kobayashi H, Ohi H, Sugimura M, Shinohara H, Fujii T, Terao T (1992) *Cancer Res* **52**: 3610-3614
127. Nakae T, Horai T, Imamura F, Akedo H, Higashino K (1998) *Tumor Biol* **19**: 118-125
128. Kolkhorst V, Stürzebecher J, Wiederanders B (1998) *J Cancer Res Clin Oncol* **124**: 598-606
129. Sivaparvathi M, Yamamoto M, Nicolson GL, Gokaslan ZL, Fuller GN, Liotta LA, Sawaya R, Rao JS (1996) *Clin Exp Metast* **14**: 27-34
130. Van Noorden CJ, Jonges TG, Van Marle J, Bissell ER, Griffini P, Jans M, Snel J, Smith RE (1998) *Clin Exp Metast* **16**: 159-167
131. Mort JS (r. 209), Kirschke H (r. 210, 211, 213), Brömme D (r. 212), Turk B, Dolenc I, Turk V (r. 214) (1998) W: Barrett A. J, Rawlings ND, Woessner JF (red) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press
132. Rescheleit DK, Rommerskirch WJ, Wiederanders B (1996) *FEBS Lett* **394**: 345-348
133. Shi G-P, Webb AC, Foster KE, Knoll JHM, Lemere CA, Munger JS, Chapman HA (1994) *J Biol Chem* **269**: 11530-11536
134. Shuja S, Sheahan K, Murnane MJ (1991) *Int J Cancer* **49**: 341-346
135. Turk V, Bode W (1993) W: Avilès FX (red) *Innovations in Proteases and their Inhibitors*. Walter de Gruyter & Co, Berlin, str. 161-178
136. Lah TT, Kos J (1998) *Biol Chem* **379**: 125-130
137. Gabrijelčič D, Svetič B, Spaič D, Škrk J, Budihna M, Turk V (1992) *AAS. Recent Progress on Kinins*, **38/II**: 350-357
138. Adenis A, Huet G, Zerimech F, Hecquet B, Balduyck M, Peyrat JP (1995) *Cancer Lett* **96**: 267-275
139. Werle B, Ebert W, Klein W, Spiess E (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**: 157-164
140. Budihna M, Strojan P, Šmid L, Škrk J, Vrhovec I, Župevc A, Rudolf Z, Žargi M, Krašovec M, Svetič B, Kopitar-Jerala N, Kos J (1996) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **377**: 385-390
141. Sinha AA, Gleason DF, Staley NA, Wilson MJ, Sameni M, Sloane BF (1995) *Anatom Rec* **241**: 353-362
142. Ohta T, Terada T, Nagakawa T, Tajima H, Itoh H, Fonseca L, Miyazaki I (1994) *Br J Cancer* **69**: 152-156
143. Yamaguchi N, Chung S, Shiroeda O, Koyama K, Imanishi J (1990) *Cancer Res* **50**: 658-663
144. Schwartz GK, Wang H, Lampen N, Altorki N, Kelsen D, Albino AP (1994) *Cancer* **73**: 22-27
145. Terada T, Ohta T, Minato H, Nakanuma Y (1995) *Hum Pathol* **26**: 746-752
146. Bever ChT Jr, Garver DW (1995) *J Neurol Sci* **131**: 71-73

Kinazy białkowe zależne od jonów wapnia

Calcium dependent protein kinases

JADWIGA SZCZEGIELNIAK¹, GRAŻYNA MUSZYŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Kinaza białkowa C
 - II-1. Struktura białek izoenzymów PKC
 - II-2. Regulacja aktywności PKC
 - II-3. Szlaki sygnałowe PKC
 - II-4. Rola fizjologiczna PKC
- III. Kinaza białkowa zależna od Ca²⁺/kalmoduliny (kinaza CaM)
 - III-1. Struktura wielofunkcyjnej kinazy CaM II
 - III-2. Regulacja kinazy CaM II przez kompleks Ca²⁺/kalmodulina i autofosforylację
 - III-3. Kinazy CaM w drożdżach i roślinach
- IV. Kinaza białkowa zależna od Ca²⁺ (CDPK)
 - IV-1. Budowa CDPK
 - IV-2. Właściwości CDPK
 - IV-3. Lokalizacja i funkcje fizjologiczne CDPK
- V. Uwagi końcowe.

Contents:

- I. Introduction
- II. Protein kinase C
 - II-1. The structure of PKC isoenzymes
 - II-2. Regulation of PKC activity
 - II-3. Signalling pathways of PKC
 - II-4. The physiological role of PKC
- III. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase)
 - III-1. The structure of multifunctional CaM kinase II
 - III-2. Regulation of CaM kinase II by complex Ca²⁺/calmodulin and autophosphorylation
 - III-3. CaM kinases in yeast and plants
- IV. Calcium Dependent Protein Kinase (CDPK)
 - IV-1. Construction of CDPK
 - IV-2. Properties of CDPK
 - IV-3. Localization and physiological function of CDPK
- V. Concluding remarks.

Wykaz stosowanych skrótów: kinaza CaM — kinaza białkowa zależna od Ca²⁺ i kalmoduliny, CDPK — kinaza białkowa zależna od Ca²⁺, PKC — kinaza białkowa C — zależna od Ca²⁺ i fosfolipidów, DG — diacyloglicerol, LysoPC — lizofosfatydylocholina, PC — fosfatydylocholina, PI — fosfatydyloinozytol, PLA₂ — fosfolipaza A, PLC — fosfolipaza C, PLD — fosfolipaza D, PS — fosfatydyloseryna.

I. Wstęp

W komórkach eukariotycznych zachowana jest homeostaza Ca²⁺, którą zapewniają liczne mechanizmy kontrolujące utrzymanie niskich stężeń Ca²⁺ w cytoplazmie (10⁻⁷ M) pomimo wysokich stężeń tych jonów w środowisku zewnętrznym i w niektórych organellach komórkowych (10⁻³ M). Jony wapnia pełnią rolę przekaźnika informacji z zewnątrz komórki do jej wnętrza [1, 2]. Pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych następuje wzrost stężenia Ca²⁺ w cytoplazmie uruchamiający wiele procesów regulujących funkcje komórki. Utrzymujące się przez dłuższy czas

wysokie stężenie jonów wapnia w cytoplazmie jest toksyczne dla komórki, dlatego nadmiar Ca²⁺ jest szybko usuwany przez dwa zasadnicze mechanizmy: wymiennik sodowo-wapniowy i pompę wapniową, która jest ATPazą Ca²⁺ i Mg²⁺-zależną. Inne sposoby utrzymania niskich stężeń Ca²⁺ w cytoplazmie polegają na: magazynowaniu Ca²⁺ w niektórych organellach lub też ich wiązaniu przez specyficzne białka cytosolowe. Odbiorcami sygnału wapniowego są m. in. kinazy białkowe [3, 4]. W organizmach zwierzęcych są to kinazy zależne od Ca²⁺ i aktywowane przez fosfolipidy zwane PKC (z ang. *Protein Kinase C*) oraz kinazy zależne od Ca²⁺ i kalmoduliny zwane kinazami CaM (z ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase* lub *CaM kinase*). Natomiast w roślinach są to głównie kinazy białkowe zależne od Ca²⁺ zwane CDPK (z ang. *Calcium Dependent Protein Kinase* lub inaczej *Calmodulin-like Domain Protein Kinase*).

II. Kinaza białkowa C

Budowie i funkcji PKC zostały poświęcone w 1989 roku dwa artykuły w „Postęпах Biochemii” [5, 6] i dlatego obecnie omówione będą głównie badania ostatnich lat.

¹Dr, ²Prof. dr hab., Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5a

PKC jest kinazą serynowo-treoninową aktywowaną proteolitycznie, o ciężarze cząsteczkowym 83 kD [7, 8]. Enzym ten może być również aktywowany przez fosfolipidy błonowe w obecności Ca^{2+} [9]. Ponadto małe ilości diacyloglicerolu (DG) powodują wzrost powinowactwa enzymu do Ca^{2+} i fosfolipidów aktywując enzym w fizjologicznych stężeniach Ca^{2+} [10]. Zainteresowanie PKC znacznie wzrosło wraz z odkryciem, że enzym może odgrywać rolę w kontrolowaniu funkcji komórkowych przez zewnątrzkomórkowe przekaźniki. Dalszym impulsem do badań PKC było odkrycie, że enzym jest trwale aktywowany przez estry forbolu, które powszechnie uważane są za promotory nowotworów [11].

II-1. Struktura białek izoenzymów PKC

Wszystkie PKC są białkami monomerycznymi i posiadają wysoko zakonserwowaną domenę katalityczną na C końcu. Zasadnicze różnice w budowie izoenzymów PKC występują głównie w N-końcowej domenie regulatorowej. Rycina 1 przedstawia budowę izoenzymów PKC. Klasyczne PKC zbudowane są z 4 zakonserwowanych domen (C1-C4) poprzedzielanych 5 regionami zmiennymi (V1-V5). W domenie regulatorowej enzymu znajdują się dwa regiony konserwowane C1 i C2 oraz regiony zmienne V1, V2 i V3. Domenę katalityczną tworzą dwa zakonserwowane regiony C3 i C4 oraz regiony zmienne V4 i V5. Region zmienny V5 (około 50 aminokwasów) odgrywa krytyczną rolę w lokalizacji izoenzymów w komórce [12].

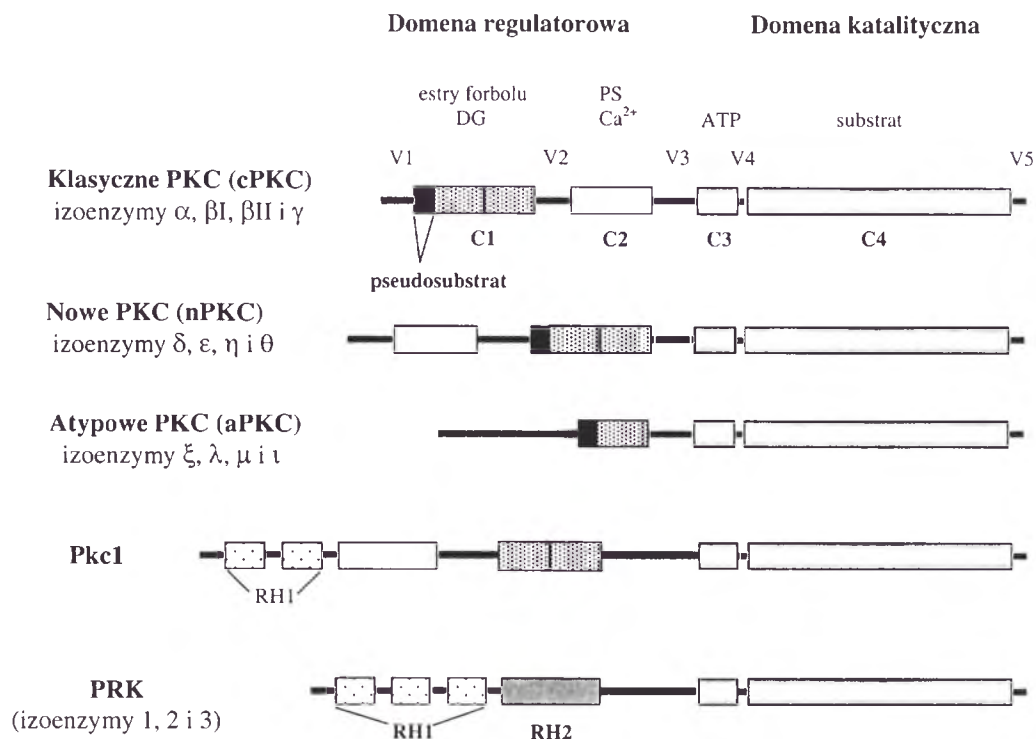
Na początku domeny C1 występuje sekwencja aminokwasów o charakterze pseudosubstratu. Sekwencja ta odgrywa rolę autoinhibitorową poprzez wiązanie się do domeny katalitycznej PKC w nieobecności aktywatorów. W domenie C1 występują również dwa motywy silnie konserwowane, bogate w cysteinę i histydyne, tworząc struktury tzw. palców cynkowych. Każdy z motywów palców cynkowych wiąże koordynacyjnie dwa jony Zn^{2+} [13]. Ustalono, że domena C1 jest odpowiedzialna za wiązanie DG i estrów forbolu i te dwa związki współzawodniczą o to miejsce wiązania [14]. Ważną funkcję w wiązaniu w/w związków przypisuje się zakonserwowanej w tym regionie prolinie. Ostatnie badania wskazują, że sekwencje palców cynkowych wszystkich izoenzymów PKC wiążących estry forbolu zawierają dodatkowo prolinę, podczas gdy w izoenzymach niewrażliwych na estry, zamiast proliny występują inne aminokwasy [15]. Dwa motywy palców cynkowych w domenie C1 nie są równocenne, ponieważ tylko w drugim motywie jest wiązany

DG i estry forbolu. Mutacja proliny w tym motywie powoduje przeszło 100-krotne obniżenie się siły wiązania estrów forbolu do PKC δ [16].

Domena C2 oddziałuje z fosfolipidami w sposób zależny od Ca^{2+} [17]. Przedstawiciele cPKC wymagają Ca^{2+} do aktywności enzymatycznej jak również do wiązania DG i estrów forbolu. Badania wykazały, że dwa jony Ca^{2+} są wiązane koordynacyjnie przez 5 zakonserwowanych reszt kwasu asparaginowego w domenie C2 [18]. Natomiast przedstawiciele nPKC zamiast klasycznej domeny C2 posiadają domenę homologiczną. W domenach podobnych do C2 brak jest jednej lub więcej zakonserwowanych reszt kwasu asparaginowego, które jak wspomniano powyżej są wymagane do wiązania jonów Ca^{2+} . Domena podobna do domeny C2, zwana HR2, występuje również w kinazach zwanych PRK (z ang. *PKC Related Kinases*), które są kinazami podobnymi do PKC (Ryc. 1) [19]. Sugeruje się, że te dwie domeny: C2 i domena HR2 pełnią także rolę w interakcjach białko-białko kierujących PKC do odpowiednich regionów w komórce.

Domena C3, odpowiedzialna za wiązanie ATP, zawiera zakonserwowaną sekwencję z charakterystycznymi powtórzeniami reszt glicyny i występuje we wszystkich kinazach białkowych. Natomiast domena C4 jest domeną katalityczną kinazy białkowej, serynowo-treoninowej. Wykazuje od 44 do 84% identyczności w sekwencji aminokwasowej pomiędzy izoenzymami PKC [20].

Różnice w budowie izoenzymów PKC są odpowiedzialne za ich odmienne właściwości enzymatyczne i odpowiedzi na aktywatory. Z tego powodu izoenzymy PKC zostały podzielone na trzy grupy: klasyczne, nowe i atypowe. Izoenzymy należące do klasycznych PKC (cPKC) są zależne od Ca^{2+} , PS i aktywowane przez DG lub estry forbolu. Izoenzymy zaliczane do nowych PKC (nPKC) nie posiadają typowej domeny C2, ale domenę podobną do C2 zlokalizowaną w N-końcowej części enzymu, przed domeną C1. Ich aktywność jest niezależna od Ca^{2+} , natomiast są aktywowane przez DG bądź estry forbolu w obecności PS. Do tej pory najmniej poznanymi enzymami są izoenzymy należące do grupy atypowych PKC (aPKC). Atypowe PKC nie posiadają domeny C2 ani domeny podobnej do tej domeny oraz podobnie jak nPKC posiadają tylko jeden motyw palca cynkowego w domenie C1. Izoenzym PKC μ należący do grupy aPKC różni się od pozostałych przedstawicieli tej grupy posiadaniem od N-końca unikalnej sekwencji terminalnej (potencjalnego peptydu sygnałowego i sekwencji



Ryc. 1. Budowa izoenzymów PKC (wg [90], zmodyfikowany). V1, V2, V3, V4 i V5 — regiony zmienne enzymu, C1, C2, C3 i C4 — domeny konserwowane enzymu, C1 — domena wiążąca estry forbolu i DG, posiada dwa motywy palców cynkowych, C2 — domena wiążąca jony wapnia i PS, C3 — domena wiążąca ATP, C4 — domena katalityczna enzymu, RH1 — domena w PRK (składa się z 3 powtórzeń około 55 konserwowanych aminokwasów, odpowiedzialna za wiązanie się PRK do Rho-GTPazy) i w drożdżowych PKC (składa się z 2 powtórzeń), RH2 — domena homologiczna do domeny C2.

trans-membranowej) oraz palców cynkowych w dwóch powtórzeniach, tak jak w przypadku izoenzymów należących do grup cPKC i nPKC. Aktywność aPKC jest niezależna od Ca^{2+} , DG oraz estrów forbolu, natomiast jest zależna od PS.

