

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 37, NR 1, 1991

Polifosfoinozytyle	2
Interferony a czynniki wzrostu	6
Kinazy białkowe w cyklu komórkowym	9
Rola endonukleaz w apoptozie	18
Oddziaływanie endonukleazy Eco RI z DNA ..	23
Cytoszkieleł w komórkach nowotworowych ..	34
Reakcje cis-DDP z DNA	41
Latencja herpeswirusów	49
Nagrody P.T.Bioch.	32
Praca — oferty	39
Leksykon terminów biochemicznych (c.d.)	xiii
Bio-telefony	(okładka)

Firma GIBCO/BRL oferuje Państwu produkty mające zastosowanie do prac w dziedzinach:

GENETYKA MOLEKULARNA:

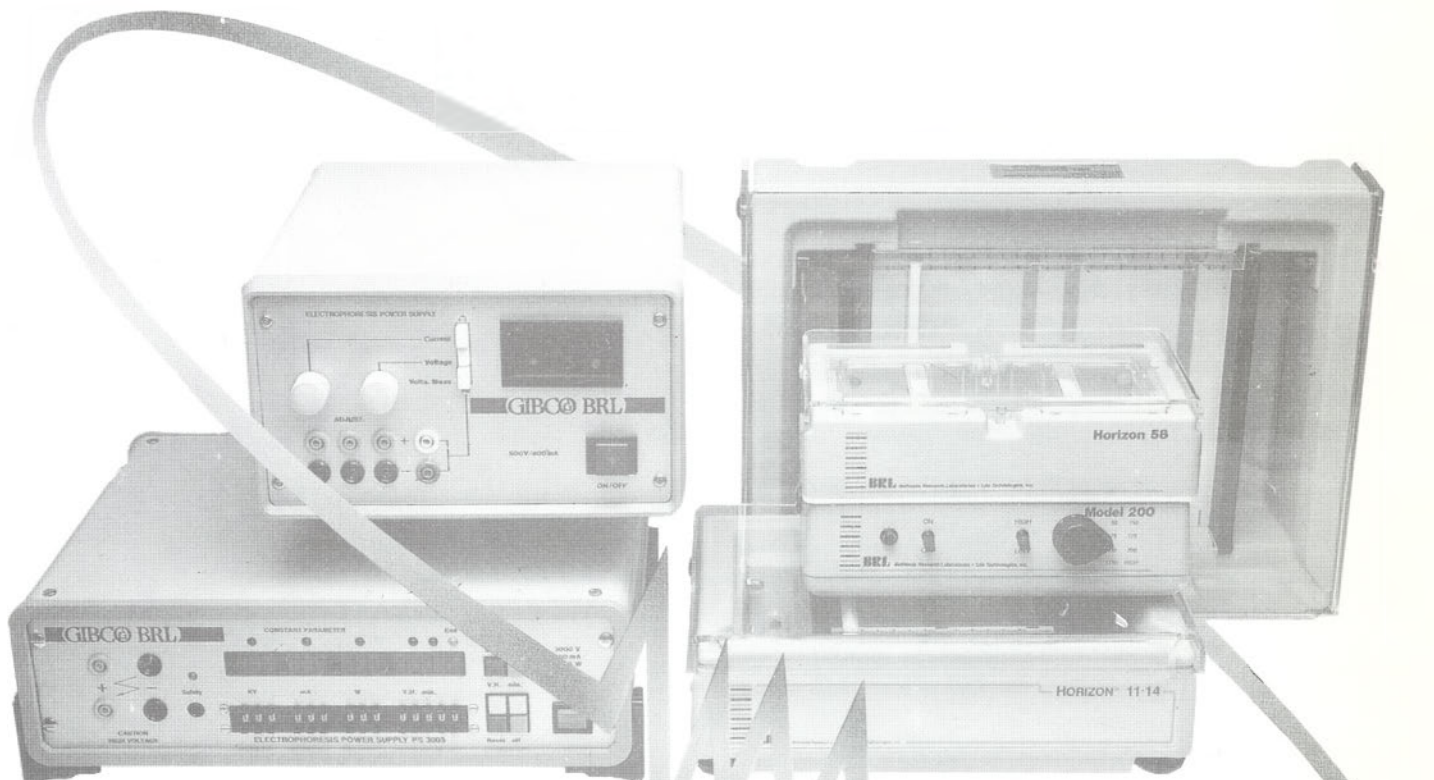
— enzymy, ultra czyste odczynniki chemiczne, aparatura do elektroforezy i sekwencjonowania

MIKROBIOLOGIA:

— suche podłoża i hydrolizaty białkowe

HODOWLA TKANKOWA:

— podłoża płynne i suche do hodowli tkankowej i komórkowej, czynniki wzrostu, enzymy



W celu uzyskania
dokładnych informacji,
zapraszamy do naszego
nowo otwartego biura
w Warszawie
mieszczącego się przy
ul. Marszałkowskiej 9/15 m 56.
tel./fax: 25-34-56

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
16 Freta Street
00-227 Warszawa
Poland

Oficyna Wydawnicza
BIO-TEXT Sp. z o.o.
Dantego 1 49
01-914 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board

REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 31-24-03

REDAKTORZY

Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 49-04-15
JACEK KUŹNICKI
tel. 659-85-71
BOŻENA SZYMANOWSKA

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
MAGDALENA FIKUS
(Warszawa)
MAREK JANKOWSKI
(Warszawa)
JANINA
KWIATKOWSKA-KORCZAK
(Wrocław)
JANINA MALEC
(Warszawa)
MAŁGORZATA PIOTROWSKA
(Warszawa)
STANISŁAW SZALA
(Gliwice)
IRENA I SZUMIEL
(Warszawa)
MACIEJ ŻYLICZ
(Gdańsk)

ADRES REDAKCJI

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

Skład i lamowanie: sp. z o.o. Supergraf
ul. Rakowiecka 32

**SPIS TREŚCI
CONTENTS****Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach**

Inositol polyphosphate in intracellular information-transfer
HANNA PODDANA; JOLANTA BARAŃSKA 2

Interferony a czynniki wzrostu i różnicowania

Interferons and growth and differentiation factors
ANNA D. INGLOT 6

Udział kinaz fosfobiałkowych w regulacji cyklu komórkowego niższych i wyższych organizmów eukariotycznych

Participation of phosphoprotein in cell cycle regulation in lower and higher eukaryotic organisms
TERESA JAKUBOWICZ 9

Rola endogennych endonukleaz w programowanym obumieraniu komórek

The role of endogeneous endonucleases in programmed cell death
RYSZARD RZEPECKI, RYSZARD SZMIDZIŃSKI,
JAN SZOPA..... 18

Oddziaływania restrykcyjnej endonukleazy Eco RI i DNA

Interactions between Eco RI restriction endonuclease and DNA
MARIA KOZIOLKIEWICZ..... 23

Niektóre zmiany w cytoszkielecie po transformacji nowotworowej

Some changes in the cytoskeleton after neoplastic transformation
KRZYSZTOF JAGŁA, BARBARA SAFIEJKO-MROCZKA,
JAN DOMANIEWSKI 34

Reakcje leku przeciwnowotworowego: cis-diaminodichloroplatyny (II) z DNA

Reactions with DNA of an antitumour drug cis-diamminedichloroplatinum (II)
RYSZARD OLIŃSKI, TOMASZ HUBERT ZASTAWNY 41

Molekularne podłoże w latencji wirusa *Herpes simplex-1*

Molecular basis of latency of *Herpes simplex* virus type 1
BOGUSŁAW BOROWICZ, JAN DOMANIEWSKI 49

Składki członków P.T. Bioch. 5

Nagrody P.T. Bioch. 32

Praca — oferty 39

Informacje o prenumeracie 48

Bio-telefony (okładka)

Leksykon nowych terminów biochemicznych (ciąg dalszy)xiii

Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach*

Inositol polyphosphate in intracellular information-transfer

HANNA PODDANA¹
JOLANTA BARAŃSKA²

Wykaz skrótów stosowanych w tekście:

DG — diacyloglicerol; monofosfoinozytyle:

Ins(1)P — inozytolo-1-fosforan,

Ins(3)P — inozytolo-3-fosforan,

Ins(4)P — inozytolo-4-fosforan;

bis-fosfoinozytyle:

Ins(1,4)P₂ — inozytolo-1,4-bisfosforan,

Ins(1,3)P₂ — inozytolo-1,3-bisfosforan,

Ins(3,4)P₂ — inozytolo-3,4-bisfosforan;

trifosfoinozytyle:

Ins(1,4,5)P₃ — inozytolo-1,4,5-trifosforan,

Ins(1,3,4)P₃ — inozytolo-1,3,4-trifosforan (nie objęty potoczna nazwą trifosfoinozytol);

tetrakisfosfoinozytyle:

Ins(1,3,4,5)P₄ — inozytolo-1,3,4,5-tetrakisfosforan,

Ins(1,3,4,6)P₄ — inozytolo-1,3,4,6-tetrakisfosforan,

Ins(1,4,5,6)P₄ — inozytolo-1,4,5,6-tetrakisfosforan,

Ins(3,4,5,6)P₄ — inozytolo-3,4,5,6-tetrakisfosforan;

Ins(1,3,4,5,6)P₅ — inozytolo-1,3,4,5,6-pentakisfosforan,

InsP₆ — heksakisfosfoinozytol;

PIP₂ — fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan.

Wewnątrzkomórkowe przekaźniki informacji: *myo*-inozytol-1,4,5-trifosforan (Ins(1,4,5)P₃; potoczna nazwa: trifosfoinozytol) i 1,2-diacyloglicerol (DG) znajdują się od kilku lat w centrum uwagi badaczy [1-6]. Związki te powstają w wyniku hydrolizy jednego z fosfolipidów inozytolo-4,5-bisfosforan (PIP₂). Hydroliza PIP₂ zachodzi pod wpływem fosfolipazy C i jest wywołana oddziaływaniem substancji sygnałowych, jak np. hormonów czy neurotransmiterów, na specyficzne receptory występujące na zewnętrznej powierzchni błon komórkowych (patrz minirewiew J. Kwiatkowskiej w Postęпах Biochemii [1]). Fosfolipaza C pełni zatem funkcję efektora, na który przekazywany jest sygnał odbierany przez receptor. Rolę łącznika między receptorem a efektem spełniają białka G [2]. Powstały

w wyniku hydrolizy diacyloglicerol pozostaje w błonie plazmatycznej aktywując kinazę białkową C [3]. Natomiast trifosfoinozytol zostaje uwolniony do cytosolu, gdzie wraz ze wzrostem jego stężenia obserwuje się wzrost stężenia jonów Ca²⁺, co z kolei powoduje aktywację szeregu enzymów regulujących liczne procesy metaboliczne komórek [1]. Czas, w którym Ins(1,4,5)P₃ wywołuje wewnątrzkomórkową mobilizację Ca²⁺ jest rzędu sekund. Równie szybko przekaźnik ten ulega defosforylacji do związków nieaktywnych, a mianowicie: Ins(1,4)P₂, Ins(4)P i *myo*-inozytolo (Ryc.1).

Wyniki ostatnich badań znacznie rozszerzyły i uzupełniły przedstawiony powyżej cykl następujących po sobie zdarzeń wewnątrzkomórkowych związanych ze zmianą metabolizmu fosfolipidów inozytolo-4,5-bisfosforan [4-7]. Istotnym jego uzupełnieniem jest wykazanie, że trifosfoinozytol ulega nie tylko hydrolizie do Ins(1,4)P₂, lecz może być także fosforylowany przez odpowiednią kinazę do związku zawierającego cztery grupy fosforanowe Ins(1,3,4,5)P₄ (Ryc.1). Wydaje się, że oba kierunki przekształceń pozostają pod kontrolą metaboliczną. Proces hydrolizy jest stymulowany przez diacyloglicerol i kinazę białkową C, podczas gdy wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w cytosolu stymuluje proces fosforylacji [4]. W komórkach zwierzęcych znaleziono oprócz Ins(1,3,4,5)P₄ jeszcze inne formy tetrakisfosfoinozytoli (nazwa anglojęzyczna *inositol tetrakisphosphates*), a także polifosfoinozytyle z pięcioma, a nawet sześcioma grupami fosforanowymi [4-6]. Ostatnio opisano strukturę i metabolizm tych związków pochodzących z komórek kłębuszkowych nadnercza wołu, stymulowanych angiotensyną II [7]. Jak przedstawiono na rycinie 1, powstanie polifosfoinozytoli Ins(1,3,4,5,6)P₅, nie polega na kolejnym przyłączeniu grup fosforanowych do trifosfoinozytoli Ins(1,4,5)P₃ i tetrakisfosfoinozytoli Ins(1,3,4,5)P₄, ale stanowi wynik określonych procesów defosforylacji i fosforylacji. Polifosfoinozytol Ins(1,3,4,5,6)P₅ powstaje także ze związku Ins(3,4,5,6)P₄, którego pochodzenie nie jest jeszcze znane (Ryc.1). Nie wiadomo też w jaki sposób powstaje InsP₆ [6].

¹ mgr, ² doc. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

* Poniższy tekst stanowi nawiązanie do minirewiew J. Kwiatkowskiej (Postępy Biochemii 32, 329-334, 1986) i za zgodą autorki ma podobny tytuł

Biologiczna rola polifosfoinozytoli, z wyjątkiem roli trisfosfoinozytoli $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Wydaje się, że tetrakisfosfoinozytol $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ działa synergicznie z $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ułatwiając wchodzenie Ca^{2+} poprzez błonę plazmatyczną do wnętrza komórki [6]. Jest on również zdolny do uwalniania Ca^{2+} z frakcji mikrosomalnej tkanki nerwowej, jednak działanie jego jest wielokrotnie słabsze niż $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ [5]. Tetrakisfosfoinozytol $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ aktywuje także takie enzymy, jak np. AMP-deaminazę w wątrobie szczura. Zawartość $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ i wszystkich pozostałych izomerycznych form tetrakis fosfoinozytoli (Ryc. 1) zwiększa się gwałtownie pod wpływem działania określonych substancji sygnałowych [7], podczas gdy wzrost zawartości InsP_5 i InsP_6 występuje jedynie pod wpływem substancji sygnałowych o przedłużonym działaniu [6]. Przypuszcza się, że InsP_5 i InsP_6 mogą pełnić funkcję neurotransmiterów w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków [8]. Natomiast rola izomeru trisfosfoinozytoli — $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$, pozostaje jeszcze do wyjaśnienia. Związek ten, podobnie jak $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, ulega kolejnym defosforylacjom, aż do powstania *myo*-inozytoli (Ryc. 1). Dotychczas nie stwierdzono aby $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$, a także bis- i monofosfoinozytole były związkami aktywnymi biologicznie.

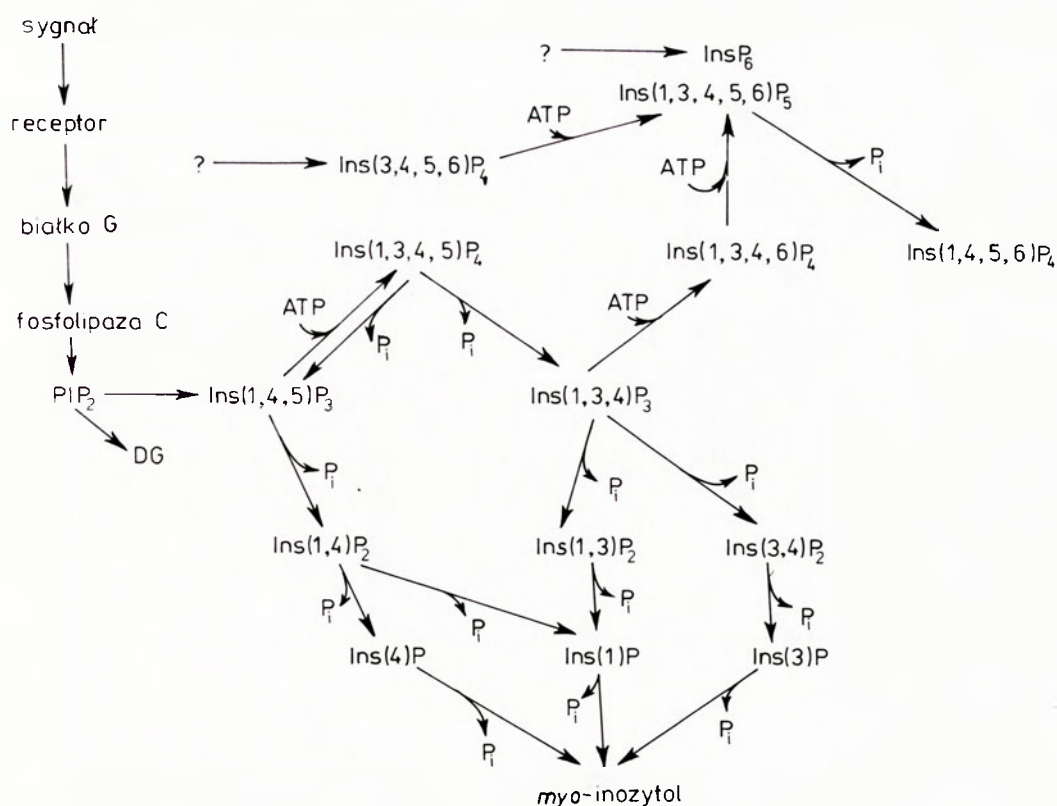
Podczas działania fosfolipazy C na PIP_2 tworzy się także cykliczna forma trisfosfoinozytoli (inozytolo-1,2-cykliczny-4,5-trisfosforan) [4,6]. Związek ten posiada podobnie jak $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zdolność do mobilizacji wapnia, ale działanie jego jest o rząd wielkości

mniejsze. Cykliczna forma trisfosfoinozytoli ulega także kolejnym defosforylacjom do powstania *myo*-inozytoli, proces ten jest jednak nieporównywalnie wolniejszy niż ten, który jest udziałem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ [6].

Wśród przedstawionych powyżej polifosfoinozytoli, trisfosfoinozytol $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ budzi największe zainteresowanie badaczy. Szczególnie interesujące wydaje się wyjaśnienie na jakie organelle wewnątrzkomórkowe związek ten działa, w jaki sposób wiąże się z ich błonami i jak uwalnia z nich Ca^{2+} .

Od dość dawna wiadomo, że mitochondria nie biorą udziału w wywołanym przez $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ procesie uwalniania Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych [1]. Za organelle takie uważano endoplazmatyczne retikulum [1,5,6], choć frakcje błonowe niektórych tkanek, na które działał $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, charakteryzowały się także obecnością enzymów typowych dla błon plazmatycznych [5]. Volpe i współautorzy [9], wyrazili w 1988 r. pogląd, że w komórkach wątroby i trzustki, oraz linii HL-60 i PC-12, występują wydzielone, pojedyncze, małe, pęcherzykowate struktury o nieznanym błonowym pochodzeniu, które wiążą $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ i uwalniają Ca^{2+} . Struktury te autorzy nazwali kalcjosomami (nazwa angielska *calciosomes*). Możliwość istnienia takich organeli, magazynujących Ca^{2+} , została ostatnio zaproponowana także dla komórek kory nadnercza [10]. Jednak wyniki kilku innych grup badaczy przeczą takiej możliwości. I tak, Snyder i współautorzy [11], używając przeciwciał wobec oczyszczonego wewnątrzkomórkowego białka receptorowego wiążącego $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, wykaza-

Ryc.1. Schemat przekształceń metabolicznych polifosfoinozytoli. Objasnienie symboli w wykazie stosowanych skrótów.



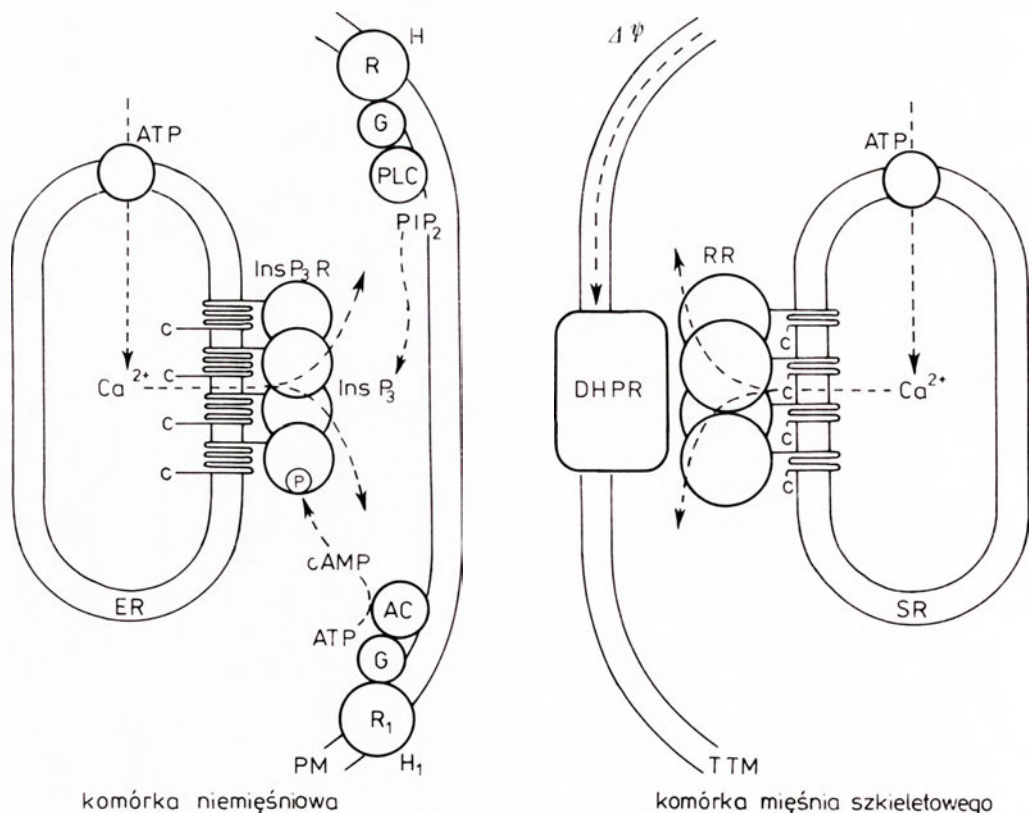
li immunocytochemicznie, że w neuronach mózdku (neurony Purkinje'go) głównym miejscem działania trisfosfoinozytolu jest szorstkie endoplazmatyczne retikulum. Ponadto pewną zdolność wiązania $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wykazywała błona jądrowa, oraz fragmenty gładkiego retikulum a także błony plazmatycznej [12, 13]. Struktur podobnych do kalcjosomów nie obserwowano. Dane te, według Gilla [14], wskazują na endoplazmatyczne retikulum jako tę wewnątrzkomórkową organelę, na którą działa $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

W listopadowym numerze *Nature* z 1989 r. ukazały się trzy publikacje [13-15] dotyczące sposobu w jaki trisfosfoinozytol wiąże się z błoną endoplazmatycznego retikulum komórek nerwowych i uwalnia z nich wapń. Wykazują one, że trisfosfoinozytol współdziała ze specyficznym receptorem znajdującym się na powierzchni tych błon (Ryc.2). Receptor ten, zwany dawniej P-400, został wyodrębniony w 1988 r. [16], jednak

dopiero ostatnio, w laboratorium Mikoshiba [13], określono jego pierwszorzędową strukturę. Snyder i współautorzy [15] wykazali ponadto, że pod wpływem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, powyższe białko receptorowe wbudowane w liposomy powoduje uwalnianie jonów Ca^{2+} z wnętrza liposomów. Izomer trisfosfoinozytolu $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ nie ma takich właściwości. Wykazano, że receptor trisfosfoinozytolu $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wyizolowany z błon endoplazmatycznego retikulum neuronów jest glikoproteiną o masie 250 kD. Charakteryzuje go zarówno zdolność wiązania $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ jak i uwalniania Ca^{2+} . Wiąże także heparynę i konkanawalinę A i jest fosforylowany drogą zależną od cyklicznego AMP. Heparyna działa antagonistycznie wobec $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, a ufosforylowanie receptora zmienia jego konformację, uniemożliwiając uwalnianie jonów Ca^{2+} wywołane współdziałaniem receptora z trisfosfoinozytolem. Przypuszcza się, że receptor $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ jest

Ryc.2. Porównanie mechanizmów inicjujących uwalnianie Ca^{2+} z organelli wewnątrzkomórkowych do cytosolu w komórce niemięśniowej (lewa strona ryciny) i w komórce mięśnia szkieletowego (prawa strona ryciny). Dzięki uprzejmości D.L. Gilla [14]

W komórce niemięśniowej hormon (H) wiążąc się z receptorem (R), znajdującym się w błonie plazmatycznej (PM), przekazuje sygnał poprzez białko G (G) na fosfolipazę C (PLC). Fosfolipaza C hydrolizuje fosfolipid (PIP_2) prowadząc do powstania trisfosfoinozytolu $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, zaznaczonego na rysunku jako InsP_3 . Uwolniony do cytosolu InsP_3 działa na specyficzny receptor trisfosfoinozytolu (InsP_3R), znajdujący się w błonie endoplazmatycznego retikulum (ER). Receptor ten (InsP_3R) jest tetramerem. Każda z jego czterech podjednostek składa się z łańcucha polipeptydowego, którego duża część N-terminalna (przedstawiona w postaci kółek) znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony ER, podczas gdy krótka część z grupą karboksylową (c) występuje po stronie luminalnej. Część błonową stanowią kilkakrotnie penetrujące ją pętle łańcucha polipeptydowego. InsP_3 wiążąc się z receptorem InsP_3R , powoduje zmianę jego konformacji i uwolnienie jonów Ca^{2+} do cytosolu. Inna substancja sygnałowa (H_1), działając na inny receptor (R_1) aktywuje cyklazę adenylową (AC). Powstały cykliczny AMP (cAMP) bierze udział w procesie fosforylacji receptora InsP_3R , hamując uwalnianie jonów Ca^{2+} . W mięśniu szkieletowym, rolę sygnału pełni depolaryzacja błony T-tubularnej (TTM). Wytworzony transbłonowy potencjał elektryczny $\Delta\Psi$ zmienia konformację receptora dihydropirydynowego (DHPR). Receptor ten znajduje się w bliskim kontakcie z częścią N-terminalną receptora ryanodinyowego (RR), występującego w błonie sarkoplazmatycznego retikulum (SR). Receptor ryanodinyowy jest tetramerem. Każda jego podjednostka składa się z dużej części N-terminalnej (kółka) i krótkich części końca karboksylowego (c), występującego po stronie cytoplazmatycznej, oraz pętli łańcucha polipeptydowego kilkakrotnie penetrującego błonę. Zmiana konformacji receptora (RR), powoduje uwolnienie jonów Ca^{2+} z organelli do cytosolu. W obydwu typach komórek transport jonów Ca^{2+} do wnętrza sarkoplazmatycznego czy endoplazmatycznego retikulum odbywa się z udziałem ATP-azy (ATP).



tetramerem (Ryc.2). Jego podjednostki otaczają przestrzeń będącą najprawdopodobniej kanałem, przez który wapń z wnętrza endoplazmatycznego retikulum zostaje uwolniony do cytosolu komórki. Receptor trisfosfoinozytolu w obrębie każdej podjednostki składa się z bardzo dużej części N-terminalnej łańcucha polipeptydowego, znajdującej się po stronie cytoplazmatycznej endoplazmatycznego retikulum; krótkich glikozylowanych fragmentów końca karboksylowego po stronie luminalnej; oraz kilku pętli łańcucha polipeptydowego penetrującego błonę. (Ryc.2). Część receptora znajdująca się po stronie cytoplazmatycznej zawiera najprawdopodobniej miejsca rozpoznające $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Sądzi się, że trisfosfoinozytol wiążąc się z receptorem moduluje tetramer powodując otwieranie kanału [14, 17], przez który następuje uwalnianie Ca^{2+} do cytosolu.

Budowa receptora trisfosfoinozytolu, występującego w błonie endoplazmatycznego retikulum, przypomina bardzo budowę innego receptora, znajdującego się w błonie sarkoplazmatycznego retikulum mięśni szkieletowych (Ryc.2). Ten ostatni — receptor rianodiny (nazwa związana ze zdolnością do wiązania alkaloidu roślinnego — rianodiny) tworzy kanał, uwalniając jony Ca^{2+} z wnętrza sarkoplazmatycznego retikulum do cytosolu. Charakteryzuje się on, podobnie jak receptor trisfosfoinozytolu (InsP_3R — Ryc.2), wysoką masą cząsteczkową, występuje jako tetramer i ma podobną strukturę pierwszorzędową [18]. Jednak sygnał wywołujący uwalnianie Ca^{2+} z sarkoplazmatycznego retikulum, nie ma prawdopodobnie charakteru chemicznego [14, 18]. Przypuszcza się, że w wyniku procesu depolaryzacji błon T-tubularnych mięśni, wytworzony transbłonowy potencjał elektryczny zmienia konformację znajdującego się w tej błonie specyficznego receptora, wrażliwego na dihydropirydynę (DHPR — Ryc.2). Umożliwia to interakcję DHPR z cytoplazmatyczną, N-terminalną częścią receptora ryanodinowego (RR — Ryc.2), co z kolei powoduje otwarcie kanału i uwalnianie Ca^{2+} .

Podobieństwo budowy powyższych receptorów występujących w błonie endoplazmatycznego i sarkoplazmatycznego retikulum stanowi, według Gill'a

[14], rewelację. Pełnią one bowiem tę samą funkcję, jaką jest tworzenie kanałów i uwalnianie przez nie, pod wpływem określonych sygnałów, wapnia do cytosolu. Korelacja budowy i funkcji obu receptorów, mimo działania na nie różnych rodzajów sygnałów i występowania w odmiennych typach komórek, jest istotnie jedną z najbardziej interesujących obserwacji, jakie pojawiły się ostatnio w tej dziedzinie wiedzy.

Artykuł otrzymano 17 marca 1990 r.
Zaakceptowano do druku 25 marca 1990 r.

Piśmiennictwo

1. Kwiatkowska J., (1986), *Post. Biochem.*, **32**, 329–334.
2. Kwiatkowska J., (1988), *Post. Biochem.*, **34**, 123–130.
3. Kwiatkowska J., (1989), *Post. Biochem.*, **35**, 253–263.
4. Berridge M.J., (1987), *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 159–194.
5. Joseph S.K., Wiliamson J.R., (1989), *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 1–15.
6. Berridge M.J., Irvine R.F., (1989), *Nature (Lond.)*, **341**, 197–205.
7. Balla T., Hunyady C., Baukal A.J., Catt K.J., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 9386–9390.
8. Vallejo M., Jackson T., Lightman S., Hanley M.R., (1987) *Nature (Lond.)*, **330**, 656–658.
9. Volpe P., Krause K.H., Hashimoto S., Zorzato F., Pozzan T., Meldolesi J., Lew D.P., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1091–1095.
10. Rossier M.F., Capponi A.M., Vallotton M.B., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 14078–14084.
11. Ross C.A., Meldolesi J., Milner T.A., Satoh T., Supattapone S., Snyder S.H., (1989), *Nature (Lond.)*, **339**, 468–470.
12. Ghosh T.K., Mullaney J.M., Tarazi F.J., Gill D.L., (1989), *Nature (Lond.)*, **340**, 236–239.
13. Furuichi T., Yoshikawa S., Miyawaki A., Wada K., Maeda N., Mikoshiba K., (1989), *Nature (Lond.)*, **342**, 32–38.
14. Gill D.L., (1989), *Nature (Lond.)*, **342**, 16–18.
15. Ferris D.C., Haganir R.L., Supattapone S., Snyder S.H., (1989), *Nature (Lond.)*, **342**, 87–89.
16. Supattapone S., Worley P.F., Baraban J.M., Snyder S.H., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 1530–1534.
17. Meyer T., Holowka D., Stryer L., (1988) *Science*, **240**, 653–656.
18. Takeshima H., Nishimura S., Matsumoto T., Ishida H., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Ueda M., Hanaoka M., Hirose T., Numa S., (1989) *Nature (Lond.)*, **339**, 439–445.



Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

Interferony a czynniki wzrostu i różnicowania*

Interferons and growth and differentiation factors

ANNA D. INGLOT¹

Wykaz stosowanych skrótów:

CSF — czynnik wzrostu kolonii (*colony stimulating factor*), EGF — czynnik wzrostowy naskórka, FGF — czynnik wzrostowy fibroblastów, FSH — hormon dojrzewania pęcherzyka (follikulotropina), G — granulocytarny, HCG — gonodotropina komórkowa, IFN — interferon, IGF — insulino-podobny czynnik wzrostowy, IL — interleukina, LH — hormon lutenizujący, LPS — lipopolisacharyd, M — makrofagowy, PHA — fitohemaglutynina, PDGF — czynnik wzrostowy z płytek krwi, TGF — transformujący czynnik wzrostowy, TNF — czynnik nekrozy guzów (*tumor necrosis factor*).

Wszystkie komórki i tkanki ustroju działają w scalonym układzie powiązań i wzajemnej zależności. Dzieje się to przy udziale klasycznych hormonów i cytokin. Termin „cytokina” obecnie wprowadza się jako nazwę rodzajową dla oznaczenia czynników hormono-podobnych, dawniej określanych jako „hormony tkankowe” lub „hormony nieklasyczne” [1-3, 4-9, 12].

Warto podkreślić, że pierwotnie cytokinami nazywano tylko czynniki limfokino-podobne, które są wytwarzane przez komórki nie należące do układu immunologicznego [1-3]. Cytokiny są bardziej liczne niż klasyczne hormony, są wytwarzane na obwodzie przez różne komórki i tkanki i są wszechobecne w ustrojach żywych. Biorą one udział w regulacji najrozmaitszych funkcji życiowych przez pobudzanie lub hamowanie proliferacji, wzrostu, różnicowanie oraz wiele innych specjalistycznych reakcji komórek i tkanek. Przy czym mogą one wykazywać swoistość zarówno gatunkową jak i komórkową.

Cytokiny występują jako heterogenne rodziny glikoprotein, lub rzadziej białek prostych i mają względnie niski ciężar cząsteczkowy. Zawierają na ogół od 50-200 aminokwasów. W warunkach fizjologicznych cytokiny często spontanicznie agregują tworząc dime-ry, trimery, tetramery lub nawet większe multimery.

¹ Prof. dr hab., Laboratorium Wirusologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda, ul. Czerna 12, 53-114 Wrocław

* Referowane na XXV Zjeździe PTB, Toruń 13-15 wrzesień 1989

Działanie cytokin rozpoczyna się od ich wiązania ze swoistymi receptorami białkowymi znajdującymi się w błonie cytoplazmatycznej lub też wewnątrz komórki. Wykryto, że jedna cytokina może wiązać się z kilkoma różnymi receptorami lub też jeden rodzaj receptora może być wspólnym miejscem wiązania kilku pokrewnych cytokin np: IGF-I i IGF-II, IFN- α i IFN- β [4], IL-1- α i IL-1- β , EGF i TGF- α , TGF- β_1 i TGF- β_2 , PDGF-AA i PDGF-BB [1-4, 12]. Zarówno liczba receptorów jak i ich swoistość jest rozmaita i zależy od rodzaju komórki i charakteru cytokiny.

Modulacja poziomu receptorów cytokin przez odpowiednie ligandy przypomina reakcje, które zachodzą w układzie klasycznych hormonów. Obserwuje się bowiem zjawiska hyporeaktywności, hyperreaktywności i regulacji homotypowej i heterotypowej [1, 2, 4, 12].

Nanogramowe lub nawet pikogramowe stężenia cytokin wystarczają do wywołania tzw. aktywacji komórki. W aktywacji tej biorą udział liczne substancje o charakterze przekaźników takie jak: cykliczny AMP i cykliczny GMP, regulatory przepływu jonów Ca^{++} , Na^+ , K^+ i jonów wodorowych; trójfosforan inozytoli (IP_3), dwuacyloglicerol (DAG), 2-5A oligonukleotydy, eicosanoidy oraz liczne enzymy i ich inhibitory. Wszystkie te substancje pobudzają lub hamują poszczególne etapy wewnątrzkomórkowych reakcji łańcuchowych inicjowanych przez cytokiny. Reakcje te nie są specyficzne w tym sensie, że cytokiny mogą mieć szereg wspólnych przekaźników mimo ich odrębnych aktywności [4, 10-12].

W wyniku działania przekaźników „drugiego obiegu” dochodzi do głębokich zmian dotyczących zarówno struktury komórek i tkanek jak i ich funkcji biologicznych. Przy czym selektywne efekty cytokin są wypadkową działania nie jednej substancji, lecz całego ich zespołu, w skład którego wchodzi czynniki o przeciwnych aktywnościach. Ich wzajemne oddziaływanie mogą być synergistyczne, addycyjne, antagonistyczne lub agonistyczne [4, 6-13].

Interferony uważa się obecnie za jedną z postaci cytokin odznaczających się bardzo wysoką aktywnością biologiczną, w tym szczególnie aktywnością an-

Tabela 1

Struktura i funkcja głównych cytokin

Cytokiny	Uwagi	Piśmiennictwo
Interferony IFN- α , IFN- β , IFN- γ	Występują jako heterogenne rodziny białek lub glikoprotein. Wytwarzane są przez wiele różnych komórek. Hamują wzrost komórek i tkanek, w tym nowotworowych. Mają silne działanie antywirusowe. W małych stężeniach mogą stymulować wzrost. Wykazują silne działanie immunomodulacyjne.	3-9, 20-24
Interleukiny (IL) typy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	Glikoproteiny kontrolujące wzrost i różnicowanie komórek układu immunologicznego w tym limfocytów T, B, tymocytów i innych. Są heterogenne. Wzajemnie ze sobą współdziałają.	1-3, 12
Czynniki wzrostu kolonii GM-CSF, M-CSF, G-CSF	Heterogenne glikoproteiny regulujące proliferację komórek układu krwiotwórczego i ich dojrzewanie.	12, 17
Czynniki nekrozy nowotworów TNF- α , TNF- β	Glikoproteina nazywana jest również kachektyną. Wykazuje pokrewieństwo z limfotoksyną. Są cytotoksyczne dla wielu komórek, w tym szczególnie nowotworowych. Mają działanie immunomodulujące, przeciwpasożytnicze i antywirusowe.	1-3, 12-15
Polipeptydowe czynniki wzrostowe: PDGF, EGF, FGF- α , FGF- β , IGF-I, IGF-II, TGF- β	Liczna, heterogenna rodzina białek lub glikoprotein. Są czynnikami regulującymi proliferację i różnicowanie komórek i tkanek. TGF- β jest też silnym inhibitorem wzrostu niektórych komórek. Tworzą skomplikowaną sieć wzajemnych powiązań funkcjonalnych.	12, 19, 28, 29

tywirusową. Interferony funkcjonują przede wszystkim jako inhibitory wzrostu komórek i niektórych programów różnicowania. Jednakże, w małych stężeniach interferony mogą też współdziałać z niektórymi czynnikami wzrostowymi w celu pobudzania proliferacji lub także ułatwienia różnicowania komórek układu krwiotwórczego lub mięśni prążkowanych. W układzie immunologicznym IFN- γ może pobudzać namnażanie się klonów komórek T i B oraz wzmacniać aktywność monocytów i makrofagów.

W przeciwieństwie do interferonów czynniki wzrostowe, jak sama nazwa wskazuje, są przede wszystkim stymulatorami namnażania się komórek. Przy czym nie działają one solo, lecz są członkami dużego zespołu czynników wzajemnie się wzmacniających lub osłabiających swe wpływy. Często mówi się o czynnikach, które albo promują pierwszą fazę wzrostu albo umożliwiają kontynuację i ukończenie mitozy [12]. Innymi słowami inicjują one mitozy lub umożliwiają progresję cyklu podziałowego.

W rodzinie czynników wzrostowych specjalną pozycję zajmuje TGF- β . W zależności od rodzaju komórki oraz stężenia TGF- β może być albo silnym inhibitorem namnażania się komórek, w tym głównie nabłonkowych, lub też (głównie w małych dawkach) może wzmacniać sygnały mitogenne przekazywane przez TGF- α , EGF, PDGF, IGF i inne czynniki wzrostowe [12,26]. TGF- β prawdopodobnie hamuje działanie „pozytywnych” czynników wzrostowych na poziomie receptorów błonowych oraz może też zaburzać transmisję sygnałów mitogennych. Jednakże TGF- β nie indukuje w komórkach syntezy białek, które odgrywają rolę w mechanizmie hamowania proliferacji komórek przez IFN [12,26].

Zarówno interferony jak i czynniki wzrostowe biorą udział w regulacji ekspresji oraz w funkcjonowaniu

onkogenów. Podstawowa obserwacja dotyczy aktywacji przez czynniki mitogenne w ciągu minut lub godzin onkogenów c-myc i c-fos, natomiast interferony α , β lub γ wygaszają aktywację tych onkogenów. O wiele mniej wiadomo o wpływie cytokin na inne onkogeny z wyjątkiem szczegółowych obserwacji dotyczących regulacji c-ras przez z interferony w fibroblastach mysich [4, 9, 12, 13].

Wszystkie cytokiny, w mniejszym lub większym stopniu wywierają wpływ na wytwarzanie lub funkcję klasycznych hormonów [9, 34, 35]. Na przykład IFN hamuje wydzielanie estrogenów, testosteronu, FSH, LH, insuliny, hormonów tarczycy i innych. Podobne działanie ma też TNF, natomiast czynniki wzrostowe mają działanie komórkowo-swoiste i regulują zarówno mitozy jak i zróżnicowane funkcje komórek endokrynnych [12].

Pojęcie „sieci cytokin” wprowadzono w celu wyrażania licznych powiązań i współzależności między tymi czynnikami. Odnosi się ono w dużej mierze do ich wytwarzania w następstwie przekazywania sygnału przez jedną cytokinę do produkcji innej cytokiny. Większość tych reakcji jest komórkowo-swoista. Podobne reakcje zachodzą zarówno w układzie immunologicznym jak i nie-immunologicznym (Tabela 2 i 3).

Jedną z najliczniejszych rodzin cytokin są limfokiny, w tym interleukiny, które odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów immunologicznych [1-3,4,12].

Limfocyty T indukowane przez IL-1, IL-2 lub CSF mogą produkować IFN- γ . I na odwrót, po stymulacji przez IFN- γ może dochodzić do syntezy IL-2 [10,11,13-16,18,20-26]. IFN- γ wybitnie wzmacnia syntezę IL-1 i TNF przez monocyty i makrofagi aktywowane przez LPS [1-3,16-18]. Fibroblasty poddane działaniu PDGF, IL-1, TNF lub nawet IFN- β 1 mogą zostać pobudzone do wytwarzania IL-6 (zwanego dawniej IFN- β 2). W niektórych liniach fibroblas-

Tabela 2

Wytwarzanie cytokin w wyniku wzajemnych oddziaływań

Komórki docelowe	Cytokiny indukujące	Cytokiny wytwarzane	Piśmiennictwo
Limfocyty T	IL-1, IL-2, CSF	IFN- γ , IL-2	10,11,13-16, 18, 20-26
Monocyty makrofagi	IFN- γ + LPS, IFN- α , β , TNF, IL-1, GM-CSF	IL-1, TNF, GM-CSF, IFN- α , β	1-3, 16-18
Fibroblasty, komórki endotelialne, maziowe i mięśni gładkich	PDGF, IL-1, TNF, IFN- β , TGF- β	IL-6, IFN- β , PDGF, białka JE	13-15, 19, 27, 28

to-podobnych po podaniu IL-1 lub TNF dochodzi do produkcji IFN- β , CSF lub PDGF [13-15, 19, 27, 28]. Prawdopodobnie takie oddziaływania są niezbędne dla utrzymania homeostazy.

Najbardziej skomplikowane formy interakcji między cytokinami mają również miejsce w układzie immunologicznym, co jest zrozumiałe gdy weźmie się pod uwagę biochemiczne podłoże swoistości. Wszystkie wymienione czynniki mogą funkcjonować jako „pozytywne” lub „negatywne” czynniki wzrostu lub też różnicowania. Często posiadają one charakterystyczną swoistość komórkową (Tabela 3).

Zarówno w układzie immunologicznym, jak i w innych układach, wzajemne oddziaływanie między interferonami typu α , β lub γ a „pozytywnymi” czynnikiemami wzrostowymi są najczęściej antagonistyczne (Tabela 3, [11, 13-16, 18-26, 28-33]). Rzadziej, IFN i czynniki wzrostowe mogą pobudzać wzrost. Dotyczy to przede wszystkim działania IFN w bardzo niskich stężeniach oraz interakcji synergistycznej między IFN a TGF- β . (Tabela 3) Jednakże, TGF- β tak jak inne czynniki wzrostowe, hamuje aktywność przeciwwirusową interferonów w fibroblastach i w niektórych komórkach nowotworowych [9, 33]. Innymi słowy TGF- β , który

Tabela 3

Sieć powiązań funkcjonalnych między cytokinami

Komórki docelowe	Interferony	Czynniki wzrostowe	Efekty	Piśmiennictwo
Limfocyty T lub B	IFN- α , β IFN- γ	IL-1, IL-2, IL-6 TGF- β	W zależności od stężenia hamowanie lub pobudzanie proliferacji komórek, cytotoksyczności, ekspresji MHC, dojrzewanie komórek i sekrecji różnych produktów.	10,11,13-16, 18-26
Monocyty i makrofagi	IFN- α , β IFN- γ	IL-1, TNF, CSF, TGF- β	Regulacja wzrostu komórek. Stymulowanie lub rzadziej hamowanie fagocytozy. Aktywacja komórek i wpływ na cytotoksyczność.	1-3, 16-18, 19
Normalne fibroblasty	IFN- α , β IFN- γ	PDGF, EGF, TGF- α , TGF- β , FGF, insulina, bombezyna, wazopresyna	Antagonistyczne oddziaływanie między interferonami i czynnikiemami wzrostowymi. W szczególnych warunkach występują działania synergistyczne. Hamowanie antywirusowego działania interferonów przez czynniki wzrostowe.	5-9, 11, 13-15, 19, 27-33
A549 (linia gruczolakoraka płuca człowieka)	IFN- α , β IFN- γ	EGF, TGF- α , TGF- β	Jak wyżej	32, 33

działa jak „negatywny” czynnik wzrostowy na proliferację fibroblastów zachowuje się jak „pozytywny” czynnik wzrostowy w tych samych komórkach poddanych działaniu interferonów i zakażonych wirusami [9, 32, 33].