Enzymy podobne do ssaczyh PKC zostały też zidentyfikowane w niższych *Eukariontach* [21]. Drożdżowa PKC (*Pkc 1*) o c. cz. 132 kD jest białkiem znacznie większym od jakiegokolwiek ssaczej PKC z powodu rozszerzonej o 375 aminokwasów domeny regulatorowej. *Pkc 1* oprócz wszystkich zakonserwowanych regionów występujących w cPKC, posiada na N końcu dwie kopie motywu HR1. Motyw ten został odkryty jako region homologiczny pomiędzy kinazami PRK1 i PRK2, złożony jest z 3 powtórzeń około 55 aminokwasowego odcinka [22]. Wykazano, że ten motyw jest odpowiedzialny za wiązanie się kinaz PRK do białka Rho należącego do małych białek G mających aktywność GTP-azy [23]. Gen *Pkc 1* występuje w *S. cerevisiae* tylko w jednej kopii [24].

Jak dotychczas brak jest jednoznacznych dowodów świadczących o obecności PKC w roślinach. Jednakże wiele komponentów zwierzęcych szlaków sygnałnych związanych z hydrolizą fosfatydyloinozytoli ma swoje strukturalne i funkcjonalne odpowiedniki w roślinach (białka G, fosfolipazy: PLC, PLA_2 i PLD oraz ich metabolity pełniące funkcje aktywatorów PKC) [25, 26]. Aktywność stymulowaną

przez Ca^{2+} i lipidy zidentyfikowano w tkankach wielu roślin, natomiast tylko kinaza z etiolowanych liści kukurydzy odpowiada wzrostem aktywności w odpowiedzi na DG lub estry forbolu [27].

II-2. Regulacja aktywności PKC

Aktywność PKC jest regulowana przez dwa odmiennie mechanizmy: fosforylację i wtórne przekazy. Fosforylacja moduluje miejsce aktywne enzymu i wpływa na lokalizację enzymu w komórce, natomiast wtórne przekazy są odpowiedzialne za wiązanie się enzymu z błonami i uwalnianie pseudosubstratu z miejsca katalitycznego enzymu.

Badania przeprowadzone na klasycznych PKC wykazały, że nowo-zsyntetyzowane białko o c. cz. 74 kD jest nieufosforylowaną, nieaktywną formą enzymu związaną z frakcją nierozpuszczalną [28]. Konserwowane treoniny w miejscu aktywnym enzymu, T-497 w izoenzymie α i T-500 w izoenzymie β II są fosforylowane przez niezidentyfikowaną kinazę białkową [29, 30]. Fosforylacja ta jest odpowiedzialna za aktywność enzymatyczną i wrażliwość na wtórne przekazy. Konsekwencją tej fosforylacji w miejscu aktywnym enzymu jest autofosforylacja T-638 (izoenzym α) lub T-641 (izoenzym β II). Autofosforylacja PKC jest wymagana do funkcji katalitycznej enzymu, ponieważ defosforylacja powoduje

inaktywację enzymu [31]. Pomiedzy ufosforylowanymi: T-497 (w pętli aktywacyjnej) i T-638 (w regionie zmiennym V5 w C-końcu) zachodzą interakcje utrzymujące enzym w konformacji zamkniętej, odpornej na działanie fosfataz. Trzecią fosforylacją jest autofosforylacja S-657 (izoenzym α) i S-660 (izoenzym β). Fosforylacja ta jest odpowiedzialna za uwolnienie enzymu do cytosolu i za konformację białka w której enzym jest odporny na działanie fosfataz oraz kontroluje fosforylację w innych miejscach enzymu [32]. Ponadto wykazano, że fosforylacja S-660 powoduje wzrost powinowactwa enzymu do Ca^{2+} [33]. Trzy wymienione reszty aminokwasowe, które ulegają fosforylacji w izoenzymie α i β II są konserwowane we wszystkich izoenzymach PKC [34].

Kolejne fosforylacje PKC prowadzą do powstania cytosolowej, dojrzałej formy enzymu. Jednakże enzym pozostaje nadal nieaktywny, ponieważ sekwencja pseudosubstratu blokuje jego miejsce katalityczne.

Jak wspomniano powyżej aktywność cPKC jest zależna od jonów wapnia i fosfatydyloseryny oraz diacyloglicerolu lub estrów forbolu. Jony wapnia przyłączają się do domeny C2 cPKC i zmieniają strukturę domeny. Zmieniona domena C2 może wiązać fosfatydyloserynę (PS). W nPKC struktura domeny podobnej do C2 pozwala na wiązanie fosfolipidów bez udziału jonów wapnia. Jest to zasadnicza różnica w regulacji aktywności pomiędzy cPKC i nPKC [35].

Aktywność wszystkich do tej pory poznanych izoenzymów PKC zależy od PS. Przyłączenie PS do cząsteczki enzymu wywołuje zmiany konformacyjne enzymu, w wyniku których jest eksponowany region podatny na proteolizę — region zmienny V3. Tym zmianom nie towarzyszy wzrost aktywności PKC ani uwalnianie pseudosubstratu z miejsca katalitycznego enzymu [35].

Diacyloglicerol (DG) powoduje translokację PKC z cytosolu do błon. Translokacja PKC do błon jest możliwa zarówno przez wiązanie się DG z domeną C1 jak również przez wiązanie PS z domeną C2. Ścisły związek z błonami oraz maksymalną aktywację zapewnia enzymowi interakcja obu domen z błonami. Aktywacja enzymu jest wynikiem uwolnienia pseudosubstratu po przyłączeniu DG do PKC. DG również znacznie redukuje stężenie jonów wapnia wymagane do aktywacji powodując wzrost powinowactwa PKC do PS [36].

Estry forbolu mogą naśladować działanie DG. Podobnie jak DG, estry forbolu powodują translokację PKC do błon [37]. Są promotorami nowotworów i znanymi aktywatorami PKC również w badaniach *in*

vivo, na nieuszkodzonych komórkach. Z tego powodu estry forbolu są wykorzystywane do badań funkcji biologicznych PKC. Wnikają do komórki, wiążą się z PKC w tym samym miejscu w którym wiąże się DG i aktywują enzym, omijając drogę fizjologicznej aktywacji enzymu. Estry forbolu wywołują trwałą aktywację PKC i jej silną asocjację z błonami.

Oprócz DG, nienasycone kwasy tłuszczowe, LysoPC, inne komponenty lipidowe błon mogą pełnić rolę w aktywacji PKC np. ceramidy aktywują izoenzym ζ [38]. Poziom ceramidów podobnie jak poziom DG wzrasta w komórce pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych. Inny lipid inozyto(3,4,5)trisfosforan (PIP_3) — produkt kinazy PI-3 (3-kinazy fosfatydyloinozytolu, która uczestniczy w mitogennym przekazywaniu sygnału) również aktywuje PKC ζ , ϵ i δ [39].

PKC może być również aktywowana przez ograniczoną proteolizę katalizowaną przez kalpainę [7, 40]. W regionie zmiennym V3 enzymu występują specyficzne miejsca podatne na cięcie proteolityczne, w wyniku którego zostaje uwolniona 45-49 kD domena katalityczna enzymu, całkowicie niezależna od aktywatorów i zwana PKM (z ang. *Protein Kinase M*) oraz 36 kD domena regulatorowa. Izoenzymy PKC wykazują odmienną wrażliwość na działanie kalpajny. Wydaje się, że ograniczona proteoliza reprezentuje jeden z fizjologicznych mechanizmów regulujących aktywność PKC [41].

II-3. Szlaki sygnałne PKC

Produkty hydrolizy lipidów są aktywatorami PKC — uważanego za kluczowy enzym w przekazywaniu informacji z zewnątrz komórki do jej wnętrza. Jednakże w komórce istnieje wiele szlaków przekazywania informacji, które wzajemnie na siebie oddziałują i często są to interakcje wielopoziomowe określane angielskim terminem „*cross talk*”. Wiele trudności nastęrcza precyzyjne ustalenie konkretnych reakcji regulowanych przez poszczególne izoenzymy PKC.

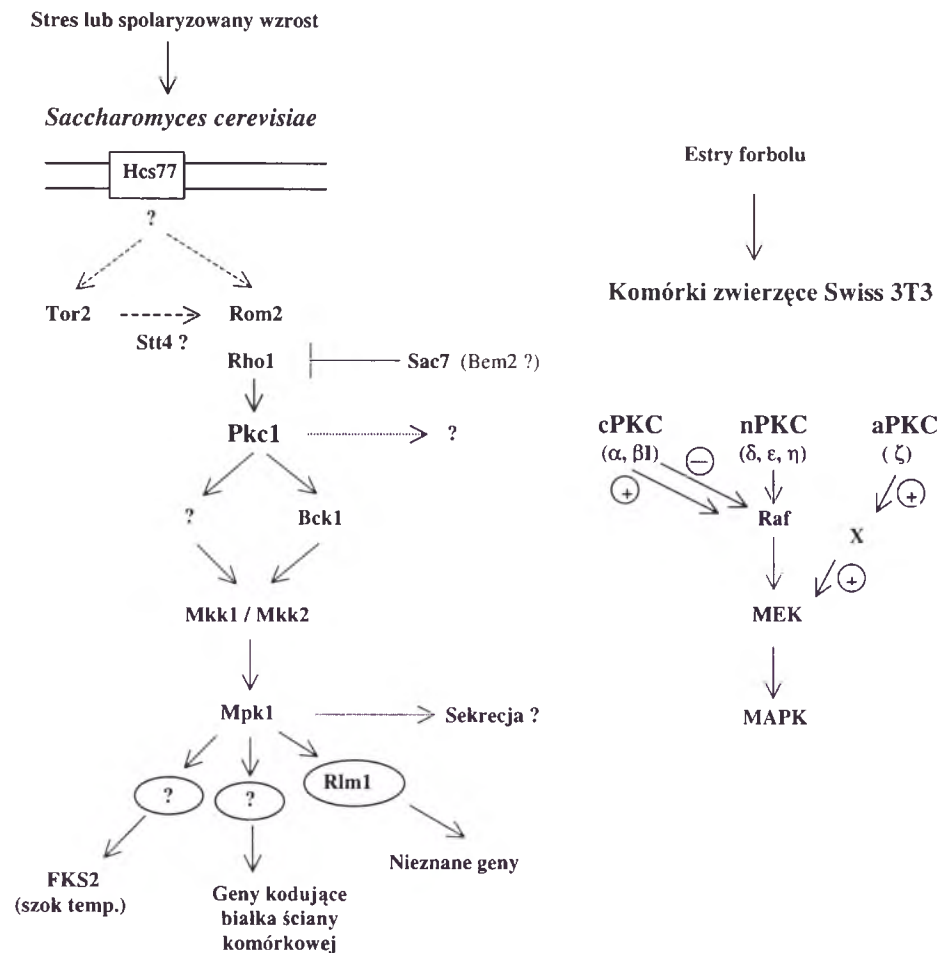
Kaskady sygnałowe wywoływane przez większość agonistów mobilizujących Ca^{2+} aktywują PI-PLC, PLD i PLA2. PKC odgrywa ważną, chociaż nie wyłączną rolę w koordynacji aktywności różnych SAP (z ang. *Signal Activated Phospholipases*) i integracji sygnałów przekazywanych przez te fosfolipazy [42]. Wykazano, że fosforylacja PLC- β i PLC- γ katalizowana przez PKC ma hamujący wpływ na te fosfolipazy, natomiast PKC pozytywnie oddziałuje na aktywność PLD i PLA₂ [42]. Regulacja aktywności fosfolipazy C przez PKC

została zasygnalizowana uprzednio w „Postęпах Biochemii” [43].

PKC pośredniczy w przekazywaniu sygnałów przez kaskadę MAPK (z ang. *Mitogen Activated Protein Kinase*) u zwierząt [44] jak również u drożdży [45]. Przejściowa transfekcja konstytutywnie aktywnych mutantów sześciu izoenzymów PKC (α , β I, δ , ϵ , η i ζ) w komórkach COS-7 wykazała, że przedstawiciele trzech grup PKC (klasycznych, nowych i atypowych) są zdolni do aktywacji zarówno MAPK jak i kinazy MEK1, bezpośredniego aktywatora MAPK/ERK. Na poziomie kinazy Raf, która fosforyluje MEK1, aktywacja kaskady różni się (Ryc. 2). Uważa się, że izoenzymy PKC α , β I, δ , ϵ

szenie reakcji Raf na agonistę (desensytyzacja), co chroni Raf przed dalszą stymulacją faktorem wzrostu [46].

Jak dotychczas najlepiej poznano szlak przekazywania sygnałów przez Pkc1 w *Saccharomyces cerevisiae* [23], chociaż znacznie zaawansowane są również badania w *Saccharomyces pombe* [47]. Szlak Pkc1 w *S. cerevisiae* jest stymulowany przynajmniej przez dwa sygnały. Jeden z nich jest związany ze stresem komórkowym: osmotycznym i temperaturowym [45, 48], natomiast drugi ze spolaryzowanym wzrostem. Szlak Pkc1 wymaga spolaryzowanego wzrostu w odpowiedzi na hormon koniugacyjny i głód azotu [49, 50, 51]. Zarówno spolaryzo-



Ryc. 2. Szlaki przekazywania sygnałów przez PKC w *Saccharomyces cerevisiae* i komórkach zwierzęcych (wg [77], zmodyfikowany). Hcs77 (inna nazwa Wsc1) — białko błonowe, proponowany receptor szlaku PKC; Tor2 — białko związane ze szlakiem kinazy PI-3 (3-kinazy fosfatydyloinozytolu); Stt4 — kinaza PI-4 (4-kinaza fosfatydyloinozytolu); Rom2 — białko aktywujące Rho1 (katalizuje wymianę GDP na GTP); Rho1 — małe białko wiążące GTP; Sac7 i Bem2 są białkami aktywującymi GTP-azę (GAPs), negatywne regulatory Rho1; Bck1, Mkk1/Mkk2 i Mpk1 — kinazy kaskady MAPK, są odpowiednikami kolejno kinaz zwierzęcych MEKK/MAPKKK, MEK/MAPKK i MAPK; Rlm1 — faktor transkrypcyjny związany ze szlakiem PKC; FKS2 — gen syntazy (1-3)-glukanu, jego ekspresja jest kontrolowana w szlaku PKC. Przerwane strzałki oznaczają nie do końca poznany mechanizm aktywacji a \oplus i \ominus oznaczają odpowiednio aktywację lub hamowanie aktywności enzymatycznej.

i η regulują aktywność Raf, podczas gdy izoenzym PKC ζ nie wpływa na aktywność tego enzymu i niezależnie od Raf stymuluje MEK. Wykazano ponadto, że izoenzym α może indukować zmniejsz-

wany wzrost jak i odpowiedź komórki na szok osmotyczny i temperaturowy wymagają zmiany kształtu ściany komórkowej, w który zaangażowana jest Pkc1. Badając genetyczne interakcje wśród genów ko-

dujących kinazy białkowe biorące udział w kaskadzie MAPK w *S. cerevisiae* ustalono miejsce funkcjonowania w tym szlaku PKC [52, 53], (Ryc. 2).