Wytwarzanie plejady różnych cytokin, które między sobą reagują w procesach aktywacji komórek, leży u podstaw działania leków immunomodulacyjnych. Ostatnio wykryliśmy nową rodzinę immunostymulatorów wśród organicznych pochodnych selenenu. Różne dwuselenki reagowały z adherentnymi i nieadherentnymi leukocytami krwi obwodowej człowieka i indukowały syntezę IFN- γ , TNF oraz kilku różnych mitogennych limfokin, które między sobą współdziałały [36].

Badania cytokin i wzajemnych między nimi powiązań mają zarówno znaczenie teoretyczno-poznawcze jak i aplikacyjne, w praktyce lekarskiej i weterynaryjnej.

Artykuł otrzymano 18 września 1989 r.

Zaakceptowano do druku 29 grudnia 1989 r.

Piśmiennictwo

- Dinarelli C. A., (1989), *Adv. Immunol.* **44**, 153-205.
- Beutler B., Cerami A., (1988), *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 505-518.
- Heremans H., Dillen C., Billiau A. (1988), w *The Biology of Interferon System* (red. Y. Kawade, S. Kobayashi), str. 309-313, Kodansha Sci. Ltd., Tokyo.
- Pestka S., Langer J. A., Zoon K. C., Samuels C. E., (1987), *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 727-777.
- Inglot A. D., (1981-1982), *Tex. Rep. Biol. Med.*, **41**, 402-410.
- Inglot A. D., (1983), *Arch. Virol.*, **76**, 1-13.
- Inglot A. D., (1984), w *Contribution to Oncology*, (red. L. Borecky, V. Lacković), str. 72-85, Karger, Basel.
- Inglot A. D., Popik W., Piasecki E., Czyski J., (1986), *Molec. Biol. Rep.*, **11**, 37-42.
- Inglot A. D., *Biomed. Biochim. Acta* (w druku)
- Weiss A., Imboden J. B., (1988), *Adv. Immunol.*, **41**, 1-38.
- Burd P. R., Rollins B. J., Wilson S. D., Billing P. R., Stiles C. D., Dorf M. E. (1988), *Cell. Immunol.* **115**, 481-483.
- Waterfield M. D., (1989) w *Growth Factors*, Brit. Med. Bull., **45**, str. 1-604.
- Vilček J., (1987), *J. Interferon Res.*, **57**, 537-543.

14. Kohase M., Zhang Y., Lin J. Y., Yamazaki S., Sehgal P. B., Vilček J. (1988), *J. Interferon Res.* **8**, 559-570.
15. Reis L. F. L., Lee T. H., Zhang Y., Lin J. Y., Kohase M., Fujita T., Taniguchi, Vilček J. (1988) w *The Biology of Interferon System*, (red. Y. Kawade, S. Kobayashi), str. 271-276, Kodansha Sci. Ltd., Tokyo.
16. Wilson A., Harris J. M., Coombs R. R. A. (1988), *Cell. Immunol.* **113**, 130-142.
17. Hart P. H., Witty G. A., Piccoli D. S., Hamilton J. A. (1988), *J. Immunol.* **141**, 1516-1521.
18. Herrman F., Cannistra S. A., Lindemann A., Blohm D., Rambaldi A., Mertelsmann R. H., Griffin J. D. (1989), *J. Immunol.* **142**, 139-143.
19. Bryckaert M. C., Lindbroth M., Lönn A., Tobelem G., Wasteson A. (1988), *Exp. Cell Res.* **179**, 311-321.
20. Gajewski T. F., Goldwasser E., Fitch F. W. (1988), *J. Immunol.* **141**, 2635-2642.
21. François D. T., Katona I. M., June C. H., Wahl L. M., Mond J. J. (1988), *Clin. Immunol. Immunopathol.* **48**, 297-306.
22. Hitoshi Y., Mita S., Matsumoto R., Tominaga A., Watanabe Y., Takatsu K. (1989) w *The Biology of Interferon System*, (red. Y. Kawade, S. Kobayashi), str. 259-264, Kodansha Sci. Ltd., Tokyo.
23. Xia X., Choi Y. S. (1988), *J. Biol. Response Mod.* **7**, 283-295.
24. Siegel J. P., (1988), *Cell. Immunol.* **111**, 461-472.
25. Van Snick J., Vink A., Uytenhove C., Houslian F., Coulie P. (1988), *Curr. Tops. Microbiol. Immunol.* **141**, 181-184.
26. Ellingsworth L. R., Nakayama D., Seperini P., Dasch J., Carillo P., Waegell W., (1988), *Cell. Immunol.* **114**, 41-54.
27. Tsuruoka N., Sugiyama M., Tawarogi Y., Tsujimoto M., Nishikawa T., Goto Y., Sato N. (1988), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **155**, 429-435.
28. Forsberg K., Paullson Y., Westermark B. (1988) *J. Cell. Physiol.* **136**, 266-272.
29. Hosang M. (1988), *J. Cell. Physiol.* **134**, 396-404.
30. Inglot A. D., Pajtasz E. (1986), *Meth. Enzymol.* **119**, 657-666.
31. Oleszak E. (1988), *Exp. Cell Res.*, **179**, 575-580.
32. Popik W., Inglot A. D. (1987) *Int. J. Cancer*, **40**, 108-113.
33. Popik W., Inglot A. D. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (w druku).
34. Orava M. (1989), *J. Interferon Res.*, **9**, 135-142.
35. Roberts R. M. (1989), *J. Interferon Res.* **9**, 373-378.
36. Inglot A. D., Zielińska-Jencylik J., Piasecki E., Syper L., Młochowski J. *Experientia* (w druku).

Udział kinaz fosfobiałkowych w regulacji cyklu komórkowego niższych i wyższych organizmów eukariotycznych

Participation of phosphoprotein kinases in cell cycle regulation in lower and higher eukaryotic organisms

TERESA JAKUBOWICZ¹

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Charakterystyka produktów genów *CDC28/cdc2⁺*
 - II-1. Krótka charakterystyka cyklu komórkowego *S. cerevisiae*
 - II-2. Rola genu *CDC28* w regulacji cyklu komórkowego drożdży pączkujących — charakterystyka produktu genu *CDC28*.
 - II-3. Homologi genu *CDC28* u innych eukariotów
- III. Charakterystyka porównawcza kinaz *CDC28/cdc2⁺*, MPF i kinazy H1.
 - III-1. Czynniki MPF a kinazy *CDC28/cdc2⁺*
 - III-2. Analiza porównawcza kinazy H1, MPF i kinaz *CDC28/cdc2⁺*
- IV. Regulacja aktywności kinaz *CDC28/cdc2*.
 - IV-1. Regulacja aktywności poprzez fosforylację
 - IV-2. Regulacja poprzez tworzenie wysokocząsteczkowych kompleksów

- V. Rola kinazy *CDC7* w cyklu komórkowym drożdży pączkujących
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Characteristics of *CDC28/cdc2⁺* gene products
 - II-1. Short characteristics of cell cycle in *S. cerevisiae*
 - II-2. Role of *CDC28* gene in cell cycle regulation in *S. cerevisiae* — characteristics of *CDC28* gene product
 - II-3. Homologs of *CDC28* gene in other eukaryotes
- III. Comparative characteristics of *CDC28/cdc2* protein kinases, MPF and kinase H1
 - III-1. MPF and *CDC28/cdc2* protein kinases
 - III-2. Comparative analysis of kinase H1, MPF and *CDC28/cdc2* protein kinase
- IV. Regulation of *CDC28/cdc2* protein kinases activities
 - IV-1. Regulation of activity by phosphorylation
 - IV-2. Regulation of activity by high molecular weight complex formation
- V. Role of *CDC7* protein kinase in cell cycle in *S. cerevisiae*
- VI. Concluding remarks

¹ Doc. dr hab. Teresa Jakubowicz, Zakład Biologii Molekularnej UMCS, 20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

Wykaz stosowanych skrótów:

EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy; kinaza A — kinaza zależna od cAMP; RSV — wirus mięsaka Rousa; pp60^{c-src} — kinaza tyrozynowa, komórkowy homolog produktu onkogenu v-src wirusa RSV.

I. Wstęp

Badania nad proliferacją komórek prowadzone są w dwóch aspektach. Jeden z nich dotyczy kontroli pobudzenia wzrostu komórkowego i zmierza do poznania mechanizmów leżących u podstaw mitogennej aktywacji nie dzielących się komórek. Wiąże się on z wyjaśnieniem procesów biochemicznych zachodzących w komórce pod wpływem działania czynników wzrostowych, po transformacji komórek przez wirusy onkogenne, czy w odpowiedzi na działanie innych czynników o aktywności mitogennej. Zagadnieniom tym poświęcono wiele uwagi w poprzednich numerach Postępów Biochemii [1, 2, 3, 4, 5, 6].

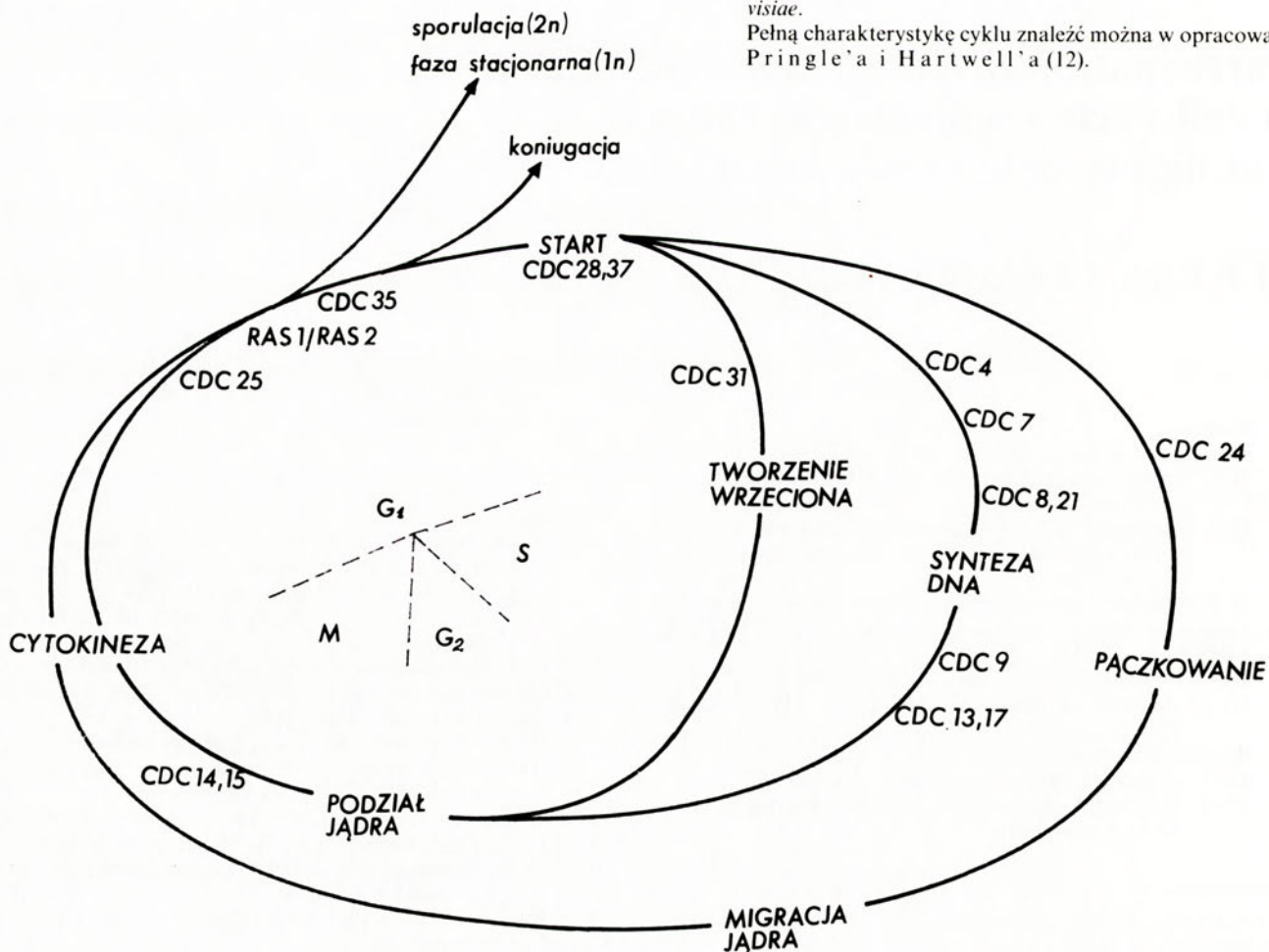
Drugi kierunek badań dotyczy regulacji cyklu podziałowego komórki. Zmierza on do identyfikacji czynników odpowiedzialnych za kontrolę przebiegu kolejnych faz cyklu komórkowego. Duży postęp w tym kierunku dokonany został w ostatnich latach w badaniach drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae* oraz odległych ewolucyjnie drożdży rozszczepkowych *Schizosaccharomyces pombe*, *Xenopus laevis* i ludzkich *HeLa*.

II. Charakterystyka produktów genów CDC28/cdc2⁺

II-1. Krótka charakterystyka cyklu komórkowego *S. cerevisiae*

W cyklu komórkowym organizmów eukariotycznych wyróżnić można 4 zasadnicze fazy: G₁, S, G₂, M. Młode komórki bezpośrednio po podziale wchodzi w fazę G₁ (ang. *gap*). Jest to okres, w którym komórki przygotowują się do procesu powielania materiału genetycznego. W fazie S zachodzi replikacja DNA, a po jej ukończeniu komórki przechodzą w fazę G₂, której końcowym momentem jest zapoczątkowanie podziału mitotycznego. Fazy G₁, S i G₂ stanowią tzw. interfazę. Ostatnią fazą cyklu jest mitoza — faza M. Cały cykl mitotyczny kończy cytokineza, czyli podział cytoplazmy i całej komórki na dwie potomne.

Wiele informacji odnośnie cyklu komórkowego eukariontów uzyskano dzięki badaniom na temperaturze wrażliwych mutantach, które rosną i dzielą się z największą szybkością w środowisku nie przekraczającym 23-28°C (temperatura permissyjna), natomiast w podwyższonej o kilka stopni temperaturze zatrzymują się w określonej fazie cyklu i nie są zdolne do jego kontynuacji. Genetyczne i biochemiczne badania takich mutantów wykazały, że w kontroli cyklu podziałowego komórki drożdży zaangażowane są geny



Ryc. 1 Uproszczony schemat cyklu mitotycznego komórki *S. cerevisiae*. Pełną charakterystykę cyklu znaleźć można w opracowaniu Pringle'a i Hartwell'a (12).

*CDC** (ang. *cell division cycle*). Geny te spełniają określone funkcje w swoistych dla siebie etapach cyklu komórkowego [7, 8, 9, 10, 11].

U drożdży pączkujących zidentyfikowano ponad 50 genów *CDC* [12]. Ustalona została kolejność włączania się poszczególnych genów w cyklu życiowym komórki. Na ryc. 1 przedstawione zostały poszczególne fazy cyklu komórkowego *S. cerevisiae* z zaznaczeniem genów, których ekspresja odgrywa zasadniczą rolę regulacyjną w przebiegu cyklu [13].

II-2. Rola genu *CDC28* w regulacji cyklu komórkowego drożdży pączkujących — charakterystyka produktu genu *CDC28*

Rozpoczęcie cyklu komórkowego drożdży ma miejsce podczas fazy G1 w momencie, w którym komórka osiąga punkt określany jako START. Na tym etapie ulegają ekspresji geny *CDC28*, *CDC3*, *CDC37*, *CDC39* [11, 13], przy czym rolę krytyczną spełnia ekspresja genu *CDC28*, który często w literaturze naukowej określany jest mianem „START gene” lub „MASTER gene” [11, 13]. Mutacje w genie *CDC28* powodują zatrzymanie cyklu we wczesnej fazie G1 [14]. Temperaturowrażliwe mutanty *cdc28* mogą rosnąć, koniugować (ang. *mate*), ale nie są zdolne do rozpoczęcia nowego cyklu życiowego [15]. Zdaniem niektórych badaczy produkt genu *CDC28* wydaje się odgrywać również istotną rolę w fazie G2 [16].

Analiza struktury pierwszorzędowej sklonowanego genu *CDC28* wykazała wyraźną homologię do genów rodziny kinaz fosfobiałkowych [17, 18]. W 1985 roku Reed i współautorzy [19] potwierdzili, że produkt genu *CDC28* posiada aktywność kinazy fosfobiałkowej *in vitro*. Jest to białko o m.c.z. 34 kDa ($p34^{CDC28}$) i należy do klasy kinaz serynowo/treoninowych [20]. Przy użyciu technik immunologicznych wykazano, że kinaza $p34^{CDC28}$ występuje w kompleksie ze swoim komórkowym substratem, białkiem o m.c.z. 40 kDa, będąca jednocześnie miarą aktywności kinazy $p34^{CDC28}$, obserwowana jest jedynie w fazie G1 (21, 22). W komórkach drożdży zatrzymanych w fazie G1 pod wpływem głodzenia, działania feromonów czy u temperaturowrażliwych mutantów hodowanych w temperaturze niepermissyjnej aktywność omawianej kinazy nie jest wykrywana [21, 22].

II-3. Homologi genów *CDC 28* u innych eukariontów

Strukturalnym i funkcjonalnym homologiem genu *CDC28* u *Schizosaccharomyces pombe* jest gen *cdc2+*.

*1 Zgodnie z przyjętymi zasadami geny *CDC* drożdży pączkujących oznaczone są w artykule dużymi literami, natomiast u innych organizmów małymi literami z zaznaczeniem + oraz organizmu, z którego pochodzą np. *cdc2+* *Sp* (*Schizosaccharomyces pombe*), *cdc2+* *Hs* (*Homo sapiens*), natomiast mutanty oznaczono odpowiednio *cdc28*, *cdc2*.

Ekspresja genu *cdc2+* *Sp* odgrywa istotną rolę w regulacji cyklu życiowego drożdży rozsiewkowych w fazie G1 na etapie rozpoczęcia cyklu [23] oraz w późnej fazie G2 tuż przed rozpoczęciem mitozy [24, 25]. Produkt genu *cdc2+* *Sp* jest białkiem o m.c.z. 34 kDa ($p34^{cdc2Sp}$), które podobnie jak $p34^{CDC28}$ posiada aktywność kinazy fosfobiałkowej [26, 27, 28]. O tym, że gen *CDC28* i *cdc2+* *Sp* są funkcjonalnymi homologami świadczy fakt, że wprowadzenie genu *CDC28* do temperaturowrażliwych mutantów *cdc2Sp* przywraca dziki fenotyp mutantowi i odwrotnie wprowadzenie genu *cdc2+*, po uprzednim usunięciu wszystkich 4 intronów, przywraca możliwość przeżywania *S. cerevisiae* w podwyższonej temperaturze [29].

W świetle danych wskazujących na istotną rolę regulacyjną kinaz *CDC28* i *cdc2Sp* drożdży, rozpoczęły się intensywne poszukiwania białek u innych odległych ewolucyjnie organizmów. W 1987 r. Lee i Nurse odkryli obecność homologicznego genu w ludzkich komórkach *HeLa* [30]. Produkt tego genu (*cdc2+* *Hs*) jest białkiem o m.c.z. 34 kDa, który również posiada aktywność kinazy fosfobiałkowej [31]. Aktywność kinazy z komórek ludzkich, podobnie jak u drożdży, zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego, przy czym najwyższy jej poziom obserwowany jest na granicy faz G2/M [31]. Analiza porównawcza struktury pierwszorzędowej produktów genów *CDC28*, *cdc2+* *Sp* i *cdc2+* *HS* (dla uproszczenia w dalszej części tekstu oznaczone będą jako kinazy *CDC28/cdc2*) wykazała aż 63% identyczności [28]. Szczególnie konserwatywny fragment zidentyfikowany został na końcu C omawianych białek. Jest to sekwencja EGVNSTAIREISLLKE, która dosyć często skrótowo określana jest jako sekwencja PSTAIR [30]. Przeciwciała otrzymane przeciw $p34^{cdc2Sp}$ [31] lub przeciw wspomnianej wyżej sekwencji PSTAIR [30] rozpoznają białko o m.c.z. 34 kDa w kilku liniach komórek ludzkich [30], a także u *Xenopus laevis*, rozgwiazd i wielu innych organizmów [32, 33].

Z przedstawionych danych wynika, że homologi genów *CDC28/cdc2+* występują u wszystkich przebadanych organizmów od prostych eukariontów jak drożdże, do komórek wyższych organizmów eukariotycznych włączając komórki ludzkie. Produkty tych genów, białka o m.c.z. 34 kDa należą do kinaz fosfobiałkowych co wskazuje, że procesy fosforylacji odgrywają rolę w regulacji cyklu komórkowego. Dlatego też prowadzone są intensywne badania zmierzające do bliższej charakterystyki wspomnianych kinaz białkowych, poznania ich fizjologicznych substratów oraz mechanizmu funkcjonowania w komórce.

III. Charakterystyka porównawcza kinaz *CDC28/cdc2*, czynnika MPF i kinazy H1

III-1. Czynniki MPF a kinazy *CDC28/cdc2*

Podziały mitotyczne i mejotyczne komórek organizmów eukariotycznych kontrolowane są przez czynniki

MPF (ang. *maturation promoting factor* lub *methaphase promoting factor*). Uważa się, że czynnik ten zaangażowany jest w inicjację złożonych procesów rozpadu błony jądrowej i kondensacji chromosomów [34, 35]. Po raz pierwszy aktywność czynnika MPF wykazana została w komórkach *HeLa* [36]. Następnie jego obecność zaobserwowano w dojrzałych oocytach wielu organizmów kręgowych i bezkręgowych, w mitotycznych komórkach jeżowców morskich i gadów, w hodowlach tkankowych komórek ssaków oraz u drożdży [32, 37, 38, 39]. U wszystkich wymienionych tutaj organizmów aktywność czynnika MPF obserwowana jest jedynie podczas metafazy zarówno w procesie mitozy jak i mejozy. W innych fazach cyklu komórkowego aktywność czynnika MPF nie jest wykrywana [40]. Brak odpowiedniego testu na wykrywanie aktywności MPF *in vitro* oraz duża jego labilność, przez długi czas była powodem niepowodzeń w jego oczyszczaniu [41, 42, 43, 44]. W ostatnim czasie udało się uzyskać pierwszy czysty preparat tego czynnika z jaj *Xenopus laevis* [34]. Wykazano, że czynnik MPF jest kompleksem złożonym z białka o m.c. 32 kDa (p32) i 45 kDa (p45). Biochemiczna analiza wykazała, że p32 posiada aktywność kinazy serynowo/treoninowej, która wykorzystuje drugi składnik kompleksu MPF, białko p45 jako substrat fosforylacji. Enzym katalizuje również fosforylację histonu H1, kazeiny oraz inhibitora 1 fosfatazy 32). Warto tutaj zaznaczyć, że β -glicerofosforan, znany inhibitor fosfataz fosfobiałkowych, wpływa na stabilizację aktywności czynnika MPF. Może to jednocześnie wskazywać, że aktywność czynnika MPF jest regulowana przez fosforylację. Badania prowadzone w wielu laboratoriach doprowadziły ostatnio do niezwykle interesującego odkrycia. Wykazano mianowicie, że komponenta p32 czynnika MPF jest homologiem kinaz *CDC28/cdc2* [33, 35]. Przeciwciała uzyskane przeciw 16 aminokwasowemu peptydowi PSTAIR, który jest wspólny dla kinaz *CDC28/cdc2*, dają pozytywną reakcję immunologiczną z p32 czynnika MPF *Xenopus laevis* [33]. Co więcej wykazano, że sam peptyd PSTAIR w znacznym stopniu przyspiesza kondensację chromatyny i rozpad błony jądrowej *in vitro* [33]. Obserwacje te zdają się potwierdzać udział białek *CDC28/cdc2* w inicjacji mitozy. Nie wiadomo tylko jaki jest mechanizm ich działania. Czy poprzez fosforylację wpływają one na aktywację induktorów mitozy czy też ich działanie wiąże się z inaktywacją inhibitorów tego procesu.

III-2. Analiza porównawcza kinazy H1, czynnika MPF i kinaz *CDC28/cdc2*

Inicjacji mitozy towarzyszy wzrost fosforylacji wielu białek w komórce. Do najintensywniej fosforylowanych należą: laminy [46], wimentyna [47], histon H3 [48] oraz histon H1 [49]. Szczególnie wiele uwagi poświęcono badaniom nad fosforylacją histonu H1 [50]. Wykazano, że ufosforylowanie histonu H1 rozpoczyna się w fazie G1, jest kontynuowane w fazie

S i G2 i gwałtownie rośnie w fazie M (hyperfosforylacja). W tej fazie modyfikacji ulegają reszty serynowe i treoninowe zlokalizowane na końcu N i C histonu, ale nie w jego części globularnej. Za modyfikację histonu w tych miejscach odpowiedzialna jest specyficzna kinaza histonu H1 (kinaza H1), często określana mianem GAK (ang. *growth associated kinase*) [51]. Aktywność kinazy H1 wykazano w komórkach ssaków [52, 53, 54], *Physarium polycephalum* [49, 50], jajach jeżowca morskiego [55], oocytach *Xenopus laevis* [56], rozgwiazd [57, 58] i innych [58].

Należy podkreślić, że najwyższy poziom aktywności kinazy H1 obserwowany jest podczas mitozy i jest ściśle skorelowany z hyperfosforylacją histonu H1 w specyficznych dla mitozy miejscach serynowo/treoninowych. Zdaniem wielu badaczy hyperfosforylacja histonu 1 przez kinazę H1 jest przyczyną kondensacji chromatyny [59, 60] i inicjacji mitozy [61]. W świetle ostatnich danych przypuszczenia te mogą okazać się prawdziwe. Wykazano mianowicie, że kinaza H1 jest homologiem kinaz *CDC28/cdc2* jak również komponenty p32 czynnika MPF. Informacje odnośnie tego zestawienia porównawczego pochodzą z następujących typów danych:

1. Kinetyka aktywacji czynnika MPF przez 1-metyloadeninę przebiega identycznie jak aktywacja kinazy H1 [62].
2. Przeciwciała przeciw 16-aa peptydowi PSTAIR reagują z białkiem o m.c. 32-34 kDa wchodzącym w skład oczyszczonej kinazy H1 komórek ssaków [32] jak i czynnika MPF [33].
3. Oczyszczony czynnik MPF z *Xenopus* może fosforylować histon H1 *in vitro*, podobnie jak kinaza H1 oraz kinazy *CDC28/cdc2* [34]. Co więcej fosforylacji ulegają reszty seryny i treoniny w tych samych pozycjach, które modyfikowane są podczas mitozy [63].

Wymienione tutaj oraz szereg innych pośrednich obserwacji [32, 35, 58, 113] wskazuje, że powiązana ze wzrostem kinaza H1, kinazy *CDC28/cdc2* oraz komponenta p32 czynnika MPF są homologicznymi białkami. Wydaje się, że fosforylacja białek przez te enzymy stanowi pewien fragment zachowanego ewolucyjnie mechanizmu, który jest zaangażowany w regulację cyklu podziałowego komórki. Pomimo dużego postępu badań, informacje z tego zakresu są wciąż dalekie od pełnego wyjaśnienia tych złożonych procesów.

IV. Regulacja aktywności kinaz *CDC28/cdc2*

Jak już wielokrotnie wspomniano, aktywność omawianych kinaz zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego. I tak kinaza *CDC28 S. cerevisiae* wykazuje najwyższy poziom aktywności w fazie G1 [22]. U drożdży rozszczepkowych aktywność homologicznej kinazy *cdc2* pojawia się w fazie G1 oraz G2/M [28]. Natomiast w komórkach *HeLa* kinaza

cdc2 jest aktywna jedynie podczas mitozy [64]. Poziom syntezy tych białek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego nie ulega zasadniczym zmianom, co wskazuje, że wzrost aktywności tych enzymów nie wynika z ich akumulacji w komórce [22, 27, 64]. Wydaje się, że aktywność omawianych kinaz jest regulowana na drodze potranslacyjnej modyfikacji a także poprzez tworzenie wysokocząsteczkowych kompleksów z innymi białkami.

IV-1. Regulacja aktywności poprzez fosforylację

— Komórki *HeLa*

W wielu laboratoriach wykazano, że we wszystkich przebadanych organizmach kinazy *CDC28/cdc2* ulegają fosforylacji *in vivo* [27, 65, 66, 67]. Modyfikacja tych enzymów nie jest wynikiem autofosforylacji lecz zachodzi na drodze fosforylacji poprzez inne kinazy komórkowe. Akceptorami reszt fosforanowych jest seryna i treonina, a w przypadku komórek *HeLa* dodatkowo modyfikowana jest tyrozyna [65]. Należy tutaj podkreślić, że $p34^{cdc2}$ jest białkiem o najwyższej zawartości P-tyrozyny w komórkach *HeLa* [65]. Wykazano, że dwie reszty tyrozynowe ulegają modyfikacji *in vitro*.

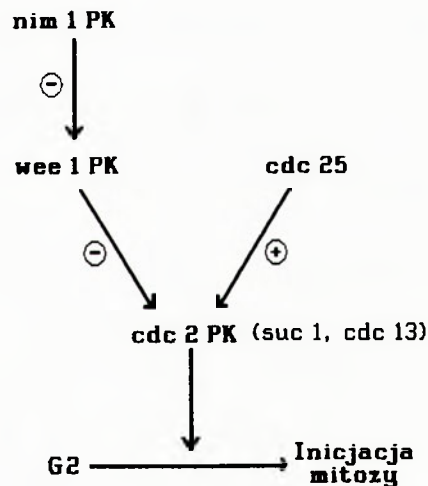
Jest interesujące, że poziom fosforanu w resztach tyrozynowych $p34^{cdc2}$ zmienia się podczas cyklu komórkowego i jest najwyższy podczas mitozy. Warto przypomnieć, że w tej fazie aktywność omawianej kinazy również osiąga maksymalny poziom.

Draetta i inni [65] wykazali, że kinaza tyrozynowa $pp60^{src}$ katalizuje fosforylację jednej reszty tyrozynowej $p34^{cdc2}$ *in vitro*. Wiadomo, że w mysich fibroblastach NIH3T3 aktywność kinazy $pp60^{src}$ jest kilkakrotnie wyższa podczas mitozy niż w interfazie [68]. Czy mogłoby to wskazywać, że enzym ten uczestniczy w modyfikacji $p34^{cdc2}$ *in vitro*? Warto tutaj wspomnieć, że w komórkach fibroblastów kurczenia po transformacji nowotworowej wirusem RSV, kinaza $pp60^{src}$ katalizuje fosforylację nie zidentyfikowanego dotąd białka o m.c. 34 kDa [69]. Białko o tej samej masie cząsteczkowej ulega fosforylacji *in vivo* w resztach tyrozynowych oraz serynowych w komórkach A-431 stymulowanych EGF [70]. Fosforylacja tyrozyny obserwowana jest również w czynniku MPF izolowanym z jaj *Xenopus laevis* podczas mitozy [71]. Nie można więc wykluczyć, że kinazy *CDC28/cdc2* w powiązaniu z kinazami tyrozynowymi będącymi produktami protoonkogenów, onkogenów wirusowych bądź receptorami czynników wzrostowych, uczestniczą w regulacji cyklu życiowego komórek prawidłowych i nowotworowych.