Wykazano udział Pkc1 podczas morfogenezy pączków *S. cerevisiae* [54]. Potwierdzono tym samym wcześniejsze badania genetyczne stwierdzające, że aktywność Pkc1 jest konieczna w cyklu komórkowym do formowania się pączków [55]. Hydroliza fosfatydylocholino do DG i fosforanu choliny występuje w krytycznym punkcie START (przejście komórek z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego) i jest ściśle związana z aktywacją Cdc28 (kinaza niezbędna do przejścia z fazy G1 do fazy S). W tym przypadku okazało się, że elementy należące do szlaku przekazywania sygnałów (w tym PKC) mogą działać w szlaku kierowanym przez główną kinazę regulatorową cyklu komórkowego (*cdc28*) w nieobecności zewnątrzkomórkowych stymulatorów [56].

Oprócz szlaków sygnalnych cPKC i nPKC, w których uczestniczą fosfolipazy odkryto nowy szlak, w którym jest aktywowana kinaza PI-3 (3-kinaza fosfatydyloinozytolu). Kinaza PI-3 następnie pośrednio lub bezpośrednio aktywuje aPKC i nPKC. Wykazano, że izoenzymy ζ , ϵ i δ PKC mogą być aktywowane bezpośrednio przez PIP₃ (produkt działania kinazy PI-3, [39]). Poza tym wykazano również, że izoenzymy δ i ζ PKC są aktywowane w szlaku kinazy PI-3 pośrednio przez kinazę zwaną PDK1, której aktywność jest specyficznym kontrolowana przez PIP₃ [57, 58]. I tak np. w ludzkich monocytach następuje aktywacja izoenzymu ζ poprzez wyżej umieszczoną w szlaku kinazę PI-3 w odpowiedzi na LPS, bakteryjne liposacharydy wywołujące produkcję cytokin [59]. Udowodniono również, że w komórkach stymulowanych EGF lub PDGF w szlaku sygnalnym kinazy PI-3 następuje aktywacja i translokacja izoenzymu λ PKC [60].

II-4. Rola fizjologiczna PKC

Wiele hormonów, neurotransmiterów, czynników wzrostowych i mitogennych jak również antygeny i interleukiny pobudzają syntezę DG i aktywują PKC [61]. Duża liczba agonistów aktywujących PKC wskazuje na udział tego enzymu w wielu różnorodnych funkcjach organizmu. Wykazano, że PKC uczestniczy: w wydzielaniu wewnętrznym wielu hormonów, w wydzielaniu zewnętrznym enzymów i kwasu solnego, w układzie nerwowym (uwalnianie neurotransmiterów), w ruchu (skurcz i rozkurcz mięśni), podczas infekcji i reakcji obronnych (w tym w aktywacji limfocytów T i B, uwalnianiu serotoniny i histaminy) i w metabolizmie (np. transport glukozy,

lipogeneza, glikogenoliza). Odpowiedzi komórki wywołane aktywacją PKC zostały przedstawione w pracy przeglądowej [61].

Ostatnio przypisuje się ważną rolę PKC w procesie apoptozy. Zahamowanie aktywności atypowych PKC jest potrzebne do indukcji apoptozy. Wykazano, że produkt genu *par-4* (indukowany w komórkach NIH 3T3 ulegających apoptozie) specyficznie oddziałuje zarówno *in vitro* jak i *in vivo* z palcami cynkowymi PKC ζ i PKC λ i hamuje aktywność enzymatyczną kinaz [62]. Nadspresja PKC ζ i PKC λ hamowała proces apoptozy indukowany promieniowaniem UV. W komórkach poddanych promieniowaniu UV następuje dramatyczne obniżenie się aktywności PKC ζ [62]. Wykazano, że atypowa PKC chroni komórki K562 leukemii ludzkiej przed apoptozą [63].

PKC spełnia rolę w kontroli cyklu komórkowego u zwierząt. Wykazano, że może funkcjonować jako regulator w dwóch miejscach cyklu komórkowego: podczas trwania fazy G1 i przejścia z fazy G2 do fazy M [64]. Wykazano funkcjonalne powiązanie pomiędzy kontrolą cyklu komórkowego a aktywacją PKC μ drożdży [56]. Istnienie szlaków związanych z PKC, regulujących cykl komórkowy u ssaków i drożdży może świadczyć, że ten enzym jest konserwowanym regulatorem cyklu komórkowego, który łączy szlaki przekazywania sygnałów z maszyną cyklu komórkowego.

Endogennymi substratami PKC są białka pełniące różnorodne funkcje komórkowe a wśród nich białka receptorowe, kanałów jonowych, cytoskieletu oraz czynniki transkrypcyjne [60, 65-67].

III. Kinaza białkowa zależna od Ca²⁺/kalmoduliny (kinaza CaM)

Kinazy CaM są aktywowane przez kompleks Ca²⁺/kalmodulina i biorą udział w przekazywaniu sygnałów w komórkach zwierzęcych. Poznane kinazy białkowe regulowane przez kompleks Ca²⁺/kalmodulina wykazują zróżnicowaną specyficzność substratową. Tylko kinaza lekkiego łańcucha miozyny, kinaza fosforylaza i kinaza CaM III są morospecyficzne. Pozostałe kinazy (kinaza CaM I, II, IV, V i kinaza kinazy CaM) są zdolne do fosforylacji wielu substratów [68].

Wszystkie kinazy CaM wykazują wspólne cechy budowy i funkcji takie jak obecność domeny autoinhibitorowej i domeny wiążącej kalmodulinę, aktywacja poprzez kompleks Ca²⁺/kalmodulina oraz regulacja poprzez fosforylację. Regulacja przez fosforylację różni się w poszczególnych kinazach CaM i

tak np. kinaza fosforylaza jest aktywowana przez fosforylację katalizowaną przez PKA, kinaza CaM II jest aktywowana przez autofosforylację, natomiast kinaza CaM I i IV są aktywowane przez fosforylację kinazą kinazy-CaM [68]. Należy wspomnieć, że fosforylacja kinazy lekkiego łańcucha miozyny katalizowana przez PKA i kinazę CaM II powoduje zahamowanie aktywności enzymatycznej [68].

Najlepiej poznaną kinazą CaM jest wielofunkcyjna kinaza CaM II [68-70]. Kinaza CaM II jest białkiem oligomerycznym o c. cz. od 450 do 650 kD. Występuje w większości tkanek zwierzęcych, ale szczególnie bogata w ten enzym jest tkanka nerwowa (20-50-krotne wyższe stężenie w mózgu w porównaniu z innymi tkankami). Kinaza ta fosforyluje *in vitro* około 40 białek [71] i kilka z nich np. synapsyna, kinaza lekkiego łańcucha miozyny mięśni gładkich są substratami *in vivo*. Kinaza CaM II reguluje: przepływ jonów, homeostazę Ca^{2+} , metabolizm węglowodanów, lipidów i aminokwasów, ekspresję genów stymulowanych przez Ca^{2+} . Kinaza ta występuje po obu stronach synaps i moduluje uwalnianie neurotransmiterów jak również ich syntezę. Autofosforylacja umożliwia kinazie CaM II wzmocnienie powtarzającego się sygnału wapniowego i odgrywa rolę w modulacji plastyczności synaptycznej [72]. Kinaza CaM II indukuje zjawisko długoterminowego wzmocnienia synaptycznego (z ang. *LTP* — *Long-Term Potentiation*), uważane za elementarny mechanizm uczenia się i zapamiętywania [73].

III-1. Struktura wielofunkcyjnej kinazy CaM II

Z bibliotek cDNA mózgu szczura sklonowano i ustalono sekwencję 5 genów kodujących podjednostki kinazy CaM II: α (54 kD), β (60 kD), β' (59 kD), γ (59 kD) i δ (60 kD). Prawdopodobnie podjednostki te tworzą naturalne homomultimery. Trzy podjednostki α , β i β' są specyficzne dla tkanki nerwowej, natomiast podjednostki γ i δ występują prawie we wszystkich tkankach [70]. Podjednostki α , β , β' , γ i δ wykazują więcej niż 80% identyczności w sekwencji aminokwasowej, co sugeruje podobną budowę wszystkich podjednostek kinazy CaM II. Strukturę kinazy CaM II można zilustrować na przykładzie podjednostki α kinazy CaM II (Ryc. 3A). Podjednostki kinazy CaM II zbudowane są z trzech domen:

— od N-końca znajduje się domena katalityczna kinazy białkowej (aminokwasy od 1 do 270), se-

- kwencja aminokwasów od 271 do 280 łączy domenę katalityczną z domeną regulatorową;
- region od 281 do 309 aminokwasów jest domeną regulatorową i zawiera zarówno sekwencje autoinhibitorową jak i sekwencję wiążącą kalmodulinę;
- C-końcowy region zawiera domenę asocjacyjną wymaganą do łączenia się podjednostek w holoenzym.

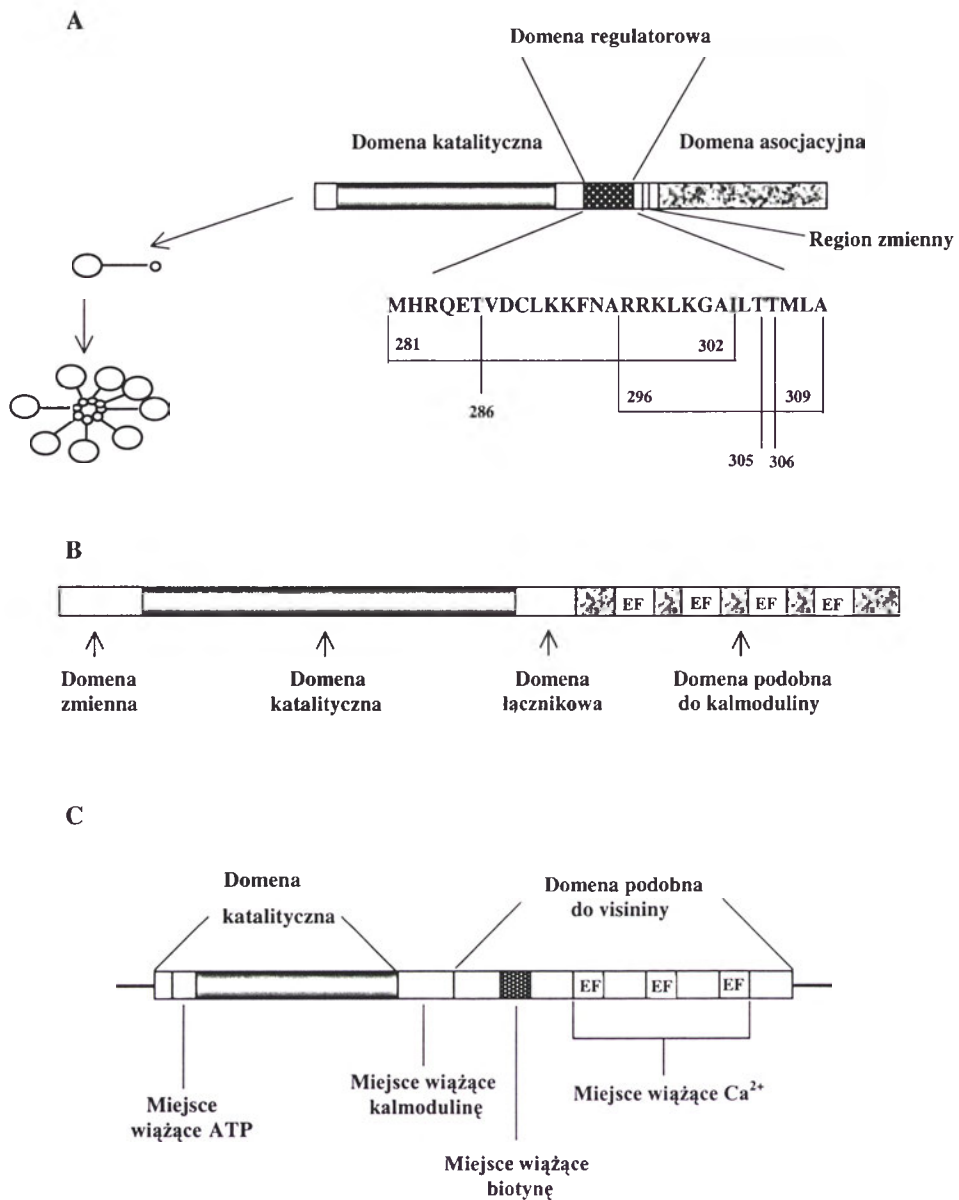
Jedyną zasadniczą różnicą pomiędzy podjednostkami α , β , γ i δ są regiony zmienne zawierające od 11 do 39 aminokwasów, zlokalizowane pomiędzy domeną regulatorową i domeną asocjacyjną.

Badania wpływu syntetycznych peptydów pochodzących z domeny regulatorowej na aktywność fragmentu katalitycznego kinazy CaM II ujawniły, że domena regulatorowa spełnia podwójną funkcję: wiąże kalmodulinę jak również hamuje aktywność kinazy CaM II. Sekwencja autoinhibitorowa domeny regulatorowej spełnia rolę autoinhibitorową poprzez blokowanie wiązania zarówno substratu białkowego jak i ATP do miejsca katalitycznego enzymu [68].

Za pomocą mikroskopii elektronowej ustalono strukturę kinazy CaM II [74]. Jest to struktura „kwiatu z płatkami” (z ang. *flower with petals*), w której C-końcowe domeny asocjacyjne podjednostek (od 8 do 12) łączą się ze sobą centralnie, a od połączonych domen asocjacyjnych odchodzą promieniście domeny regulatorowe i N-końcowe domeny katalityczne. Do tej pory nie wiadomo, czy holoenzym kinazy CaM II jest homomultimerem czy heteromultimerem, chociaż enzym z mózgu zawiera wyłącznie podjednostki α lub β , co potwierdza sugestie, że kinaza CaM II nie tworzy heteromultimerów [74].