— *Schizosaccharomyces pombe*

Jak wspomniano wcześniej, wszystkie poznane dotąd kinazy homologii *CDC28/cdc2* ulegają modyfikacji w resztach serynowo/treoninowych. U *Schizosaccharomyces pombe* obserwuje się ścisłą korelację między aktywnością kinazy *cdc2Sp* a stopniem jej ufosforylo-

wania. Wykazano, że w komórkach drożdży rozszczepkowych poddanych głodzeniu azotowemu tuż przed rozpoczęciem nowego cyklu komórkowego, kinaza $p34^{cdc2Sp}$ traci swoją aktywność. Spadek aktywności enzymu jest skorelowany z jego defosforylacją [27]. Badania genetyczne na temperaturowrażliwych mutantach pozwoliły zidentyfikować kilka genów których produkty uczestniczą w regulacji aktywności kinazy *cdc2Sp*. Przy czym należy przypomnieć, że aktywność kinazy *cdc2Sp* pojawia się dwukrotnie w cyklu komórkowym a więc w fazie G1 oraz G2/M przed rozpoczęciem mitozy. Stosunkowo najwięcej danych uzyskano z badań nad inicjacją mitozy i wykazano, że w regulacji kinazy *cdc2Sp* na tym etapie uczestniczą produkty genów *cdc25⁺*, *wee1⁺* i *nim1⁺*. Wykazano, że mutacja delecyjna genu *cdc25⁺* powoduje zahamowanie mitozy a wzmożona transkrypcja tego genu prowadzi do znacznego przyśpieszenia tej fazy cyklu komórkowego [72]. Wskazuje to, że gen *cdc25⁺* koduje pozytywny element kontroli mitozy. W odróżnieniu od *cdc25*, produkt genu *wee1⁺* wydaje się być zaangażowany w negatywnej kontroli mitozy [73]. Natomiast ekspresja genu *nim1⁺* wpływa na wzrost inicjacji mitozy wywierając inhibitorowy efekt na produkt genu *wee1⁺* [74]. Na ryc. 2 przedstawiono schemat kontroli mitotycznej u *S. pombe* zaproponowany przez Lee i Nurse [28].



Ryc. 2 Kontrola mitozy u *S. pombe*.
Skrót PK oznacza kinazę fosfobiałkową, - negatywny,
+ dodatni wpływ na aktywność poszczególnych enzymów.

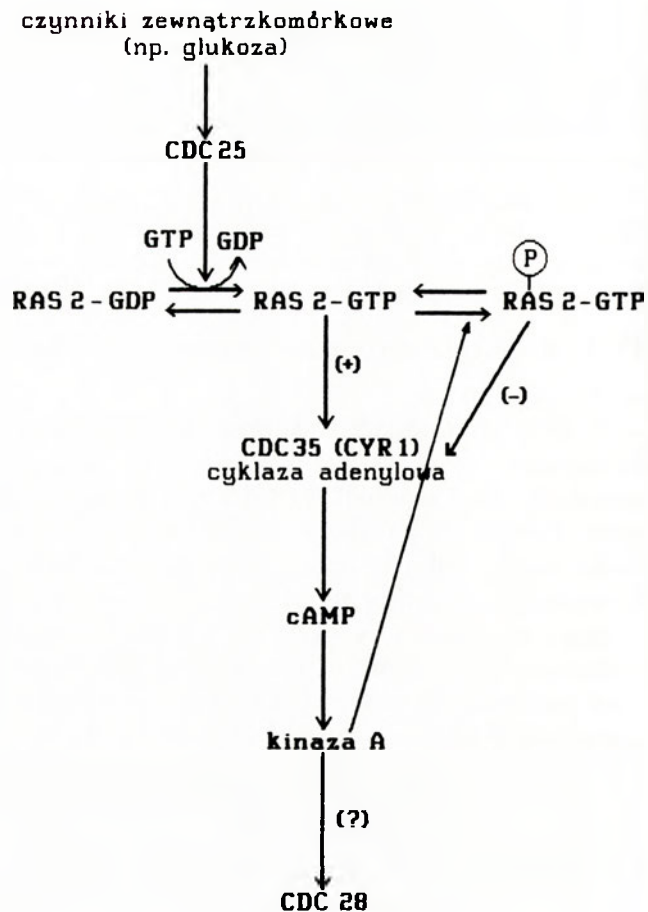
Analiza sekwencyjna genów *cdc25⁺*, *wee1⁺* i *nim1⁺* wskazuje, że kodują one białka o m.c. odpowiednio 67 kDa, 96 kDa i 45 kDa. Wykazano, że geny *wee1⁺* i *nim1⁺* posiadają duży stopień homologii do rodziny kinaz fosfobiałkowych. Wskazuje to, że trzy kinazy zaangażowane są w kaskadowej regulacji mitozy u *S. pombe* [28, 73]. Nie wiadomo tylko, czy istnieje bezpośrednio oddziaływanie między nimi, czy funkcjonują w połączeniu z innymi pośrednimi składnikami.

— *Saccharomyces cerevisiae*

Jak wynika z cytowanych wcześniej danych literaturowych, kinaza *CDC28* drożdży pączkujących wykazuje najwyższą aktywność w fazie G1, w momencie inicjacji nowego cyklu podziałowego komórki. O rozpoczęciu nowego cyklu w dużym stopniu decydują warunki odżywcze podłoża wzrostu. W podłożu ubogim w źródła azotu, siarki czy przy braku aminokwasów, komórki drożdży wchodzą w fazę spoczynku porównywalną do fazy G0 komórek zwierzęcych. Natomiast w optymalnych warunkach odżywczych, którym towarzyszy wzrost syntezy cAMP, komórki drożdży rozpoczynają nowy cykl podziałowy. Wykazano, że cAMP jest pozytywnym regulatorem cyklu komórkowego drożdży [75, 76]. Synteza cAMP w komórkach drożdży pączkujących regulowana jest przez kilka genów. Bezpośrednim katalizatorem jego syntezy jest cyklaza adenylowa, produkt genu *CDC35*, znany również pod nazwą *CYR1* [77,78]. Wykazano, że w ekstraktach pochodzących z temperaturowrażliwych mutantów *cdc35* inkubowanych w podwyższonej temperaturze, aktywność kinazy *CDC28* (mierzona poprzez fosforylację p40) nie jest wykrywana [21]. Na poziom syntezy cAMP wpływają również geny *RAS1*, *RAS2* oraz *CDC25* [79, 80, 81, 82]. Produkty genów *RAS* drożdży, posiadają wiele homologii do ich wirusowych i komórkowych odpowiedników u ssaków. Podobnie jak białka ras organizmów wyższych posiadają one zdolność wiązania nukleotydów guaninowych oraz hydrolizy GTP [83, 84, 85, 86, 87]. Produkt onkogenu *RAS1* (36 kDa) zaangażowany jest głównie w regulację przemian fosfolipidów inozitolowych [88], natomiast *RAS2* uczestniczy przede wszystkim w regulacji syntezy cAMP [80, 89]. Białko *RAS2* ulega fosforylacji *in vivo* przez dwie różne kinazy z których jedna jest zależna od cAMP [90, 91]. Białko *RAS2* ufosforylowane przez kinazę A *in vitro* posiada obniżoną o 40% zdolność aktywacji cyklazy adenylowej [92]. Istnieją przypuszczenia, że fosforylacja białka *RAS2* przez kinazę A stanowi pewną część mechanizmu, działającego na zasadzie sprzężenia zwrotnego, w regulacji syntezy cAMP w komórce [91, 92].

Jak wspomniano wcześniej innym składnikiem biorącym udział w regulacji aktywności cyklazy adenylowej i syntezy cAMP jest produkt genu *CDC25*. Bierze on udział w wymianie GDP, związanego z białkiem *RAS2*, na GTP [87, 93, 94]. Mechanizm regulacji syntezy cAMP u drożdży zilustrowany został na ryc. 3.

Istnieją sugestie, że wywołany działaniem składników podłoża (np. glukozy) wzrost stężenia cAMP powoduje aktywację kinazy A, która z kolei wykorzystuje kinazę *CDC28* jako substrat fosforylacji [9]. Nie wiadomo tylko czy fosforylacja kinazy *CDC28* reguluje aktywność enzymu. Ostatnio wykazano, że w komórkach drożdży, których cykl zatrzymany został w fazie G1 poziom fosforylacji p34^{*CDC28*} nie uległ zmianie [95]. Są to wyniki odmienne w porównaniu do *S. pombe* i *HeLa*. Dlatego wymagane są dalsze badania w celu



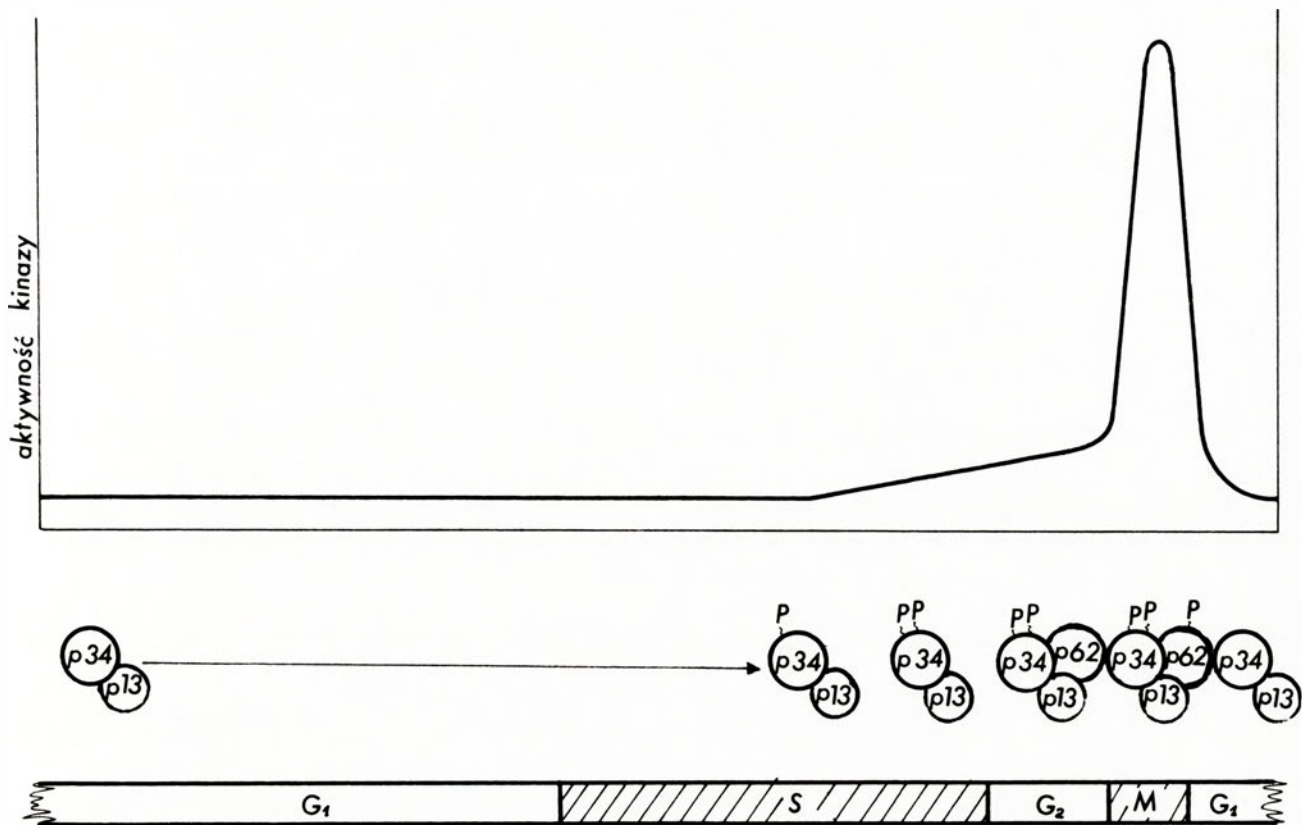
Ryc. 3 Regulacja syntezy cAMP w komórkach *S. cerevisiae*. P — oznacza resztę fosforanową, + dodatni a - ujemny wpływ na aktywację cyklazy adenylowej

wyjaśnienia tego niezwykle złożonego mechanizmu. Zdaniem niektórych badaczy regulacja aktywności tej kinazy zachodzi poprzez odmienny mechanizm.

IV-2. Regulacja aktywności przez tworzenie wysokocząsteczkowych kompleksów

Niezależnie od skorelowanych cyklem komórkowym zmian w poziomie fosforylacji, kinazy *CDC28/cdc2* charakteryzują się zdolnością tworzenia wysokocząsteczkowych kompleksów z innymi białkami. W komórkach drożdży pączkujących aktywna forma kinazy *CDC28* jest kompleksem o m.c. 160 kDa. W skład tego kompleksu oprócz p34^{*CDC28*} wchodzi białka o m.c. 40 kDa i 15 kDa [96]. Jak wspomniano wcześniej, białko p40 jest substratem fosforylacji dla kinazy p34^{*CDC28*} a jego fosforylacja obserwowana jest jedynie w fazie G1 [21]. Tworzenie kompleksu jest regulowane podczas cyklu komórkowego i osiąga maksimum w fazie G1. Zdaniem Wittenberga i Reeda [96] aktywność p34^{*CDC28*} regulowana jest właśnie poprzez asocjacje i dysocjacje poszczególnych komponentów wysokocząsteczkowego kompleksu.

U drożdży rozszczepkowych białko *cdc2Sp* jest ściśle zasocjowane z produktami genów *suc1+* (p13^{*suc1*})



Ryc. 4 Aktywność kinazy *cdc2* w cyklu komórkowym komórek *HeLa* wg (64).

W fazie G1 kinaza $p34^{cdc2Hs}$ w formie nieufosforylowanej jest skompleksowana z peptydem p13. Pod koniec fazy S $p34^{cdc2Hs}$ ulega fosforylacji, której poziom rośnie w fazie G2 i M (hyperfosforylacja). Na tym etapie przylacza się białko p62, które ulega fosforylacji przez kinazę $p34^{cdc2Hs}$ podczas mitozy w formie wysokocząsteczkowego, ufosforylowanego kompleksu, enzym posiada najwyższą aktywność. Podczas cytokinezy w/w kompleks ulega defosforylacji i dysocjacji do niskocząsteczkowej formy. Na schemacie – P oznacza resztę fosforanową.

oraz *cdc13+* [31, 97, 98]. Rola produktów genów *suc1+* i *cdc13+* nie została dotąd poznana. Można przypuszczać, że pełnią one funkcje regulatorów, które ułatwiają interakcje z innymi białkami, lub też ułatwiają lokalizację kinazy *cdc2* w odpowiednim kompartmentie komórki [97].

Ostatnio wykazano, że struktura pierwszorzędowa genu *cdc13+Sp* i genów kodujących cykliny jest w dużym stopniu homologiczna [98, 99, 100]. Cykliny to grupa spokrewnionych białek, które są syntetyzowane podczas interfazy i szybko degradowane podczas mitozy [101]. Istnieją sugestie, że cykliny pełnią funkcje regulatorów aktywności kinaz *CDC28/cdc2* [38, 114].

Białko *cdc2* komórek *HeLa* jest również zasocjowane z peptydem p13, który jest homologiem $p13^{suc}$ *S. pombe* [31, 97]. Wykazano ponadto, że ufosforylowana forma kinazy $p34Hs$ posiada zdolność przylaczania białka o m.c. 62 kDa. Białko to, analogicznie do $p40$ *S. cerevisiae* jest substratem fosforylacji dla kinazy $p34Hs$. Ten heteromultimeryczny kompleks powstaje w fazie G2/M i w takiej formie charakteryzuje się najwyższą aktywnością [64]. Mechanizm aktywacji kinazy $p34Hs$ przedstawiony został na ryc. 4

V. Rola kinazy *CDC7* w cyklu komórkowym drożdży pączkujących

Omawiając udział kinaz fosfobiałkowych w regulacji cyklu komórkowego należy wspomnieć o produkcie genu *CDC7*. Ekspresja tego genu zachodzi na granicy faz G1/S (ryc. 1). Produkt genu *CDC7*, białko o m.c. 58 kDa [102] posiada aktywność kinazy fosfobiałkowej, która jest ściśle zasocjowana z wysokocząsteczkowym multimerycznym kompleksem replikacyjnym DNA [103]. W izolowanych kompleksach replikacyjnych enzym fosforyluje kilka białek ze szczególną wybiórczością w stosunku do białka o m.c. 48 kDa. Enzym może także wykorzystywać histon jako substrat fosforylacji. Wykazano, że w kompleksach replikacyjnych izolowanych z temperaturowrażliwych



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

mutantów *cdc7* inkubowanych w temperaturze niepermissyjnej (komórki zatrzymane w fazie G1/S) aktywności kinazowej nie stwierdzono. Wskazuje to na funkcję kinazy *CDC7 in vivo*.

Wydaje się więc, że fosforylacja komponentów aparatu replikacyjnego może odgrywać ważną rolę w kontroli replikacji DNA. Istnieje wiele przykładów białek zaangażowanych w replikację DNA, które ulegają fosforylacji: DNA polimeraza α , topoizomeraza I i II, i inne [103, 104, 105, 106, 107, 108]. Nie można w tej chwili odpowiedzieć czy i ewentualnie które z nich jest modyfikowane przez kinazę *CDC7*.

Podsumowując należy wspomnieć, że istnieją poglądy, że w komórkach drożdży pączkujących kinazy fosfobiałkowe uczestniczą w kaskadowej regulacji przejścia cyklu komórkowego z fazy G1 do fazy S. Ten szereg reakcji fosforylacji rozpoczynałby się aktywacją kinazy *CDC28* w momencie START-u a ostatnim jego ogniwem byłaby kinaza *CDC7*, która poprzez fosforylację kompleksu replikacyjnego rozpoczynałaby fazę S cyklu komórkowego [103].

VII. Uwagi końcowe

Aby w pełni zrozumieć złożone mechanizmy regulacyjne cyklu życiowego komórki należy poznać wszystkie produkty genów *cdc*, oznaczyć ich funkcje oraz miejsce działania w komórce. Pomimo dużego postępu badań, wiedza zdobyta w tej dziedzinie jest w dalszym ciągu fragmentaryczna. Zebrane w przedstawionym artykule informacje dotyczą charakterystyki genów *cdc*, których produkty posiadają aktywność kinaz fosfobiałkowych i spełniają krytyczną rolę w regulacji cyklu komórkowego. Można przypuszczać, że liczba kinaz, produktów genów *cdc*, bądź też kinaz wpływających na regulację aktywności białek *cdc* jest znacznie większa. Przykładem może być zidentyfikowana kinaza o aktywności supresorowej w stosunku do produktu genu *CDC25 S. cerevisiae* [109, 110], czy też produkt genu *ran1⁺ S. pombe*, kinaza o znaczeniu krytycznym w regulacji inicjacji mejozy [111].

Największy postęp w omawianej dziedzinie dokonany został na drożdżach. Stało się to możliwe dzięki dostępności temperaturowrażliwych mutantów *cdc* i możliwości różnego typu manipulacji genetycznych. Wykorzystanie współczesnych technik rekombinacji homo- i heterologicznych DNA sprawia, że komórki drożdżowe stały się obecnie uniwersalnym organizmem wykorzystywanym do badania ekspresji genów wyższych organizmów eukariotycznych [112]. Należy przypuszczać, że tego typu badania przyniosą wiele nowych informacji odnośnie struktury, funkcji oraz wzajemnego pokrewieństwa genów (w tym również *cdc*) u odległych ewolucyjnie organizmów.

★

Panu Profesorowi Eugeniuszowi Gąsiorowi składam serdeczne podziękowanie za życzliwe uwagi i dyskusje podczas przygotowywania pracy.

Artykuł napisany w ramach prac finansowanych przez CPBR-3.13. i RP-11-13.

Artykuł otrzymano 28 września 1989 r.

Zaakceptowano do druku 31 stycznia 1990 r.

Piśmiennictwo

1. Klein A., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 125–150.
2. Inglot A., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 151–164.
3. Popik W., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 165–181.
4. Kosz M., Unenchak M., Kawecka D., Magielska-Żero. (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 183–197.
5. Kaczmarek L., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 425–432.
6. Jagła J., Domaniewski J., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 433–450.
7. Lloyd D., (1987), *Biochem. J.*, **242**, 313–321.
8. Hartwell L.H., Culotti J., Pringle P., Reid B.J., (1974), *Science*, **183**, 46–51.
9. Whitfield J.F., Durkin J.P., Franks D.J., Kleine L.P., Raptis L., Rixon R.H., Sikorska M., Walker P.R., (1987), *Cancer Metastasis Rev.* **5**, 205–250.
10. Wheals A., (1985), *BioEssays* **33**, 108–112.
11. Moore S.A., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 9674–9681.
12. Pringle J.R., Hartwell L.H., (1981) w *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Life Cycle and Inheritance*, (red. Strathern J.N., Jones E.W., Broach R., str. 97–142, Cold Spring Harbor Laboratory.
13. Breeden L., (1988), *Trends Genet.*, **4**, 249–253.
14. Hereford L., Hartwell L.H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **84**, 445–461.
15. Reid B., Hartwell K.H., (1977), *J. Cell. Biol.*, **75**, 355–365.
16. Piggot J.A., Rai R., Carter B.L.A., (1982), *Nature (Lond.)* **298**, 391–394.
17. Lorincz A.T., Reed S.I., (1983), *Nature (Lond.)* **307**, 183–185.
18. Booher R., Beach D., (1986), *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3523–3530.
19. Reed S.I., Hadwiger A., Lorincz A., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4055–4059.
20. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T., (1988), *Science*, **241**, 42–52.
21. Mendenhall M.D., Jones A., Reed S.I., (1987), *Cell*, **50**, 927–935.
22. Wittenberg C., Reed S.I., (1988), *Cell*, **54**, 1061–1072.
23. Nurse P., Bissett Y., (1981), *Nature (Lond.)* **292**, 558–600.
24. Nurse P., (1975), *Nature (Lond.)* **256**, 547–556.
25. Fantès P.A., (1983), *Nature (Lond.)*, **302**, 153–155.
26. Nurse P., (1985), *Trends Genet.*, **1**, 51–55.
27. Simonis V., Nurse P., (1986), *Cell*, **45**, 261–268.
28. Lee M.G., Nurse P., (1988), *Trends Genet.*, **4**, 287–290.
29. Booher R., Beach D., (1986), *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3523–3530.
30. Lee M.G., Nurse P., (1987), *Nature (Lond.)*, **327**, 31–35.
31. Draetta G., Brizuela L., Potashkin J., Beach D., (1987), *Cell*, **50**, 319–325.
32. Lohka M.J., (1989), *J. Cell. Sci.*, **92**, 131–135.
33. Gautier J., Norbury C., Lohka M., Nurse P., Maller J., (1988), *Cell*, **54**, 433–439.
34. Lohka M.J., Hayes M.K., Maller J.L., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3009–3019.
35. Dunphy W.G., Brizuela L., Beach D., Newport J., (1988), *Cell*, **54**, 423–431.
36. Sunkara P.S., Wright D.A., Rao P.N., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2799–2802.
37. Maller J., (1985), *Cell. Differ.*, **16**, 211–221.
38. Featherstone C., (1989), *Trends Biochem. Sci.* **14**, 85–87.
39. Kishimoto T., (1988), *Dev. Growth Differ.*, **30**, 105–115.
40. Gerhart J., Wu M., Kirschner M., (1984), *J. Cell. Biol.* **98**, 1247–1255.
41. Lohka M.J., Maller L., (1985), *J. Cell. Biol.*, **101**, 518–523.
42. Supryniewicz F., Gerace L., (1986), *J. Cell. Biol.*, **103**, 2073–2081.
43. Newport J., Spann T., (1987), *Cell*, **48**, 219–230.
44. Fischer P.A., (1987), *Cell*, **48**, 175–176.
45. Cicirelli M.F., Pelech S.L., Krebs E.G., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 2009–2019.
46. Ottaviano Y., Gerace L., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 624–632.
47. Evans R.M., Fink L.M., (1982), *Cell*, **29**, 43–52.

48. Gurley L.R., Walters R.A., Tobey R.A., (1974), *J. Cell. Biol.* **60**, 356-364.
49. Brandbury E.M., Inglis R.J., Matthews H.R., (1974), *Nature (Lond.)* **247**, 257-261.
50. Jerzmanowski A., (1986), *Post. Biochem.*, **32**, 97-128.
51. Lake R.S., Salzman N.P., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4817-4825.
52. Woodford T.A., Pardee A.B., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 4669-4676.
53. Fabisz-Kijowska A.A., Lumley-Sapanski, Halleck M.S., Schlegel R.A., (1987), *Biochem. Cell. Biol.*, **65**, 1070-1079.
54. Muller K., Little M. (1989), *Exp. Cell. Res.*, **180**, 30-35.
55. Meijer L., Pondoven P., (1988), *Exp. Cell. Res.*, **174**, 116-129.
56. Masaracchia R.A., Maller J.L., Walsh D.A., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 1-12.
57. Pelech S.L., Meijer L., Krebs G.E., (1987), *Biochemistry*, **26**, 7960-7968.
58. Arion D., Meijer L., Brizuela L., Beach D., (1988), *Cell*, **55**, 371-378.
59. Muller R.D., Yasuda H., Brandbury E.M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5081-5086.
60. Matsumoto L., Yasuda H., Mita S., Marunouchi T., Yamada M.A., (1980), *Nature, (Lond.)* **284**, 181-184.
61. Brandbury E.M., Inglis R.J., Matthews H.R., Langan T.A., (1974), *Nature, (Lond.)* **249**, 553-556.
62. Meijer L., Pelech S.L., Krebs G.E., (1987), *Biochemistry*, **26**, 7968-7974.
63. Langan T.A., Gautier J., Lohka M., Hollingsworth R., Nurse P., Maller J.L., Sciafani R.A., (1988), *J. Cell. Biol.* **107**, 665.
64. Draetta G., Beach D., (1988), *Cell*, **54**, 17-26.
65. Draetta G., Piwnicka-Worms H., Morrison D., Drucker B., Roberts T., Beach D., (1988), *Nature, (Lond)* **336**, 738-744.
66. Reed S.L., Hadwiger J.A., Lorincz A.T., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4055-4059.
67. Potashkin J.A., Beach D.H., (1988), *Curr. Genet.*, **14**, 235-240.
68. Chackalaparampil L., Shalloway D., (1988), *Cell*, **52**, 801-810.
69. Simon M., Arrigo A.P., Spahr P.F., (1987), *Exp. Cell. Res.*, **169**, 419-431.
70. Sawyer S.T., Cohen S., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 8233-8236.
71. Lohka M.J., Kyes J.L., Maller K.L., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 760-768.
72. Russel P., Nurse P., (1986), *Cell*, **45**, 145-153.
73. Russel P., Nurse P., (1987), *Cell*, **49**, 559-567.
74. Russel P., Nurse P., (1987), *Cell*, **49**, 569-576.
75. Boy-Marcotte E., Garreau H., Jacquet M., (1987), *Yeast*, **3**, 85-93.
76. Matsumoto K., Uno L., Ishikawa T., (1986) w *Yeast Cell. Biol.* 101-111, Alan R., Liss, Inc.
77. Matsumoto K., Uno L., Ishikawa T., (1984), *J. Bacteriol.* **157**, 277.
78. Caspersen G.F., Walker N., Bourne R., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5060.
79. Camonis J., Kalekine M., Gondre B., Garreau H., Boy-Marcotte E., Jacquet (1986), *EMBO J.*, **5**, 357.
80. Toda T., Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T., Brock D., Cameron S., Broach J., Matsumoto K., Wigler M., (1985), *Cell*, **40**, 2-36.
81. Fasano O., Crechet J.B., DeVenditis E., Zahu R., Feger G., Vitelli A., Parmeggiani A., (1988), *EMBO J.*, **7**, 3375-3383.
82. Mbonyi K., Beullens M., Determiere K., Geerts L., Thevelein J.M., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3051-3057.
83. Gibbs J.B., Schaber M.D., Marshall M.S., Scolnick E.M., Sigal J.S., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 10426-10429.
84. Kataoka T., Powers S., Cameron S., Fasano O., Goldfarb M., Broach J., Wigler M., (1985), *Cell*, **40**, 19-26.
85. Temeles G.L., Gibbs J.B., D'Alonzo J.S., Sigal I.S., Scolnick (1985), *Nature, (Lond.)* **313**, 700-703.
86. Tamanoi F., Walsh M., Kataoka T., Wigler M., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6925-6928.
87. Tamanoi F., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **948**, 1-15.
88. Kaibuchi K., Miyajima A., Arai K., Matsumoto K., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8172-8176.
89. Breviario D., Hinnebusch A., Dhar R., (1988), *EMBO J.*, **7**, 1805-1813.
90. Sreenath T.V., Breviario D., Ahmed N., Dhar R., (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 1182-1189.
91. Cobitz A.R., Yim E.H., Brown W.R., Peron C.M., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 858-862.
92. Resnick R.J., Racker E., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2474-2478.
93. Broek D., Toda T., Michaeli T., Levin L., Birchmeier C., Zoller M., Powers S., Wigler M., (1987), *Cell*, **48**, 789-799.
94. Robinson L.C., Gibbs B., Marshall M.S., Sigal I.S., Tatchell K., (1987), *Science*, **235**, 1218-1221.
95. Hadwiger J.A., Reed S.I., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2976-2979.
96. Wittenberg C., Richardson S.L., Reed S.I., (1987), *J. Cell. Biol.*, **105**, 1527-1538.
97. Brizuela L., Draetta G., Beach D., (1987), *EMBO J.*, **6**, 3507-3514.
98. Bocher R., Beach D., (1987), *EMBO J.*, **6**, 3441-3447.
99. Solomon M., Bocher R., Kirschner M., Beach D., (1988), *Cell*, **54**, 738-739.
100. Goebel M., Byers B., (1988), *Cell*, **54**, 739-740.
101. Swensen K.I., Farrel K.M., Ruderman J.W., (1986), *Cell*, **477**, 861-870.
102. Patterson M., Sciafoni P.A., Fangman W.L., Rosamond J., (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1590-1598.
103. Jazwinski S.M., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2101-2105.
104. Donaldson R.W., Gerner E.W., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 759-763.
105. Durban E., Goodenough M., Mills J., Busch H., (1985), *EMBO J.*, **4**, 2921-2926.
106. Ackerman P., Glover C., Osheroff N., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3164-3168.
107. Sahyoun N., Wolf M., Besterman J., Hsieh T.S., Sander M., LeVine H., Chang K.J., Cuatrecasas P., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1603-1607.
108. Studziński G.P., Brelvi Z.S., Feldman S.C., Watt R.A., (1986), *Science* **234**, 467-470.
109. Lisiewicz J., Godany A., Forster H.H., Kuntzel H., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2549-2553.
110. Ohno S., Aoshima M., Matsumoto S., Yahara I., Suzuki K., (1987) *FEBS Lett.*, **222**, 279-285.
111. McLeod M., Beach D., (1988), *Nature (Lond.)* **332**, 509-514.
112. Botstein D., Fink G.R., (1988), *Science*, **240**, 1439-1443.
113. Gautier J., Matsukawa T., Nurse P., Maller J., (1989), *Nature (Lond.)*, **339**, 626-629.
114. North G., (1989), *Nature (Lond.)*, **339**, 97-98.