III-2. Regulacja aktywności kinazy CaM II przez kompleks Ca^{2+} /kalmodulina i autofosforylację

Wielofunkcyjna kinaza CaM II jest nieaktywna w nieobecności jonów wapnia i kalmoduliny. Jony wapnia wiążą się do kalmoduliny i indukują w jej cząsteczce zmiany konformacyjne. Wywołane zmiany konformacyjne w kalmodulinie powodują wzrost jej powinowactwa do kinazy CaM II. Kalmodulina wiąże się do domeny regulatorowej i powoduje oddysocjowanie sekwencji autoinhibitorowej od miejsca katalitycznego enzymu [75]. Powstała aktywna podjednostka enzymu jest szybko autofosforylowana przez przyległą, aktywną podjednostkę [76]. Autofosforylacja zamienia kinazę w enzym konstytutywnie aktywny, który

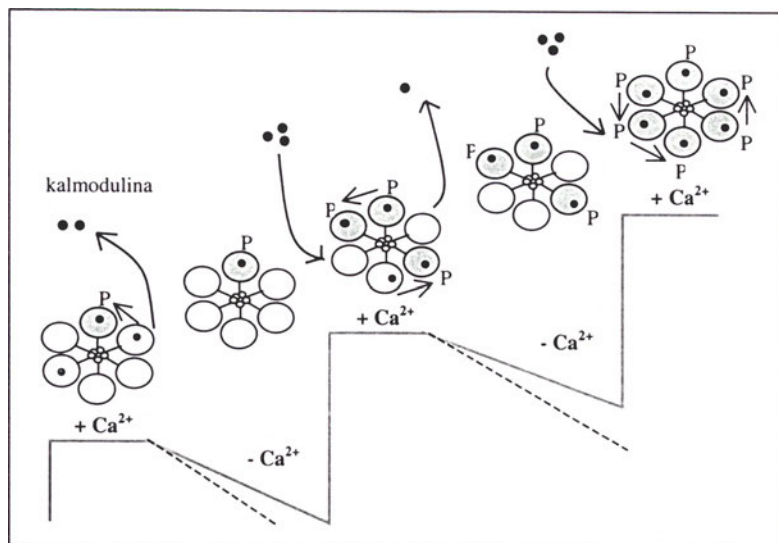


Ryc. 3. Budowa kinaz białkowych zależnych od jonów wapnia. **A** — wielofunkcyjna kinaza CaM II. Kinaza CaM II przedstawiona jako oktamer. Sekwencja autoinhibitorowa domeny regulatorowej (aminokwasy 281-302). Sekwencja wiążąca kalmodulinę domeny regulatorowej (aminokwasy 296-309). Miejsca autofosforylacji (T-286, T-305 i T-306). **B** — CDPKα z komórek soi. **C** — CCaMK z lilii.

może fosforylować egzogenne białka bez dopływu wolnego kompleksu Ca^{2+} /kalmodulina. Autofosforylowana jest treonina 286 znajdująca się w sekwencji autoinhibitorowej wszystkich izoenzymów kinazy CaM II. Autofosforylacja ta obniża stopień dysocjacji kalmoduliny od podjednostki [77]. Wynika z tego, że fosforylacja T-286 jest odpowiedzialna za „zatrzymywanie” (z ang. *trapping*) kalmoduliny w cząsteczce enzymu. Konsekwencją „zatrzymywania” kalmoduliny jest uzyskanie przez enzym aktywności niezależnej od wolnego kompleksu — Ca^{2+} /kalmodulina. Podjednostka taka jest w stanie aktywnym między oscylacjami wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} . Ma to miejsce w wypadku, kiedy sygnały wapnia występują z dużą częstotliwością. Po kolejnych

sygnałach Ca^{2+} kinaza może osiągnąć maksymalną aktywność poprzez uaktywnianie kolejnych podjednostek holoenzymu (Ryc. 4). Jeżeli sygnały wapnia występują z małą częstotliwością, kinaza odwracalnie inaktywuje się w przerwach między poszczególnymi sygnałami jonów wapnia a dopływ tych jonów przywraca aktywność enzymatyczną. Tak więc aktywność kinazy CaM II może być modulowana poprzez wielkość, częstotliwość i liczbę sygnałów wapniowych [72].

W cząsteczce enzymu istnieją dwa inne miejsca autofosforylacji zlokalizowane w sekwencji wiążącej kalmodulinę, które również regulują aktywność enzymu. Są to T-305 i T-306. Kalmodulina związana z enzymem blokuje autofosforylację T-305 i T-306. Treoniny te są szybko autofosforylowane po oddyso-



Rys. 4. Wiązanie kalmoduliny i aktywacja kinazy CaM II (wg [45], zmodyfikowany). Jeżeli zmiany w stężeniu Ca^{2+} w cytosolu zachodzą z dużą częstotliwością podjednostki kinazy wiążą kalmodulinę i ulegają chwilowej aktywacji. W tym czasie jedna z aktywnych podjednostek fosforyluje drugą sąsiadującą podjednostkę. Konsekwencją fosforylacji jest pozostanie podjednostki w stanie aktywnym (kolor szary) pomimo obniżenia stężenia Ca^{2+} w cytosolu, ponieważ fosforylacja zwiększa powinowactwo kalmoduliny do podjednostki i uniemożliwia oddysocjowanie od niej kalmoduliny. Podczas następnich wzrostów stężeń Ca^{2+} w cytosolu kolejne podjednostki ulegają aktywacji i autofosforylacji aż do uzyskania przez enzym maksimum aktywności.

cjonowaniu od enzymu kalmoduliny i ufosforylowane treoniny blokują ponowne wiązanie się kalmoduliny do enzymu [70].

III-3. Kinazy CaM w drożdżach i roślinach

Z biblioteki genomowej *Saccharomyces cerevisiae* wyizolowano dwa geny zwane CMK1 i CMK2 kodujące kinazy zależne od Ca^{2+} i kalmoduliny o c. cz. 56 i 50 kD. Sekwencje aminokwasowe produktów genów CMK1 i CMK2 wykazują największe podobieństwo do ssaczej kinazy CaM II [78]. Drożdżowe kinazy na C-końcu są krótsze od ssaczych kinaz CaM II o 80 aminokwasów. Ta delecja jest najprawdopodobniej przyczyną różnic w stopniu oligomeryzacji enzymów drożdżowych, które tworzą dimery, podczas gdy ssacza kinaza CaM II zbudowana jest z 8-12 podjednostek. Kinazy CMK1 i CMK2 mają podobne właściwości biochemiczne, ale ich aktywność jest różnie regulowana. Aktywność kinazy CMK2 jest aktywowana przez autofosforylację podobnie jak aktywność ssaczych kinaz CaM II, natomiast kinaza CMK1 nie jest regulowana przez autofosforylację, ponieważ nie ma wymaganego, konserwowanego miejsca autofosforylacji.

Badania molekularne wykazały możliwość istnienia kinazy CaM w roślinach. Z biblioteki cDNA jabłka wyizolowano gen kodujący kinazę CaM. Analiza sekwencji ujawniła, że to białko (c. cz. 46,5 kD) zbudowane jest z domeny katalitycznej wykazującej 39% identyczności w sekwencji

aminokwasowej z podjednostką α kinazy CaM ze szczura. To białko posiada również sekwencję wiążącą kalmodulinę, która jest w 38% identyczna z sekwencją wiążącą kalmodulinę w izoenzymie α kinazy CaM II szczura [79]. Jednakże to białko nie wykazuje aktywności stymulowanej przez Ca^{2+} /kalmodulinę [80]. Gen zwany MCK1 kodujący roślinną kinazę CaM wyizolowano z korzeni kukurydzy. Wstępne badania sugerują, że kinaza ta uczestniczy w przekazywaniu sygnału przez światło [81].

IV. Kinaza białkowa zależna od Ca^{2+} (CDPK)

CDPK reprezentuje rodzinę izoenzymów, które mają podobną budowę i właściwości enzymatyczne. Izoenzymy CDPK są szeroko rozpowszechnione w roślinach, glonach i pierwotniakach [4], natomiast brak jest informacji o istnieniu tego typu enzymu w komórkach zwierzęcych, drożdżowych i prokariotycznych. CDPK z kultur komórkowych soi była pierwszą, opisaną w roślinach kinazą białkową zależną od Ca^{2+} [82].

W jednym organizmie obecnych może być wiele izoenzymów CDPK i tak np. w kukurydzy znanych jest 6 genów [83-86], w pierwotniaku *Paramecium tetraurelia* 2 geny [87, 88], natomiast w *Arabidopsis thaliana* aż 12 genów kodujących różne izoenzymy CDPK [89]. Analiza etykietek sekwencji kodujących (z ang. *ESTs* — *Expressed Sequence Tags*) sugeruje istnienie 20 izoenzymów CDPK w *A. thaliana* [90].

IV-1. Budowa CDPK

CDPK są białkami monomerycznymi składającymi się z czterech domen: N-końcowej domeny zmiennej, domeny katalitycznej, domeny łącznikowej (z ang. *JD* — *Junction Domain*) oraz domeny podobnej do kalmoduliny (z ang. *CLD* — *Calmodulin-Like Domain*, Ryc. 3B).

N-końcowa domena jest domeną zmienną i różni się zarówno pod względem długości (od 21 do 185 aminokwasów) jak i składu aminokwasowego w izoenzymach CDPK. Nie ma wystarczająco dużo dowodów dotyczących funkcji tej domeny, ale w niektórych CDPK np. w CPK1, CPK2, CPK5 z *A. thaliana*, CDPK z ryżu, ZmCRK3 z kukurydzy oraz CRK (z ang. *CDPK Related Kinase*) z marchwi znajduje się w niej konserwowany motyw mirystylacji. Mirystylacja w innych białkach stabilizuje interakcje enzymu z błoną komórkową i najprawdopodobniej pełni taką samą funkcję w CDPK. Ponadto, w domenie zmiennej w niektórych CDPK występuje konserwowana sekwencja PEST. Jest to sekwencja bogata w prolinę, glutaminę, serynę, treoninę i występuje w białkach ulegających szybkiej degradacji proteolitycznej [91].

Domena katalityczna CDPK jest domeną charakterystyczną dla kinaz białkowych serynowo-treoninowych [92]. Domenę łącznikową tworzy 31 aminokwasów. Wykazano, że ta domena pełni funkcję autoinhibitorową, ponieważ zawiera sekwencję pseudosubstratu, która w nieobecności Ca^{2+} blokuje miejsce katalityczne enzymu [93, 94]. Region autoinhibitorowy jest silnie konserwowany. I tak np. region ten wykazuje ponad 90% identyczności w sekwencji aminokwasowej pomiędzy poszczególnymi izoenzymami CDPK w *A. thaliana*.

Domena podobna do kalmoduliny w CDPK zawiera 4 motywy „*EF-hand*” (podobnie jak kalmodulina) i jest w 30-40 % identyczna w sekwencji aminokwasowej z kalmodulinami zwierzęcymi i roślinnymi. Domena ta jest domeną regulatorową enzymu. Do domeny tej wiążą się jony wapnia, co wywołuje zmiany konformacyjne i w konsekwencji aktywuje enzym. CLD posiada wspólne cechy strukturalne z innymi białkami wiążącymi Ca^{2+} .

Wyizolowano z bibliotek cDNA kukurydzy i marchwi klony kodujące kinazy białkowe podobne do CDPK, które zostały nazwane CRK (z ang. *CDPK Related Kinase*). CRK różnią się od typowych CDPK zmienioną domeną podobną do kalmoduliny (CLD) i dlatego są kinazami białkowymi, które nie wiążą jonów wapnia [95, 96].

Izoenzymy ZmCRK3 i ZmCRK1 z kukurydzy posiadają CLD z częściowo zakonserwowanymi motywami „*EF-hand*”, natomiast w izoenzymie z marchwi nie wykryto homologii do domeny podobnej do kalmoduliny. Interesującym jest klon cDNA wyizolowany z lilii. Klon ten nazwany CCaMK koduje kinazę białkową mającą oprócz domeny katalitycznej dwie domeny regulacyjne: domenę wiążącą kalmodulinę oraz domenę wiążącą Ca^{2+} podobną do visininy [97] (Ryc. 3C). Białka podobne do visininy posiadają 3 motywy „*EF-hand*” wiążące jony wapnia i należą do grupy białek występujących w tkance nerwowej. Niezwykłą cechą CCaMK jest obecność w domenie podobnej do visininy zakonserwowanej sekwencji wiążącej biotynę, jednakże rola biotyny w regulacji CCaMK jest nieznana. Sekwencji wiążącej biotynę nie wykryto w białkach visininy tkanki nerwowej. Badania enzymatyczne białka ekspresyjnego CCaMK wykazały, że wiąże ono bezpośrednio Ca^{2+} oraz kalmodulinę w sposób zależny od Ca^{2+} . Zarówno cechy strukturalne CCaMK jak i badania enzymatyczne sugerują, że enzym jest regulowany przez podwójny system kontroli.

IV-2. Właściwości CDPK

Jony wapnia są pozytywnymi regulatorami aktywności CDPK. Zaproponowano istnienie dwóch alternatywnych modeli aktywacji CDPK [93, 94]. W obu modelach jony wapnia wiążą się do CLD i indukują zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu. W wyniku tych zmian następuje uwalnianie regionu autoinhibitorowego od domeny katalitycznej i aktywacja enzymu. Yoo i Harmon [98] sugerują, że wiązanie CLD do domeny łącznikowej jest niewystarczające do aktywacji enzymu. Prawdopodobnie interakcja CLD z dodatkowymi regionami na powierzchni enzymu może powodować aktywację enzymu.

Aktywność enzymatyczna CDPK jest zależna od mikromolarnych stężeń wolnych jonów wapnia. W obecności Ca^{2+} aktywność CDPK jest stymulowana 50-100-krotnie. Jednakże często obserwowany jest brak wpływu Ca^{2+} na aktywność enzymu. Spowodowane jest to proteolityczną degradacją domeny regulatorowej. Do aktywacji natomiast nie jest wymagana kalmodulina. CDPK wykazuje wspólne cechy z kalmoduliną, ponieważ oddziałuje podobnie jak kalmodulina w sposób zależny od Ca^{2+} z licznymi strukturami hydrofobowymi i amfipatycznymi np. kalmidazolium — CMZ, sulfonamidem naftalen-W-7 i tryfluoroperazyną-TFP [99-101]. Związki

te są inhibitorami kinaz białkowych zależnych od Ca^{2+} i kalmoduliny, hamują również w wyższych stężeniach aktywność CDPK. W kalmodulinie domena hydrofobowa wyeksponowana po związaniu jonów wapnia jest odpowiedzialna za w/w oddziaływanie. Można przypuszczać, że w cząsteczkach CDPK za oddziaływanie hydrofobowe są odpowiedzialne struktury kalmodulino-podobne.

Najlepszym substratem *in vitro* dla większości CDPK jest histon H1. Do tej pory nie wiadomo, czy histon H1 jest naturalnym substratem CDPK. W histonie H1 fosforylowane są przez CDPK zarówno reszty seryny jak i treoniny [82].

Wszystkie znane CDPK wykazują wspólne właściwości biochemiczne:

- aktywność CDPK jest zależna od Ca^{2+} ,
- oddziałują ze związkami hydrofobowymi i/lub amfipatycznymi,
- fosforylują histon H1 i wykazują szeroką specyficzność substratową podobną do niektórych zwierzęcych kinaz białkowych zależnych od Ca^{2+} .

Ostatnio wykazano, że niektóre izoformy CDPK mogą być również aktywowane przez lipidy. I tak np. kinaza białkowa z siewek kukurydzy o c. cz. około 54 kD, aktywowana przez Ca^{2+} i stymulowana przez fosfatydyloserynę (PS) i fosfatydyloinozytol (PI) została zidentyfikowana jako jedna z izoform CDPK [102 i praca wysłana do druku].

Ponadto CDPK związana z błoną komórkową owsa była aktywowana przez PI, LysoPC i lipidy z soi [103]. Aktywność innej kinazy, CDPK z *A. thaliana* (zwana AK1 – otrzymana jako białko rekombinacyjne) stymulowana była również przez LysoPC i PI [104].

IV-3. Lokalizacja i funkcje fizjologiczne CDPK

Izoenzymy CDPK występują w różnych częściach komórki. Są one zlokalizowane zarówno w błonach plazmatycznych [105, 106], w chromatynie [100], w mikrosomach [107] jak również we frakcji rozpuszczalnej [105] i w cytoszkielecie komórki [4]. Zaobserwowano tkankowo-specyficzne występowanie niektórych CDPK, np. jeden z izoenzymów CDPK kukurydzy występuje wyłącznie w pyłku kwiatowym [83], enzym zwany SPK z ryżu występuje tylko w rozwijających się nasionach [108], natomiast inne CDPK z ryżu (zwane OSCPK2 i OSCPK11) są obecne zarówno w korzeniach jak i koleoptylach tych roślin [109]. Biorąc pod uwagę fakt, że aktywność niektórych izoform CDPK może być regulowana przez lipidy błonowe należy przypuszczać, że kinazy te

ulegają translokacji do błon. Rolę w tym procesie najprawdopodobniej odgrywa post-translacyjna modyfikacja — mirystylacja (przyłączenie reszty kwasu tłuszczowego). Większość do tej pory poznanych izoenzymów CDPK posiada motyw mirystylacji i dlatego prawdopodobnie enzymy te mogą oddziaływać z błonami [90]. Za funkcjonalne powiązanie niektórych form CDPK z błonami przemawia również fakt, że większość do tej pory poznanych endogennych substratów CDPK np. nodulina-26, ATP-aza protonowa i reduktaza azotanowa są białkami błonowymi [4]. Występowanie u roślin wielu izoenzymów CDPK, niewielkie różnice w ich właściwościach oraz specyficzna lokalizacja zarówno tkankowa jak i komórkowa sugeruje ich odmienną rolę w regulacji specyficznych funkcji. Jednakże wiadomości dotyczące roli fizjologicznej CDPK są fragmentaryczne.

Zaobserwowano indukcję genu kodującego CDPK u *Vigna radiata* pod wpływem stresu mechanicznego [110]. Dwa inne geny ATCDPK1 i ATCDPK2 kodujące CDPK w *Arabidopsis thaliana* są szybko indukowane przez stres wysokiej soli i suszę, ale nie przez niską i wysoką temperaturę [111]. Te dane sugerują udział CDPK w szlakach przekazywania sygnału przez wymienione bodźce. Również wyniki prac przeprowadzonych na protoplastach z liści kukurydzy sugerują udział niektórych izoenzymów CDPK w przekazywaniu sygnałów w stresie [112]. Ponadto CDPK może pełnić funkcję w morfogenezie bulw ziemniaczanych, ponieważ obserwowano 2,5-krotny wzrost aktywności tej kinazy podczas tego procesu [113]. Wykazano korelację między ekspresją genu kodującego CDPK (zwanego SPK) w rozwijających się nasionach ryżu a ekspresją genów kodujących enzymy syntetyzujące lipidy i skrobię oraz białka zapasowe nasion. Przypuszcza się, że SPK może więc odgrywać rolę w syntezie komponentów zapasowych nasion, między innymi w regulacji biosyntezy skrobi podczas rozwoju nasion. Za tym przypuszczeniem przemawia fakt, że gen SPK jest zlokalizowany na chromosomie obok genu shel kodującego enzymy syntetyzujące skrobię [108]. Specyficzną funkcję w kiełkowaniu i we wzroście pyłku kwiatowego przypisuje się wspomnianemu powyżej specyficznie tkankowemu izoenzymowi CDPK z kukurydzy. Analiza typu „Northern” i „Western” wykazała, że gen z pyłku kukurydzy kodujący CDPK ulega ekspresji tylko podczas wzrostu i kiełkowania pyłku [83].

Poznanie endogennych substratów CDPK sugeruje rolę enzymu w regulacji: aktywności białek trans-

portowych [106] i tworzących kanały jonowe [114-116], metabolizmu węglowodanów [117-120], metabolizmu azotanów [121-123], wiązania dwutlenku węgla [124] oraz w obronie roślin przed patogenami [125].

V. Uwagi końcowe

Kinazy białkowe regulują podstawowe funkcje życiowe komórki. Zasadnicze różnice w metabolizmie i funkcji organizmów zwierzęcych i roślinnych są prawdopodobnie przyczyną, a może też skutkiem, obecności w tych organizmach różnych kinaz białkowych. Kinazy białkowe zależne od jonów wapnia pełnią istotną rolę w przekazywaniu sygnału we wszystkich komórkach eukariotycznych. Typowymi kinazami zwierzęcymi są kinazy białkowe C i kinazy CaM, natomiast CDPK reprezentuje świat roślin.

Obecność domeny podobnej do kalmoduliny (CLD) w typowo roślinnych CDPK, jest najważniejszą cechą odróżniającą je od zwierzęcych kinaz białkowych zależnych od Ca^{2+} i fosfolipidów i kinaz zależnych od kompleksu Ca^{2+} /kalmodulina. Dzięki obecności CLD roślinne CDPK są bezpośrednio aktywowane przez jony wapnia. Natomiast budowa i mechanizm aktywacji roślinnych CDPK jest podobny do zwierzęcych kinaz CaM. Harper i wsp. [126] sugerują, że gen kodujący CDPK powstał z połączenia dwóch genów: genu kodującego kinazę zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny oraz genu kodującego białko podobne do kalmoduliny. Prawdopodobnie podobne zjawisko było przyczyną powstania kalpajiny. Analiza struktury wykazała, że kalpajina — zwierzęca proteaza zależna od Ca^{2+} powstała z połączenia dwóch genów; kodującego kalmodulinę i genu kodującego domenę katalityczną proteazy [127].

Występowanie wielu izoenzymów omawianych kinaz białkowych sugeruje ich odmienną rolę w regulacji podstawowych funkcji. Świadczyć o tym może specyficzna lokalizacja niektórych izoenzymów zarówno tkankowa jak i komórkowa. Z drugiej jednak strony, niewielkie różnice w ich właściwościach nie wykluczają możliwości zastępowania jednej izoformy danego enzymu przez inną. I tak np. możliwość ta może tłumaczyć dlaczego w *Arabidopsis thaliana* (roślinie narażonej na wiele stresów środowiska) jest obecnych około 20 genów kodujących CDPK. Obecność w roślinach CDPK stymulowanych przez fosfolipidy może sugerować, że enzymy te pełnią rolę funkcjonalnych analogów PKC w przekazywaniu sygnału.

Można przypuszczać, że podobnie jak PKC grupa innych kinaz regulowanych przez wtórne przekąźniki, reprezentowana przez kinazy białkowe zależne od cyklicznych nukleotydów (cAMP i cGMP) występuje wyłącznie w organizmach zwierzęcych. Natomiast wiele kinaz białkowych np. kinazy CK (z ang. *Casein Kinase*), MAPK (z ang. *Mitogen Activated Protein Kinase*) i CDK (z ang. *Cyclin Dependent Kinase*) występuje zarówno u roślin jak i u zwierząt. Kinazy te mają znacznie szerszą specyficzność i prawdopodobnie uczestniczą w regulacji procesów wspólnych dla wszystkich żywych organizmów.

Artykuł otrzymano 30 października 1999 r.

Zaakceptowano do druku 14 stycznia 2000 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Barańska J (1997) *Kosmos* **46**: 33-44
2. Kuźnicki J (1998) *Postępy Biologii Komórki* **25**: 311-316
3. Nałęcz K (1997) *Kosmos* **46**: 615-623
4. Roberts DM, Harmon AC (1992) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 375-414
5. Zając J (1989) *Post Biochem* **35**: 245-252
6. Kwiatkowska J (1989) *Post Biochem* **35**: 253-263
7. Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y (1977) *J Biol Chem* **252**: 7603-7609
8. Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y (1977) *J Biol Chem* **252**: 7610-7616
9. Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T, Nishizuka Y (1979) *J Biol Chem* **254**: 3692-3695
10. Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y (1979) *Biochem Biophys Res Commun* **91**: 1218-1224
11. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982) *J Biol Chem* **257**: 7847-7851
12. Blobel GA, Stribling DS, Fabbro D, Stabel S, Hannun YA (1996) *J Biol Chem* **271**: 15823-15830
13. Quest AF, Bloomenthal J, Bardes ES, Bell RM (1992) *J Biol Chem* **267**: 10193-10197
14. Sharkey N, Blumberg P (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **133**: 1051-1056
15. Oancea E, Teruel MN, Quest AF, Meyer T (1998) *J Cell Biol* **140**: 485-49
16. Szallasi Z, Bogi K, Gohari S, Biro T, Acs P, Blumberg PM (1996) *J Biol Chem* **271**: 18299-18301
17. Bazzi MD, Nelsestuen GL (1990) *Biochemistry* **29**: 7624-7630
18. Shao X, Davletov BA, Sutton RB, Sudhof TC, Rizo J (1996) *Science* **273**: 248-251
19. Sossin WS, Schwartz JH (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 207-208
20. Kemp BE, Pearson RB (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 342-346
21. Stabel S, Parker PJ (1991) *Pharmac Ther* **51**: 71-95
22. Palmer RH, Ridden J, Parker PJ (1995) *Eur J Biochem* **227**: 344-351
23. Mellor H, Parker PJ (1998) *Biochem J* **332**: 281-292
24. Hunter T, Plowman GD (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 18-22
25. Czarny M, Poddana H, Barańska J (1992) *Post Biochem* **38**: 107-112
26. Munnik T, Irvine RF, Musgrave A (1998) *Biochim Biophys Acta* **1389**: 222-272
27. Chandok MR, Sopory SK (1998) *J Biol Chem* **273**: 19235-19242

28. Borner C, Filipuzzi I, Wartmann M, Eppenberger U, Fabbro D (1989) *J Biol Chem* **264**: 13902-13909
29. Cazaubon S, Bornacin F, Parker P J (1994) *Biochem J* **301**: 443-448
30. Orr JW, Newton AC (1994) *J Biol Chem* **269**: 27715-27718
31. Bornacin F, Parker PJ (1996) *Curr Biol* **6**: 1114-1123
32. Bornacin F, Parker PJ (1997) *J Biol Chem* **272**: 3544-3549
33. Edwards AS, Newton AC (1997) *J Biol Chem* **272**: 18382-18390
34. Keranen LM, Dutil EM, Newton AC (1995) *Curr Biol* **5**: 1394-1403
35. Newton AC (1995) *J Biol Chem* **270**: 28495-28498
36. Nishizuka Y (1984) *Nature* **308**: 693-698
37. Hug H, Sarre TF (1993) *Biochem J* **291**: 329-343
38. Mathias S, Peña LA, Kolesnick RN (1998) *Biochem J* **335**: 465-480
39. Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S, Parra A, Burns DJ, Ballas LM, Cantley LC (1994) *J Biol Chem* **269**: 32358-32367
40. Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y (1977) *J Biol Chem* **252**: 7610-7616
41. Pontremoli S, Michetti M, Melloni E, Sparatore B, Salamino F, Horecker BL (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3705-3707
42. Liscovitch M (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 393-399
43. Pawełczyk T (1996) *Post Biochem* **42**: 290-298
44. Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P, Sanz L, Moscat J (1995) *EMBO J* **14**: 6157-6163
45. Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE (1995) *Genes & Development* **9**: 1559-1571
46. Schönwasser D C, Marais R M, Marshall C J, Parker P J (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 790-798
47. Toda T, Dhut S, Superti-Furga G, Gotoh Y, Nishida E, Sugiura R, Kuno T (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 6752-6764
48. Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE, Gustin MC (1995) *J Biol Chem* **270**: 30157-30161
49. Costigan C, Snyder M (1994) *Mol Gen Genet* **243**: 286-296
50. Mazzoni C, Zarov P, Rambourg A, Mann C (1993) *J Cell Biol* **123**: 1821-1833
51. Costigan C, Gehrung S, Snyder M (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 1162-1178
52. Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K, Levin DE (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 3067-3075
53. Irie K, Takase M, Lee KS, Levin DE, Araki H, Matsumoto K, Oshima Y (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 3076-3083
54. Gray JV, Ogas JP, Kamada Y, Stone M, Levin DE, Herskowitz I (1997) *EMBO J* **16**: 4924-4937
55. Levin DE, Fields FO, Kunisawa R, Bishop JM, Thorner J (1990) *Cell* **62**: 213-224
56. Marini NJ, Meldrum E, Buehrer B, Hubberstey AV, Stone DE, Traynor-Kaplan A, Reed SI (1996) *EMBO J* **15**: 3040-3052
57. Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee M H, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A (1998) *Curr Biol* **8**: 1069-1077
58. Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ (1998) *Science* **281**: 2042-2045
59. Herrera-Velitz P, Knutson KL, Reiner NE (1997) *J Biol Chem* **272**: 16445-16452
60. Akimoto K, Takahashi R, Moriya S, Nishioka N, Takayanagi J, Kimura K, Fukui Y, Osada S, Mizuno K, Hirai S, Kazlauskas A, Ohno S (1996) *EMBO J* **15**: 788-798
61. Nishizuka Y (1986) *Science* **233**: 305-312
62. Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J (1996) *Cell* **86**: 777-786
63. Murray NR, Fields AP (1997) *J Biol Chem* **272**: 27521-27524
64. Livneh E, Fishman DD (1997) *Eur J Biochem* **248**: 1-9
65. Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A (1992) *Nature* **356**: 618-622
66. Buchner K (1995) *Eur J Biochem* **228**: 211-221
67. Keenan C, Long A, Kelleher D (1997) *Biochim Biophys Acta* **1358**: 113-126
68. Soderling TR (1996) *Biochim Biophys Acta* **1297**: 131-138
69. Schulman H (1993) *Current Opinion in Cell Biol* **5**: 247-253
70. Hanson P, Schulman H (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 559-601
71. Braun AP, Schulman H (1995) *Annu Rev Physiol* **57**: 417-445
72. Putney JW Jr (1998) *Science* **279**: 191-192
73. Fukunaga K, Stoppini L, Miyamoto E, Muller D (1993) *J Biol Chem* **268**: 7863-7867
74. Kanaseki T, Ikeuchi Y, Sugiura H, Yamauchi T (1991) *J Cell Biol* **115**: 1049-1060
75. Payne ME, Fong Y-L, Ono T, Colbran RJ, Kemp BE, Soderling TR, Means AR (1988) *J Biol Chem* **263**: 7190-7195
76. Mukherji S, Soderling TR (1994) *J Biol Chem* **269**: 13744-13747
77. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H (1992) *Science* **256**: 1199-1202
78. Ohya Y, Kawasaki H, Suzuki K, Londesborough J, Anraku Y (1991) *J Biol Chem* **266**: 12784-12794
79. Watillon B, Kettman R, Boxus P, Burny A (1993) *Plant Physiol* **101**: 1381-1384
80. Watillon B, Kettman R, Boxus P, Burny A (1995) *Plant Physiol* **108**: 847-848
81. Lu Y-T, Hidaka H, Feldman LJ (1996) *Planta* **199**: 18-24
82. Putnam-Evans C, Harmon AC, Cormier MJ (1990) *Biochemistry* **29**: 2488-2495
83. Estruch JJ, Kadwell S, Merlin E, Crossland L (1994) *Proc Natl Acad Sci* **91**: 8837-8841
84. Saijo Y, Hata S, Sheen J, Izui K (1997) *Biochim Biophys Acta* **1350**: 109-114
85. Berberich T, Kusano T (1997) *Mol Gen Genet* **254**: 275-283
86. Takezawa D, Patil S, Bhatia A, Poovaiah BW (1996) *J Plant Physiol* **149**: 329-335
87. Zhao Y, Kappes B, Franklin RM (1993) *J Biol Chem* **268**: 4347-4354
88. Kim K, Messinger LA, Nelson DL (1998) *Eur J Biochem* **251**: 605-612
89. Hrabak EM, Dickmann LJ, Satterlee JS, Sussman MSR (1996) *Plant Mol Biol* **31**: 405-412
90. Satterlee JS, Sussman MR (1998) *J Membrane Biol* **164**: 205-213
91. Loetscher P, Pratt G, Rechsteiner M (1991) *J Biol Chem* **266**: 11213-11220
92. Hanks SK, Quinn AM (1991) *Methods Enzymol* **200**: 38-62
93. Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C (1994) *Biochemistry* **33**: 7278-7287
94. Harper JF, Huang J-F, Lloyd SJ (1994) *Biochemistry* **33**: 7267-7277
95. Lindzen E, Choi JH (1995) *Plant Mol Biol* **28**: 785-797
96. Furumoto T, Ogawa N, Hata S, Izui K (1996) *FEBS Lett* **396**: 147-151
97. Patil S, Takezawa D, Poovaiah BW (1995) *Proc Natl Acad Sci* **92**: 4897-4901
98. Yoo B-Ch, Harmon AC (1996) *Biochemistry* **35**: 12029-12037
99. Polya GM, Micucci V (1985) *Plant Physiol* **79**: 968-972
100. Li H, Dauwalder M, Roux SJ (1991) *Plant Physiol* **96**: 720-727
101. Guo Y-L, Roux SJ (1990) *Plant Physiol* **94**: 143-150
102. Muszyńska G, Ekman P, Engström L (1993) *Biochemistry and Molecular Biology International* **30**: 849-860
103. Schaller GE, Harmon AC, Sussman MR (1992) *Biochemistry* **31**: 1721-1727
104. Harper JF, Binder BM, Sussman MR (1993) *Biochemistry* **32**: 3282-3290

105. Battey NH (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 17-22
106. Weaver CD, Crombie B, Stacey G, Roberts DM (1991) *Plant Physiol* **95**: 222-227
107. Yuasa T, Muto S (1992) *Arch Biochem Biophys* **296**: 175-182
108. Kawasaki T, Hayashida N, Baba T, Shinozaki K, Shimada H (1993) *Gene* **129**: 183-189
109. Breviario D, Morello L, Giani S (1995) *Plant Mol Biol* **27**: 953-967
110. Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M, Arteca RN (1996) *Plant Mol Biol* **30**: 1129-1137
111. Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K (1994) *Mol Gen Genet* **244**: 331-340
112. Sheen J (1996) *Science* **274**: 1900-1902
113. MacIntosh GC, Ulloa RM, Raices M, Tellez-Iñón MT (1996) *Plant Physiol* **112**: 1541-1550
114. Lino B, Baizabal-Aquirre VM, González de la Vara LE (1998) *Planta* **204**: 352-359
115. Li J, Lee Y-R, Assman S M (1998) *Plant Physiol* **116**: 785-795
116. Pei Z-M, Ward JM, Harper JF, Schroeder JI (1996) *EMBO J* **15**: 6564-6574
117. Toroser D, Huber SC (1997) *Plant Physiol* **114**: 947-955
118. Huber SC, Huber JL, Liao P-CH, Gage DA, McMichael RW Jr, Chourey PS, Hannah LC, Koch K (1996) *Plant Physiol* **112**: 793-802
119. Lindblom S, Ek P, Muszyńska G, EK B, Szczeciński J, Engström L (1997) *Acta Biochim Polon* **44**: 809-817
120. Zhang X-Q, Chollet R (1997) *FEBS Lett* **410**: 126-130
121. Bachman M, McMichel RW Jr, Huber JL, Kaiser WM, Huber SC (1995) *Plant Physiol* **108**: 1083-1091
122. Douglas P, Moorhead G, Hong Y, Morrice N, MacKintosh C (1998) *Planta* **206**: 435-442
123. Huber SC, Bachmann M, Huber JL (1996) *Trends in Plant Science* **1**(12): 432-438
124. Ogawa N, Yabuta N, Ueno Y, Izui K (1998) *Plant Cell Physiol* **39**: 1010-1019
125. Neumann GM, Condron R, Polya GM (1996) *Biochim Biophys Acta* **1298**: 223-240
126. Harper JF, Sussman MR, Schaller GE, Putnam-Evans C, Charbonneau H, Harmon AC (1991) *Science* **252**: 951-954
127. Suzuki K (1987) *Trends Biochem Sci* **12**: 103-105

Budowa i sposoby regulacji reduktazy azotanowej

Structure and regulation of nitrate reductase

MAŁGORZATA REDA¹, GRAŻYNA KŁOBUS², JÓZEF BUCZEK³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa reduktazy azotanowej
- III. Sposoby regulacji aktywności NR
 - III-1. Regulacja aktywności NR na poziomie genetycznym
 - III-2. Posttranslacyjna regulacja aktywności NR

Wykaz stosowanych skrótów: AMP — adenozymonofosforan; ATP — adenozyntrifosforan; BPB — błękit bromofenolowy; FAD — dinukleotyd flawinoadeninowy; Fdr — ferredoksyna; FMNH — zredukowany mononukleotyd flawinowy; IP — białko inhibitorowe reduktazy azotanowej; Mo-Co — kofaktor molibdenowy; MVH — zredukowany metylowiologen; NADH — zredukowany nukleotyd nikotynamidoadeninowy; NADPH — zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; NR — reduktaza azotanowa; NiR — reduktaza azotynowa; p-HMB — kwas p-hydroksymerkuriobenzoowy; P_i — fosforan nieorganiczny; PM-NR — reduktaza azotanowa związana z plazmolemą.

I. Wstęp

Rośliny wyższe obok glonów, niektórych bakterii i grzybów posiadają zdolność asymilacji azotanów stanowiących główne źródło azotu nieorganicznego. Proces ten ma fundamentalne znaczenie biologiczne i odgrywa ogromną rolę w przyswajaniu azotu. Asymilacja azotanów to proces dwustopniowej redukcji NO₃⁻ do NH₄⁺ katalizowany przez dwa enzymy. Pierwszym etapem jest redukcja NO₃⁻ do NO₂⁻ polegająca na przeniesieniu dwóch elektronów z donora (NADH lub NADPH) na akceptor (NO₃⁻), w wyniku czego powstają jony azotynowe. Reakcja ta katalizowana jest przez reduktazę azotanową (NR). Dalszą redukcję azotynów do amoniaku lub jonów amonowych katalizuje reduktaza azotynowa (NiR) poprzez przeniesienie sześciu elektronów ze zredukowanej

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of nitrate reductase
- III. Types of NR activity modulation
 - III-1. Regulation of NR activity on genetic level
 - III-2. Posttranslational regulation of NR activity

ferredoksyny (Fdr) na azotyn. Dopiero tak zredukowane formy azotu włączane są w szlak syntezy aminokwasów.

II. Budowa reduktazy azotanowej

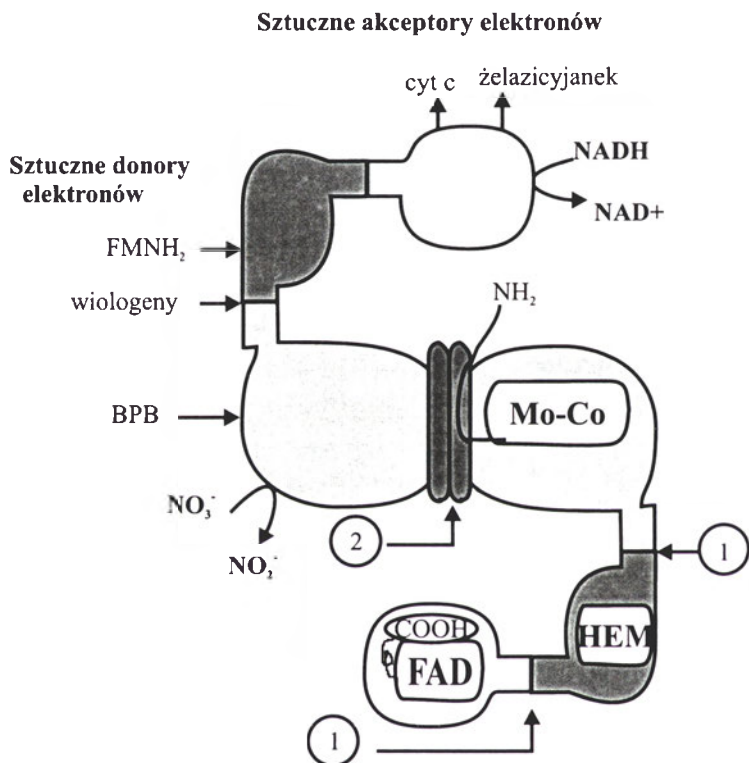
W tkankach roślinnych występują trzy izoformy reduktazy azotanowej różniące się specyficznością wobec reduktora oraz lokalizacją tkankową [1]. Najbardziej powszechną w tkankach roślin wyższych jest monospecyficzna NADH-NR (EC 1.6.6.1) wykorzystująca jedynie NADH jako dawcę elektronów. W korzeniach wielu roślin, takich jak *Hordeum*, *Zea mays* i *Oryza sativa*, obok formy monospecyficznej NADH-NR, występuje także bispecyficzna NAD(P)-H-NR (EC 1.6.6.2), dla której NADH i NADPH stanowią równorzędne donory elektronowe. W tkankach *Betula pendula* i *Erythrina senegalensis* forma bispecyficzna jest jedyną aktywną formą reduktazy azotanowej [2]. Natomiast w komórkach grzybów występuje monospecyficzna NADPH-NR (EC 1.6.6.3) nie wykryta u roślin wyższych [1].

Zarówno struktura cząsteczki, jak i mechanizm katalizy enzymatycznej reduktazy azotanowej są doskonale poznane (Ryc.1). NR należy do dużej grupy białek enzymatycznych zawierających cytochrom *b₅*, obejmującej reduktazę siarczanową, reduktazę NADH-cyt *c* oraz dehydrogenazę mleczanową [3]. NR składa się z trzech funkcjonalnych domen zawierających trzy różne centra redoks uczestniczące w transporcie elektronów. Są to: domena zawierająca FAD, domena zawierająca żelazo hemowe zidentyfikowane jako cytochrom *b₅₅₇* oraz domena zawierająca kofaktor molibdenowy, zwany molibde-

¹Mgr, ²Dr hab., ³Prof. dr hab. Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki Uniwersytetu Wrocławskiego, Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

nopteryną (Mo-Co). Domena ta jest odpowiedzialna także za dimeryzację enzymu, który w formie natywnej występuje jako homodimer o masie 200-270 kDa, rzadziej jako homotetramer [4]. Miejsca łączące poszczególne domeny NR (Ryc. 1, pkt. 1 i 2), złożone z 15 do 30 reszt aminokwasowych, wykazują dużą wrażliwość na działanie enzymów proteolitycznych [4-6]. Badania nad strukturą pierwszorzędową, a także strukturą przestrzenną podjednostek reduktazy azotanowej wykazują, że domena wiążąca kofaktor molibdenowy znajduje się na N-końcu białka pod-

tro możliwe jest ponadto przekazanie elektronów na akceptory inne niż NO_3^- . Jeśli w transporcie elektronów uczestniczy tylko domena zawierająca FAD, stanowiąca początkowy (proksymalny) odcinek enzymu, a utlenianiu NAD(P)H towarzyszy redukcja cytochromu *c* lub żelazicyjanki, to mówimy o dehydrogenazowej bądź diaforazowej aktywności enzymu. Ta tzw. cząstkowa aktywność reduktazy azotanowej hamowana jest całkowicie przez *p*-HMB. Naturalny dawca elektronów (NAD(P)H) w próbach *in vitro* może być zastąpiony



Ryc. 1. Hipotetyczna budowa dimeru reduktazy azotanowej. 1 — miejsca wrażliwe na działanie proteaz, 2 — miejsce połączenia mostkami -SH dwóch monomerów Mo-Co — kofaktor molibdenowy, HEM — żelazo hemowe w postaci cyt b_{557} , FAD — dinukleotyd flawinoadeniny, FMNH_2 — zredukowany nukleotyd flawinowy, BPB — błękit bromofenolowy, NAD — nukleotyd nikotynamidoadeninowy, NADH — zredukowany nukleotyd nikotynamidoadeninowy.

jednostki i zarazem stanowi połowę całej proteiny. Domena wiążąca żelazo hemowe zajmuje centralny rejon białka, a domena z grupą FAD położona jest na C-końcu proteiny monomeru [2]. Porównanie poznanych sekwencji aminokwasów białka reduktazy azotanowej wskazuje na wysokie podobieństwo pomiędzy roślinną NR a reduktazą azotanową występującą w komórkach glonów czy grzybów, co z kolei sugeruje, że struktura trzeciorzędowa oraz funkcje katalityczne reduktazy azotanowej u *Eucaryota* są podobne [7].

In situ, w komórkach roślinnych, przy udziale NR zachodzi transport elektronów ze zredukowanego donora (NAD(P)H) na utleniony akceptor. Pierwszym akceptorem elektronów w łańcuchu transportu elektronów NR jest FAD, z którego elektrony przenoszone są kolejno poprzez cytochrom b_{557} i Mo-Co na azotany. W próbach *in vi-*

przez FMNH lub MVH . Ponieważ redukcja azotanów w obecności tych kofaktorów nie jest wrażliwa na inhibitory takie jak *p*-HMB, ale wykazuje ogromną wrażliwość na azydki, cyjanki i jony wolframowe, jasne jest, że uczestniczy w niej fragment NR zawierający żelazo hemowe oraz domena molibdenowa. Także zredukowany błękit bromofenolowy może być reduktorem wykorzystywanym przez NR do redukcji azotanów w próbach *in vitro*. Reakcja katalizowana jest jedynie przez domenę molibdenową enzymu [8]. Fizjologiczne funkcje tzw. aktywności cząstkowych rozpuszczalnych form NR nie są znane.

Obok cytoplazmatycznej formy enzymu, w komórkach korzeni szeregu roślin obecna jest forma związana z plazmolemą (PM-NR) [9-12]. Jej udział w redukcji azotanów nie wydaje się istotny, z uwagi na to, że stanowi tylko niewielki procent całkowitej

aktywności reduktazowej. Możliwe natomiast, że aktywność dehydrogenazowa PM-NR jest odpowiedzialna za redukcję kompleksów żelaza z niskocząsteczkowymi związkami organicznymi (Fe^{+3} -siderofor) i uczestniczy w pobieraniu żelaza. Nie wyklucza się także udziału cząstkowych aktywności plazmolemowej NR w generowaniu powierzchniowych potencjałów redoksowych i regulacji procesów transportu przez błonę.

Badania molekularne i genetyczne wykazały, że znakomita większość roślin posiada dwa lub więcej genów strukturalnych kodujących apoproteinę reduktazy azotanowej [3]. Są to geny *Nia*, które klonowano z komórek *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Oryza*, *Lycopersicon* i *Hordeum*. U *Nicotiana plumbaginifolia* zidentyfikowano jedną sekwencję nukleotydową jako loci genu *Nia* [14]. Natomiast w amplidiploidalnym *N. tabacum* obecne są dwa homologiczne loci *Nia* [15, 16]. Dwie różne sekwencje zidentyfikowano jako loci *Nia* także w komórkach *Arabidopsis thaliana* (*Nia1* i *Nia2*) oraz w komórkach *Hordeum* (odpowiednio *Nar1* i *Nar7*). Wykazano, że u *A. thaliana* gen *Nia2* koduje około 90% aktywności reduktazy azotanowej, podczas gdy gen *Nia 1* odpowiada za pozostałe 10% aktywności enzymu [17]. Doświadczenia z użyciem mutantów *Hordeum* dowiodły, że gen *Nar1* koduje monospecyficzną izoformę NADH-NR, a gen *Nar7* bispecyficzną NAD(P)H-NR [18]. Porównanie sekwencji nukleotydowych genów *Nia* wskazuje na stosunkowo dużą homologię wśród różnych roślin. Generalnie stwierdzono, że u wszystkich zbadanych roślin sekwencja kodująca przedzielona jest trzema intronami o różnej długości, ale zajmujących raczej te same pozycje [2, 19]. W przeciwieństwie do sekwencji nukleotydowych egzonów, sekwencje intronowe są mniej konserwatywne [19].

Obok genów strukturalnych zidentyfikowano również geny kodujące biosyntezę kofaktora molibdenowego (Mo-Co). Są to geny *Nar2,3, 4,5,6 i 8 Hordeum* [20], geny *Cnx A, B, C, D, E, F* zidentyfikowane u *Nicotiana plumbaginifolia* [20-22] i geny *Cnx2,4,5 i 6* znalezione u *Arabidopsis thaliana* [20, 23]. Dokładne funkcje wszystkich genów Mo-Co do tej pory nie są poznane. Jednakże mutacje w ich obrębie, zwane mutacjami *cnx*, zawsze prowadzą do poważnych dysfunkcji reduktazy azotanowej. W wielu wypadkach mutanty *cnx* wykazują także zaburzenia aktywności innych enzymów zawierających w swojej cząsteczce kofaktor molibdenowy [13].

III. Sposoby regulacji aktywności NR

Reduktaza azotanowa, kluczowy enzym szlaku asymilacji azotanów, podlega wielopłaszczyznowej kontroli przez czynniki zewnętrzne i wewnętrzne, zapewniającej utrzymanie właściwego stosunku C:N w tkankach. Warunkuje to sprawne włączanie nieorganicznej formy azotu w związki organiczne. Kompleksowa regulacja aktywności biologicznej reduktazy przebiega zarówno na poziomie genetycznym, jak i posttranslacyjnym (Ryc. 2).

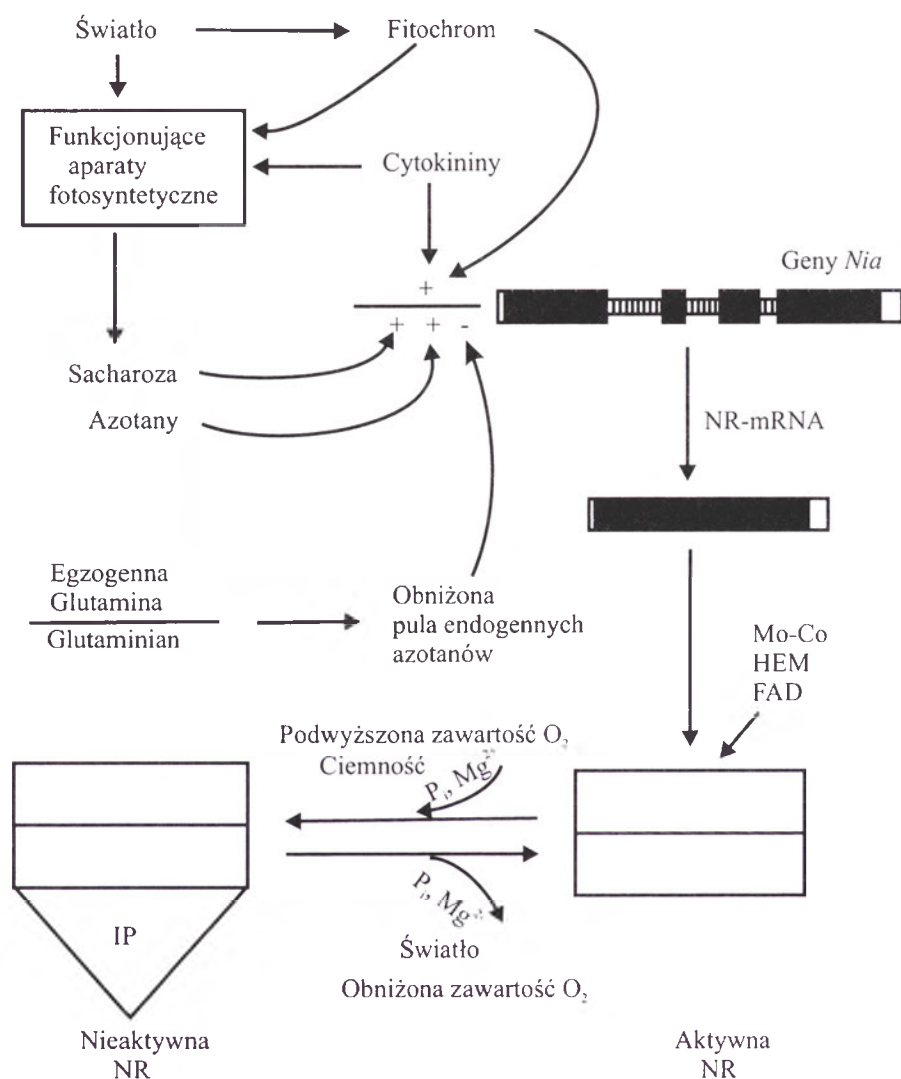
III-1. Regulacja aktywności NR na poziomie genetycznym

Kontrola aktywności biologicznej NR na poziomie genetycznym polega na regulacji ekspresji genów *Nia*. Głównym czynnikiem warunkującym ekspresję tych genów, objawiającą się wzmożoną akumulacją specyficznego transkryptyu (NR-mRNA) są azotany [4, 7, 13]. U roślin uprawianych na pożywkach bezazotanowych wprowadzenie azotanów do środowiska powoduje już w ciągu kilku minut 5-100-krotny wzrost specyficznego NR-mRNA [24]. Akumulację białka enzymatycznego obserwuje się z kilku godzinnym opóźnieniem. Wyniki badań z wykorzystaniem roślin transgenicznych i mutantów genów *Nia* potwierdzają, że azotany działają na poziomie genetycznym, a wzrost puli NR-mRNA jest wynikiem syntezy transkryptyu *de novo*.

Do tej pory uważano, że końcowe produkty szlaku asymilacji azotanów, glutamina i kwas glutaminowy, wpływają odwrotnie niż azotany na ekspresję genów *Nia* i poziom specyficznego transkryptyu. Obserwowano, że obydwa związki podawane egzogenne obniżają poziom NR-mRNA [25]. Wykazano również, że inaktywacja syntetazy glutaminianowej (GS) prowadząca do obniżenia zawartości endogennej glutaminy w liściach tytoniu wzmagala wyraźnie akumulację NR-mRNA. Takie wyniki sugerowały, że także endogenne glutaminy modulują ekspresję genów *Nia* [25]. Uznano więc, że glutamina odgrywa rolę w procesie regulacji reduktazy azotanowej prawdopodobnie jako represor na poziomie transkrypcji genów NR [26]. Ostatnie doniesienia podważają bezpośredni wpływ glutaminy na transkrypcję genów *Nia* [27]. Stwierdzono, że akumulacja glutaminy w liściach mutantów *gluS Arabidopsis thaliana* z uszkodzoną syntazą glutaminianową nie zmienia istotnie poziomu transkryptyu NR. Jest on podob-

ny lub nawet wyższy od poziomu NR-mRNA w komórkach odmian dzikich [27]. Jednakże egzogenna glutamina obniża pulę NR-mRNA, co zdaniem autorów jest wynikiem hamującego wpływu glutaminy na pobieranie azotanów [28] i w konsekwencji obniżonego endogennego poziomu azotanów.

presji genów *Nia* jest mniej klarowna. O ile bowiem etiolowane mutanty *pha*, jednego z genów kodujących fitochrom, nie akumulują na świetle transkrypty NR, to w przypadku zielonych siewek poziom *Nia* mRNA w odmianach dzikich jest taki sam jak w mutantach *pha* [37]. Świetlna stymulacja tran-



Ryc. 2. Regulacja aktywności reduktazy azotanowej przez różne czynniki na poziomie genetycznym i posttranslacyjnym. IP — inhibitor białkowy reduktazy azotanowej, NR — reduktaza azotanowa, P_i — fosforan nicorganiczny

Kolejnym ważnym czynnikiem regulującym ekspresję genów *Nia* jest światło [2, 7, 29, 30]. Po umieszczeniu etiolowanych siewek lub roślin zaadaptowanych do ciemności na świetle wielokrotnie rośnie poziom NR-mRNA [31-33]. Po ponownym umieszczeniu roślin w ciemności poziom transkrypty NR wyraźnie spada [32, 34]. Indukcja ekspresji genów *Nia* przez światło wymaga obecności jonów NO_3^- w środowisku, co sugeruje współdziałanie obydwu czynników w regulacji transkrypcji genów [2]. W świetlnej regulacji ekspresji genów kodujących NR, w przypadku roślin etiolowanych pośredniczy niewątpliwie fitochrom [33, 35, 36]. Natomiast w zielonych roślinach rola fitochromu w regulacji eks-

skrypcji genów *Nia* wydaje się mieć dość złożony charakter i zależna jest od niektórych metabolitów produkowanych w procesie fotosyntezy. Wiele badań wskazuje, że pośredniczą w niej pierwotne produkty fazy ciemnej fotosyntezy. W siewkach *Nicotiana plumbaginifolia* hodowanych w ciemności, glukoza, sacharoza i fruktoza wprowadzone do pożywki indukowały syntezę specyficznego NR-mRNA, białka NR oraz aktywność katalityczną enzymu [38]. Również u *Arabidopsis thaliana* rosnących w ciemności akumulację NR-mRNA obserwowano tylko wtedy, jeśli do medium inkubacyjnego wprowadzano cukry [31], a jego poziom był zbliżony do ilości transkrypty oznaczanego w siew-

kach hodowanych na świetle. Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że światło indukuje ekspresję genów *Nia* poprzez stymulację syntezy sacharozy [31]. Badania roślin transgenicznych potwierdziły, że wpływ sacharozy na regulację NR odbywa się na poziomie transkrypcyjnym [38]. Nie jest to jedyna możliwa droga działania światła na ekspresję genów *Nia*. Stwierdzono bowiem, że fotooksydacja chlorofilu bardzo gwałtownie hamuje indukcję reduktazy azotanowej na świetle [39]. Przepuszczalnie więc w świetlną regulację transkrypcji genów *Nia* zaangażowane są plastydy, czy raczej bliżej nieokreślony czynnik powstający w tych organellach.

Ekspresja genów *Nia* zależy także od fitohormonów roślinnych [7]. Powszechnie wiadomo, że fitohormony wpływają na regulację wielu genów, jednakże mechanizm ich działania nie jest do końca wyjaśniony [40]. Badania nad regulacją NR dowiodły, że cytokininy wzmagają ekspresję genów NR w etiolowanych liściach *Hordeum*, natomiast kwas abscyynowy obniża ją [40]. Wpływ cytokinin oraz ABA wymaga obecności światła, jednak współdziałanie fitohormonów i światła w regulacji poziomu transkrypty NR jest nie wyjaśnione [40].

U wielu roślin wyższych zarówno poziom NR-mRNA, poziom białka enzymatycznego i aktywność katalityczna NR podlegają cyklicznym rytmom dobowym [41-44]. Najwyższy poziom NR-mRNA osiąga na początku fazy świetlnej. Akumulacja białka NR następuje z kilku godzinnym opóźnieniem. Jednakże nie obserwuje się bezpośredniej korelacji między ilością syntetyzowanego białka, a poziomem aktywności reduktazy azotanowej. Cykliczne zmiany poziomu transkrypty, białka enzymatycznego i aktywności reduktazy azotanowej utrzymują się po przeniesieniu roślin do ciemności lub ciągłego światła, dowodząc endogenego charakteru fluktuacji [44]. Dobowe oscylacje nie występują u mutantów *nia* ani *cnx* [45]. Fizjologiczne znaczenie dobowych rytmów nie jest jasne [7].

III-2. Posttranslacyjna regulacja aktywności NR

Regulacja aktywności reduktazy azotanowej na poziomie posttranslacyjnym polega na odwracalnych bądź nieodwracalnych modyfikacjach strukturalnych białka enzymatycznego zmieniających aktywność katalityczną enzymu.

Jednym ze sposobów posttranslacyjnej regulacji aktywności enzymów, a także regulacji poziomu białek wewnątrzkomórkowych jest ich proteolityczna degradacja. Wiadomo, że duże białka podlegają ograniczonej proteolizie *in vivo* w szczególnych mo-

mentach cyklu komórkowego pod wpływem bodźców zarówno endo-, jak i egzogennych. Ograniczona proteoliza prowadząca do aktywacji pewnych białek i dezaktywacji innych umożliwia regulację szeregu procesów fizjologicznych [46]. Intensywność proteolizy rozmaitych białek jest różna. Wynika to zarówno z odmiennej wrażliwości białek docelowych na określone proteazy, jak i ze zmiennej aktywności enzymów proteolitycznych. Fakt ten warunkuje różnice w stabilności pomiędzy białkami wewnątrzkomórkowymi [46].

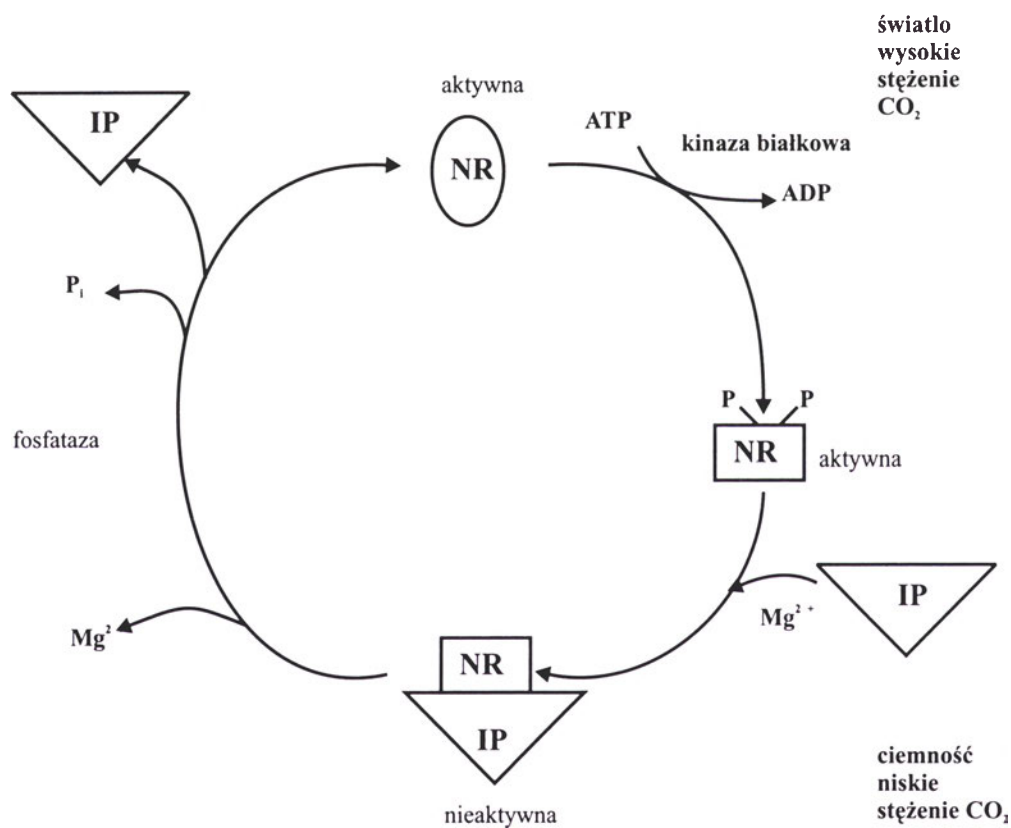
Reduktaza azotanowa jest enzymem bardzo niestabilnym, ulegającym łatwej inaktywacji podczas ekstrakcji z tkanek różnych roślin. Spośród enzymów szlaku redukcji azotanów, NR wykazuje największą wrażliwość na proteolizę, co objawia się najszybszą dezaktywacją enzymu [47, 48]. Szerokie badania nad czynnikiem inaktywującym NR *in vitro* prowadzone w ekstraktach z *Zea mays* [49-51], *Oryza sativa* [52], *Spirodela polyrhiza* [48, 53] dowiodły, że jest to białko dezaktywujące NR w procesie ograniczonej proteolizy. Doświadczenia z użyciem rozmaitych inhibitorów proteaz pozwoliły zaklasyfikować ten czynnik do szerokiej grupy endoproteaz serynowych [48]. Degradacja proteolityczna białka reduktazy azotanowej przez swoistą endopeptydazę obserwowana *in vitro* wskazuje na znaczenie procesu w regulacji metabolizmu azotowego w roślinach.

Innym powszechnym mechanizmem posttranslacyjnej regulacji aktywności wielu enzymów jest odwracalna fosforylacja białka. Liczne badania dowiodły, że zmiany aktywności reduktazy azotanowej, będące szybką, odwracalną reakcją na niektóre czynniki zewnętrzne wynikają z fosforylacji bądź defosforylacji białka enzymatycznego [54-57]. I tak, fosforylacja reduktazy azotanowej prowadzi ostatecznie do inaktywacji enzymu, natomiast defosforylacja białka powoduje zwiększenie jego aktywności. Szczegółowe badania dotyczące fosforylacji NR dowiodły, że w obecności ATP kinaza białkowa, należąca do szerokiej grupy kinaz serynowo-treoninowych, katalizuje fosforylację trzech reszt serynowych białka NR [56]. Szczególne znaczenie dla procesu regulacji aktywności enzymu ma seryna znajdująca się w pozycji 543, w rejonie H1 łączącym domeny zawierające cytochrom *b* i molibdenopterynę. [58, 59]. Do ufosforylowanej formy enzymu w obecności kationów dwuwartościowych (Mg^{2+} , Ca^{2+}) przyłącza się inhibitor białkowy (IP), który scharakteryzowano i zaklasyfikowano do szerokiej rodziny białek 14-3-3 [60]. Są to małe (25-32 kDa) kwaśne białka zaangażowane w przenoszenie sygnałów w

komórce poprzez interakcje z innymi białkami [61]. Połączenie białka 14-3-3 z białkiem docelowym zależy jest od specyficznej sekwencji aminokwasowej, w której centralne miejsce zajmuje ufosforylowana seryna [62]. Interakcje inhibitora białkowego (IP) z reduktazą azotanową mogą powodować zmiany konformacyjne w strukturze NR zaburzające przepływ elektronów z żelaza hemowego na molibdenopterynę, co w konsekwencji powoduje zahamowanie katalitycznych funkcji enzymu [58]. Dopiero w kompleksie z IP reduktaza azotanowa jest całkowicie nieaktywna. W badaniach nad rolą kationów dwuwartościowych w procesie dezaktywacji NR stwierdzono, że jony Ca^{2+} niezbędne są prawdopodobnie do aktywacji kinazy białkowej [63]. Nato-

kwaśnym (pH 6.5) przy braku Mg^{2+} , co sugeruje, że protony mogą zastępować kationy dwuwartościowe w reakcji NR z białkiem inhibitora [67]. Reaktywacja reduktazy azotanowej w pierwszym rzędzie wymaga dysocjacji przyłączonego kowalencyjnie inhibitora oraz jonów Mg^{2+} , a dopiero później defosforylacji reszt serynowych. Defosforylację enzymu katalizuje fosfataza należąca do fosfataz typu 1 lub 2A, o czym świadczą wyniki badań z użyciem specyficznych inhibitorów — kwasu okadaikowego i mikrocystyny LR [55, 68].

Opisany model posttranslacyjnej regulacji aktywności reduktazy azotanowej (Ryc. 3) powstał na podstawie licznych prac wykonanych na NR pochodzącej z zielonych tkanek roślin wyższych, ta-



Ryc. 3. Hipotetyczny przebieg posttranslacyjnej regulacji aktywności reduktazy azotanowej na drodze odwracalnej fosforylacji białka enzymatycznego. NR — reduktaza azotanowa, IP — inhibitor białkowy reduktazy azotanowej, P_i — fosforan nieorganiczny, Mo-Co — ko-faktor molibdenowy, HEM — żelazo hemowe w postaci cyt b_{557} , FAD — dinukleotyd flawinoadeninowy

miast znaczenie jonów Mg^{2+} nie jest do końca wyjaśnione. Wiadomo, że ich obecność sprzyja inaktywacji NR. Wcześniej uważano, że jony Mg^{2+} wiążą ufosforylowane reszty serynowe reduktazy umożliwiając asocjację z białkiem inhibitorowym i tworzenie nieaktywnych kompleksów [64-66]. Ostatnie doniesienia literaturowe sugerują, że Mg^{2+} i inne kationy dwuwartościowe nie tworzą połączeń z NR, ale reagują bezpośrednio z białkiem 14-3-3 powodując zmiany konformacyjne w jego strukturze, które manifestują się zwiększeniem powierzchni hydrofobowej. Umożliwia to połączenie inhibitora białkowego (IP) z ufosforylowaną reduktazą azotanową [67]. Podobne zmiany miały miejsce w środowisku lekko

kich jak *Spinacia oleracea* [55, 56], *Brassica campestris* [57], *Pisum sativum* [69] i *Zea mays* [70]. Enzym wyekstrahowany z naświetlanych liści tych roślin ulega szybkiej inaktywacji podczas inkubacji w obecności MgATP [54, 55]. Reaktywację enzymu obserwowano w obecności odpowiedniego stężenia AMP oraz EDTA chelatującego kationy dwuwartościowe, głównie Mg^{2+} [54, 68], a także w obecności nieorganicznych fosforanów (P_i) oraz KCl [71]. Reaktywacja NR przez te substancje mogłaby odbywać się poprzez dwie różne drogi: bezpośrednie oddziaływanie aktywatorów z białkiem 14-3-3 lub też poprzez stymulację endogennych fosfataz białkowych i defosforylację NR [72]. Stwierdzono, że ak-

Piśmiennictwo

tywatory mogą powodować rozrywanie kompleksów NR-IP. Niektóre sole nieorganiczne (P_i i KCl) powodują wzrost siły jonowej i zmiany konformacyjne białka 14-3-3, co może bezpośrednio wpływać na połączenie NR z inhibitorem [72]. Natomiast udział AMP w procesie reaktywacji reduktazy azotanowej jest niejasny [73]. Początkowo sugerowano, że AMP stanowi substrat w reakcji defosforylacji [54], ale nie zostało to potwierdzone w kolejnych badaniach [55, 56]. Najnowsze doniesienia sugerują, że AMP łączy się bezpośrednio z białkiem 14-3-3, przez co wpływa na jego interakcje z białkiem NR [72]. Nie wyklucza się również oddziaływań aktywatorów (AMP, P_i) z białkiem reduktazy azotanowej, których konsekwencją są zmiany konformacyjne i wzrost aktywności enzymu [71].

Posttranslacyjna, szybka modulacja NR w tkankach zielonych ściśle związana jest z warunkami świetlnymi oraz aktywnością fotosyntetyczną. Zmiana warunków świetlnych, jak zaobserwowano, wywołuje gwałtowne zmiany aktywności reduktazy azotanowej w liściach. Przeniesienie roślin ze światła do ciemności już po 20-30 min. powoduje obniżenie aktywności NR w liściach *Spinacia* do około 85-50%. Ponowne naświetlenie roślin wywołuje równie gwałtowny wzrost aktywności [56]. Zastosowanie inhibitorów kinaz lub fosfataz znosiło efekty zmiennego oświetlenia. Analiza białka cytoplazmatycznego NR w liściach wykazała, że na świetle występuje głównie forma defosfo-NR, która charakteryzuje się wysoką aktywnością katalityczną. W ciemności przeważa forma ufosforylowana enzymu o mniejszej aktywności i większej wrażliwości na hamujące działanie jonów Mg²⁺ [56]. Modyfikacje aktywności NR *in vivo* o podobnym charakterze obserwowano także w wyniku zmian ilości CO₂ w przestrzeniach międzykomórkowych [68]. Gdy stężenie CO₂ obniżało się aktywność NR również gwałtownie spadała, natomiast inkubacja tkanek w warunkach wysokiego stężenia CO₂ powodowała reaktywację enzymu [74]. Być może jest to efekt wzajemnych zależności między redukcją azotanów a procesem asymilacji węgla.

Wiadomo, że reduktaza azotanowa znajduje się też w korzeniach i podobnie jak liściowa NR podlega posttranslacyjnym modyfikacjom związanym ze zmianami warunków zewnętrznych np. warunków tlenowych [69, 75]. Fizjologiczna odpowiedź korzeniowej NR na czynniki zewnętrzne zachodzi prawdopodobnie na drodze odwracalnej fosforylacji białka enzymatycznego podobnie jak w tkankach zielonych. Jest ona jednak poznana w znacznie mniejszym stopniu.

1. Caboche M, Rouzé P (1990) *Trends Genet* 6: 187-192
2. Hoff T, Stummann BM, Henningsen KW (1992) *Physiol Plant* 84: 616-624
3. Hille R, Massey V (1985) W: Spiro TG (red.) *Molybdenum enzymes*. Wiley Interscience, New York, str. 443-518
4. Solomonson LP, Barber MJ (1990) *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 41: 225-253
5. Kubo Y, Ogura N, Nakkagawa H (1988) *J Biol Chem* 263: 19684-19689
6. Buczek J, Marciniak J (1990) *Wiad Bot* 34(1): 19-32
7. Hoff T, Truong N, Caboche M (1994) *Plant Cell Environ* 17: 489-506
8. Garde J, Kinghorn JR, Tomsett AB (1995) *J Biol Chem* 270: 6644-6650
9. Ward MR, Tischner R, Huffaker RC (1988) *Plant Physiol* 88: 1141-1145
10. Tischner R, Ward MR, Huffaker RC (1989) *Planta* 178: 19-24
11. Stöhr C, Tischner R, Ward MR (1993) *Planta* 191: 79-85
12. Kłobus G, Marciniak J, Buczek J (1994) *Acta Soc Bot Pol* 63(3-4): 309-314
13. Crawford NM., Arst Jr HN (1993) *Annu Rev Genet* 27: 115-145
14. Gabard J, Marion-Poll A, Chérel I, Meyer C, Müller A, Caboche M (1987) *Mol Gen Genet* 209: 596-606
15. Müller A, Mendel RR (1989) W: Wray JL, Kinghorn JR (red.) *Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*. Oxford Science Publications, Oxford, str. 166-185
16. Vaucheret H, Kronenberger J, Rouzé P, Caboche M (1989) *Plant Mol Biol* 12: 597-600
17. Wilkinson JQ, Crawford NM (1993) *Mol Gen Genet* 239: 289-297
18. Kleinhofs A, Warner RL, Lawrence JM, Melzer JM, Jetre JM, Kudrna DA (1989) W: Wray JL (red.) *Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*. Oxford Science Publications, Oxford, str. 197-211
19. Tamura N, Takahashi H, Takeba G, Sato T, Nakkagawa H (1997) *Biochim Biophys Acta* 1338: 151-155
20. Crawford NM, Wilkinson JQ, Labrie ST (1992) *Aust J Plant Physiol* 19: 377-385
21. Dirk R, Negrutiu I, Sidorov V, Jacobs M (1985) *Mol Gen Genet* 201: 339-343
22. Gabard J, Pelsy F, Marion-Poll A, Caboche M, Saalbach I, Grafe R, Müller AJ (1988) *Mol Gen Genet* 213: 206-213
23. Scholten HJ, de Vries SE, Nijdam H, Feenstra WJ (1985) *Theor Appl Genet* 71: 556-562
24. Melzer JM, Kleinhofs A, Warner RL (1989) *Mol Gen Genet* 217: 341-346
25. Deng MD, Moureaux T, Chérel I, Boutin JP, Caboche M (1991) *Plant Physiol Biochem* 29: 239-247
26. Vaucheret H, Marion-Poll A, Meyer C, Faure JD, Marin E, Caboche M (1992) *Mol Gen Genet* 235: 259-268
27. Dzuibany Ch, Haupt S, Fock H, Biehler K, Miggge A, Becker TW (1998) *Planta* 206: 515-522
28. Quesada A, Krapp A, Trueman LJ, Daniel-Vedele F, Fernández E, Forde BG, Caboche M (1997) *Plant Mol Biol* 34: 265-274
29. Pelsy F, Caboche M (1992) *Adv Genet* 30: 1-40
30. Warner RL, Kleinhofs A (1992) *Physiol Plant* 85: 245-252
31. Cheng C-H, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1861-1864
32. Faure JD, Vincentz M, Kronenberger J, Caboche M (1991) *Plant J* 1: 107-113

33. Mohr H, Neiningner A, Seith B (1992) *Bot Acta* **105**: 81-89
34. Deng MD, Moureaux T, Leydecker MT, Caboche M (1990) *Planta* **180**: 257-261
35. Rajasekhar VK, Gowri G, Campbell WH (1988) *Plant Physiol* **88**: 242-244
36. Neiningner A, Kronenberger J, Mohr H (1992) *Planta* **187**: 381-387
37. Becker TW, Foyer C, Caboche M (1992) *Planta* **188**: 39-47
38. Vincentz M, Mourcaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M (1993) *Plant J* **3**: 315-324
39. Cabello P, de la Haba P, González-Fontes A, Maldonado JM (1998) *Protoplasma* **201**: 1-7
40. Lu J-L, Ertl JR, Chen C-M (1992) *Plant Physiol* **98**: 1255-1260
41. Galangau F, Daniel-Vedele F, Moureaux T, Dorbe MF, Leydecker MT, Caboche M (1988) *Plant Physiol* **88**: 383-388
42. Cheng C-H, Acedo GN, Dewdney HM, Goodman HM, Conkling MA (1991) *Plant Physiol* **96**: 275-279
43. Lillo C (1991) *Plant Sci* **73**: 149-154
44. Pilgrim ML, Caspar T, Quail PH, McClung CR (1993) *Plant Mol Biol* **23**: 349-364
45. Pouteau S, Chérel I, Vaucheret H, Caboche M (1989) *Plant Cell* **1**: 111-112
46. Callis J (1995) *Plant Cell* **7**: 845-857
47. Streit L, Feller U (1983) *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **111**: 19-27
48. Buczek J (1984) *Acta Soc Bot Pol* **53**: 411-417
49. Batt R, Wallace W (1989) *Biochim Biophys Acta* **990**: 109-112
50. Long DM, Oaks A (1990) *Plant Physiol* **93**: 846-850
51. Goodfellow VJ, Solomonson LP, Oaks A (1993) *Plant Physiol* **101**: 415-419
52. Yamaya T, Ohira K (1977) *Plant Cell Physiol* **18**: 915-925
53. Jerzykiewicz J, Kłobus G, Konieczna M, Buczek J *Acta Physiol Plant* (praca w druku)
54. Kaiser WM, Spill D (1991) *Plant Physiol* **96**: 368-375
55. MacKintosh C (1992) *Biochim Biophys Acta* **1137**: 121-126
56. Huber JL, Huber SC, Campbell WH, Redinbaugh MG (1992) *Arch Biochem Biophys* **296**(1): 58-65
57. Kojima M, Wu SJ, Fukui H, Sugimoto T, Nanmori T, Oji Y (1995) *Physiol Plant* **93**: 139-145
58. Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo BCh, Harmon AC, Huber SC (1996) *Plant Cell* **8**: 505-517
59. Su W, Huber SC, Crawford NM (1996) *Plant Cell* **8**: 519-527
60. Bachmann M, Huber JL, Liao PCh, Gage DA, Huber SC (1996) *FEBS Lett* **387**: 127-131
61. Ferl RJ (1996) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 49-73
62. Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996) *Cell* **84**: 889-897
63. Bachmann M, McMichael RW Jr., Huber JL, Kaiser WM, Huber SC (1995) *Plant Physiol* **108**: 1083-1091
64. Glaab J, Kaiser WM (1995) *Planta* **195**: 514-518
65. MacKintosh C, Douglas P, Lillo C (1995) *Plant Physiol* **107**: 451-457
66. Glaab J, Kaiser WM (1996) *Planta* **199**: 57-63
67. Athwal GS, Huber JL, Huber SC (1998) *Plant Cell Physiol* **39**(10): 1065-1072
68. Kaiser WM, Huber S (1994) *Planta* **193**: 358-364
69. Glaab J, Kaiser WM (1993) *Planta* **191**: 173-179
70. Redinbaugh MG, Huber SC, Huber JL, Hendrix KW, Campbell WH (1996) *Physiol Plant* **98**: 67-76
71. Huber SC, Huber JL (1995) *Planta* **196**: 180-189
72. Athwal GS, Huber JL, Huber SC (1998) *Plant Physiol* **118**: 1041-1048
73. Kaiser WM, Spill D, Brendle-Benish E (1992) *Planta* **186**: 236-240
74. Kaiser WM, Brendle-Benish E (1991) *Plant Physiol* **96**: 363-367
75. Kaiser WM, Spill D, Glaab J (1993) *Physiol Plant* **89**: 557-562

Wskazówki dla Autorów

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.

PIŚMIENICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Odnosiniki 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 G R, Aronson N N (1980) *Biochim Biophys Acta* 631: 499-502
2. Bostock C J, Summer A T (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: *Friberg L, Nordberg G F Von V B (red) Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 541-553
4. Deleij J, Kesters K (1975) W: *Florkin M, Stotz E H (red) Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 1-7
5. Franks N P, Lieb W R (1981) W: *Knight C G (red) Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 243-272

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

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

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

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

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

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) 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 otówkiem 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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Zaproszenie

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

Dariusz Stępkowski

Sekretarz Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