Addendum

Już po oddaniu maszynopisu do druku uzyskano wiele nowych danych, które dotyczą regulacji aktywności kinaz *CDC28/cdc2* przez fosforylację. Dokładniejsze badania przeprowadzone na komórkach ssa-ków (1), rozgwiazd (2) i *Xenopus laevis* (3, 4) pozwoliły wykazać, że aktywacji kinazy *cdc2* w fazie M towarzyszy jej defosforylacja. Przy użyciu przeciwciał anty P-tyrozynowych wykazano, że aminokwasem ulegającym defosforylacji jest P-tyrozyna (1, 3). Obserwacje te zostały także potwierdzone przez bezpośrednią analizę fosfoaminokwasów (1).

Wykazano ponadto, że w fazie ekspotencjalnego wzrostu drożdży rozszczepkowych *S. pombe* kinaza *cdc2* ulega fosforylacji *in vitro* nie tylko w resztach serynowych i treoninowych, ale również w resztach

tyrozynowych (5). Warto podkreślić, że jest to pierwsze dobrze udokumentowane doniesienie o fosforylacji tyrozyny u tego prostego organizmu eukariotycznego. Fosforylacji ulega tyrozyna w pozycji 15 białka *cdc2*, w miejscu odpowiedzialnym za wiązanie ATP. Stwierdzono ponadto, że analogicznie do komórek wyższych organizmów eukariotycznych, u drożdży rozszczepkowych podczas mitozy zachodzi defosforylacja *cdc2* w resztach tyrozynowych. Defosforylacji ulega również P-treonina. Podstawienie P-tyrozyny fenyloalaniną na drodze kierowanej mutacją prowadzi do wcześniejszego rozpoczęcia mitozy (5). Podobne obserwacje uzyskano na drożdżach pączkujących (dane nieopub-

likowane cyt. za 5). Wszystkie te obserwacje wskazują, że fosforylacja odgrywa istotną rolę w regulacji inicjacji mitozy u odległych ewolucyjnie organizmów eukariotycznych (6).

Piśmiennictwo

1. Moria A.O., Draetta G., Wang Y.J., (1989), *Cell*, **58**, 193–203.
2. Labbe J.C., Picard A., Peancellier G., Cavadore J.C., Nurse P., Doree M., (1989), *Cell*, **57**, 253–273.
3. Dunphy W.G., Newport J.W., (1989) *Cell*, **58**, 181–191.
4. Gautier J., Matsukawa T., Nurse P., Maller J. (1989) *Nature (Lond.)*, **339**, 626–629.
5. Gould K.L., Nurse P., (1989) *Nature (Lond.)*, **342**, 39–45.
6. Murray A.W. (1989), *Nature (Lond.)*, **342**, 14–15.

Rola endogennych endonukleaz w programowanym obumieraniu komórek

The role of endogeneous endonucleases in programmed cell death

RYSZARD RZEPECKI¹
RYSZARD SZMIDZIŃSKI²
JAN SZOPA³

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Udział endonukleaz w programowanym obumieraniu komórek
 - II - 1. Indukcja fragmentacji DNA przez glikokortykoidy, promieniowanie jonizujące, cytotoksyczne komórki T lub brak interleukiny-2
 - II - 2. Identyfikacja endonukleazy indukowanej przez hormony sterydowe
 - II - 3. Podsumowanie
- III. Literatura

Contents:

- I. Introduction
- II. Endonucleases in programmed cell death
 - II - 1. DNA fragmentation caused by glucocorticoids, radiation, cytotoxic T cell and lack of interleukin-2
 - II - 2. Identification of a glucocorticoid-induced endonuclease
 - II - 3. Summary
- III. References

I. Wprowadzenie

Nukleazy są jednymi z najbardziej rozpowszechnionych enzymów w komórkach zarówno pro- jak i eukariotycznych. Są wśród nich takie, które nie

wykazują żadnej swoistości w stosunku do substratu, trawią zarówno DNA jak i RNA, niezależnie od ich struktury drugorzędowej, oraz takie, które odznaczają się precyzją w rozpoznawaniu określonej sekwencji kwasów nukleinowych. Ogromna różnorodność swoistości tych enzymów w stosunku do substratu spowodowała, że o nukleazach pisze się najczęściej jako o enzymach stanowiących cenne narzędzie w biologii molekularnej. Zastosowanie enzymów nukleolitycznych w biologii molekularnej było przedmiotem wielu opracowań monograficznych w ostatnich latach. Obok ściśle użytecznego znaczenia enzymów nukleolitycznych opisano również wiele procesów związanych z metabolizmem komórkowym kwasów nukleinowych regulowanym przez nukleazy [1, 2]. I tak, enzymy te uczestniczą w rekombinacji, przetwarzaniu i reperacji kwasów nukleinowych. Aktywnie uczestniczą w cyklu życiowym komórek i w syntezie nowego DNA. W literaturze opisano wiele przykładów niewątpliwego udziału endonukleaz prokariotycznych w inicjacji replikacji endogenego DNA [3–9]. Wielokrotnie wskazywano również na analogiczną funkcję endonukleaz w komórkach eukariotycznych. W większości jednak dostarczone dowody są pośrednie, opierają się na testach immunologicznych, na lokalizacji

¹ Dr, ² mgr, ³ prof., Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

endonukleaz lub na badaniach składu polipeptydowego aparatu replikacyjnego.

Niektóre endonukleazy z całą pewnością zlokalizowano w obszarach genomu zawierających miejsca startu replikacji [10, 11]. Stwierdzono, że kompleks replikacyjny zawiera w swoim składzie endonukleazy [12–15], oraz że kompleksy immunoglobuliny G antynukleaza hamują swoiście replikację DNA [16]. Wykazano ponadto, że w niektórych komórkach roślinnych poziom, aktywność i lokalizacja endonukleazy 32 kDa jest czułym parametrem odzwierciedlającym stan metaboliczny komórki. Enzym w odpowiedzi na traktowanie komórek fitohormonami migruje z nukleoplazmy do macierzy jądrowej, miejsca w którym inicjowana jest synteza nowego DNA [17, 18]. Zmieniają się przy tym właściwości enzymu od nieswoistej aktywności od wybiórczego nacinania DNA. Endonukleaza z *Crithidia fasciculata* swoiście rozpoznaje sekwencje ARS [11], sekwencje wykrywane również są w miejscach inicjacji replikacji w DNA wielu organizmów eukariotycznych. Powyższe właściwości endonukleaz wskazują na ich regulatorowy charakter, na możliwość ich aktywnego uczestnictwa w inicjacji replikacji DNA. Ostatecznego jednak rozwiązania tego zagadnienia dostarczyć mogą jedynie badania zależności pomiędzy ekspresją genu endonukleazy i inicjacją replikacji DNA.

W ostatnich latach przedstawiono sugestię o uczestnictwie endonukleaz również w programowanym obumieraniu komórek. Przedmiotem tego artykułu jest podsumowanie badań na ten temat.

II. Udział endonukleaz w programowanym obumieraniu komórek

Morfologicznie, zjawisko obumierania komórek sklasyfikowano na dwojaki rodzaj, a mianowicie nekrozy i apoptozy [19–22]. Generalnie, pojawienie się komórek nekrotycznych jest przypadkowe, spowodowane infekcją wirusami cytolitycznymi, uszkodzeniem przez komplement i zewnątrzkomórkowymi oraz wewnątrzkomórkowymi uszkodzeniami fizycznymi lub chemicznymi prowadzącymi do znacznego obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, zmian w przepuszczalności jonów lub utraty błonowych fosfolipidów. Komórki takie charakteryzują się wczesnymi zmianami w cytoplazmie; na przykład obserwuje się w nich pęcznienie mitochondriów i dispersję rybosomów. W przeciwieństwie do nekrozy, apoptoza (*apoptosis*) dotyczy pojedynczych komórek oraz ze względu na kinetykę procesu i sekwencję zmian zachodzących w komórce jest rozważana jako programowane obumieranie komórek. Najwcześniej obserwowanymi zmianami w komórkach apoptotycznych są kondensacja chromatyny jądrowej oraz fragmentacja błon jądrowych i plazmatycznych (*zeiosis*), zmiany patologiczne w organellach cytoplazmatycznych pojawiają się w późniejszym okresie.

Nieco mniej wiadomo na temat procesów biochemicznych, które odróżniają od siebie dwie wspomniane formy obumierających komórek. W komórkach nekrotycznych pęcznieniu mitochondriów towarzyszy utrata zdolności produkowania energii i w konsekwencji utrata zdolności do regulacji osmotycznej; w czasie tych zmian chromatyna jądrowa nie ulega większym zmianom. W przeciwieństwie do tego w komórkach apoptotycznych zmiany dotyczą przede wszystkim chromatyny, jak to stwierdzono w apoptotycznych tymocytach szczura obserwując jej fragmentację aż do nukleosomów (co z pewnością jest przyczyną śmierci i lizy komórek). Jest oczywiste, że degradację chromatyny katalizują enzymy endonukleolityczne. Większość dotychczas przebadanych czynników indukujących powstawanie komórek apoptotycznych powoduje fragmentację DNA. Jednym z najwcześniejszych objawów obumierania komórek po ich potraktowaniu glikokortykoidami, promieniowaniem jonizującym w niskich dawkach lub wirusami cytolitycznymi jest degradacja DNA [23]. Trawienie DNA może być pierwotnym lub wtórnym efektem działania tych czynników. Fragmentacja DNA może być wynikiem aktywacji nukleaz obecnych w komórce lub wzmożonej ekspresji genu nukleazy w określonym etapie obumierania komórek, jeżeli proces obumierania znajduje się pod kontrolą genetyczną, lub może być wynikiem uwolnienia enzymów nukleolitycznych z subfrakcji komórkowych w czasie ich destrukcji.

II - 1. Indukcja fragmentacji DNA przez glikokortykoidy, promieniowanie jonizujące, cytotoksyczne komórki T lub brak interleukiny-2

G l i k o k o r t y k o i d y. Stwierdzono, że mysie tymocyty, na które podziało glikokortykoidem (testosteron, hormon adrenokortykotropowy) w fizjologicznych stężeniach (0.1 do 1.0 μM) wykazują objawy obumierania w przedziale czasowym od 8 do 20 godzin. W czasie około 4 godzin od momentu podziałania glikokortykoidem chromatyna tych komórek ulega fragmentacji do odcinków około 200–600 par zasad. Degradację DNA udało się zahamować, oraz opóźnić bardzo znacznie proces obumierania komórek wtedy, gdy zahamowano syntezę RNA i białek przykładowo przez inkubację komórek z cykloheksimidem [24–26]. Aktywność endonukleolityczną odpowiedzialną za fragmentację DNA opisano po raz pierwszy w 1970 roku. Obecność enzymu wykazano w wielu tkankach. Enzym do swej optymalnej aktywności wymaga jonów wapnia i magnezu. Cynk jest silnym inhibitorem enzymu [25]. Aktywność endonukleazy jest wyższa wtedy, gdy substratem jest DNA o strukturze nukleosomowej niż DNA pozbawiony oktamerów histonowych. Enzym trawi DNA pomiędzy nukleosomami tak, że ostatecznym produktem trawienia chromatyny są pojedyncze nukleosomy [23].

Promieniowanie jonizujące. Promieniowanie jonizujące oraz cytotoksyczne czynniki przeciwnowotworowe znane są od dawna jako czynniki prowokujące obumieranie komórek. Oba wymienione czynniki powodują zmiany morfologiczne komórek, typowe dla komórek apoptotycznych [27, 28]. Limfocyty są najbardziej czułymi ze znanych komórek na promieniowanie jonizujące. Ponadto, w przeciwieństwie do innych komórek, które są najbardziej wrażliwe na promieniowanie wtedy gdy dzielą się aktywnie, limfocyty największą wrażliwością odznaczają się w interfazie. Wykazano, że obumieraniu tych komórek ekspozycyjnych na promieniowanie towarzyszy intensywna degradacja DNA. Zdziwiałym było, że tak niska dawka radiacji jak 5R, która nie powoduje prawie żadnych zmian w naświetlanych chromosomach jest wystarczająca do rozległej, intensywnej degradacji DNA w limfocytach i komórkach śledziony, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [29]. Produkty degradacji DNA są identyczne jak w przypadku komórek traktowanych glikokortykoidami. Stwierdzono, że fragmentację DNA hamuje cykloheksimid lub jony cynku. Pierwszy z czynników hamuje syntezę białka, drugi hamuje aktywność Ca^{2+} - Mg^{2+} - zależnej endonukleazy [23]. Z eksperymentów wyciągnięto wniosek o intensyfikacji syntezy endonukleazy jako najwcześniejszego etapu obumierania komórek, na które podziało promieniowaniem jonizującym.

Cytotoksyczne komórki T. Komórki stanowiące cel ataku cytotoksycznych komórek T (CTL) były przedmiotem wielu badań zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [30, 31]. Wyróżniono trzy fazy tego ataku, a mianowicie: rozpoznanie, programowanie obumierania i destrukcję komórek. W pierwszym etapie obserwuje się adhezję komórek T do komórek atakowanych, reakcja jest zależna od jonów wapnia oraz magnezu i jest wysoce swoista. Swoistość reakcji nadaje precyzyjne rozpoznawanie przez receptory komórek T miejsc antygenowych na komórkach atakowanych [32]. Drugi etap polega na wnikaniu wypustek komórek T do komórek atakowanych: wielokrotnie obserwowano wnikanie wypustek aż do jądra komórkowego. Jako efekty towarzyszące obserwowano kondensację chromatyny, kurczenie się komórek i fragmentację DNA. Trzeci etap jest niezależny od obecności komórek T. Podczas tego etapu komórki zaatakowane pęcznią, stają się przepuszczalne dla barwników przyżyciowych (np. eozylna 4), obserwuje się wycieki cytoplazmy.

Podobnie jak w przypadku glikokortykoidów jednym z wcześniejszych objawów obumierania komórek atakowanych jest fragmentacja ich DNA do pojedynczych i wielokrotnych nukleosomów. W przeciwieństwie jednak do apoptozy wywołanej przez hormony wprowadzenie czynników hamujących syntezę RNA i białka nie hamuje degradacji DNA [33]. Zdziwiałym było, że nie wykazano obecności endonukleazy

zależnej od jonów wapnia ani w jądrach komórek CTL ani komórek atakowanych. Zmieszanie obu rodzajów komórek powoduje niemal natychmiastową degradację DNA w komórkach atakowanych. Skąd pochodzi enzym odpowiedzialny za tę degradację? Wyczerpującej odpowiedzi na to pytanie brak, sugeruje się, że enzym może pochodzić z cytoplazmy komórek CTL i jest wstrzykiwany do komórki atakowanej w pierwszej fazie ataku. Inna sugestia przewiduje istnienie enzymu nieaktywnego w komórkach atakowanych, który aktywuje się po wprowadzeniu aktywatora dostarczanego przez komórki CTL [34, 35].

Wyczerpywanie się interleukiny-2. Cytotoksyczne komórki CTL wymagają do proliferacji hormonu wzrostowego — interleukiny-2 [36]. W nieobecności interleukiny-2 (IL-2) ta subpopulacja limfocytów T obumiera. Wielokrotnie obserwowano, że użyte do badań komórki szczególnie uzależnione od IL-2, a mianowicie CTLL-20 i HT-2 oraz komórki śledziony stymulowane konkanawaliną A obumierały po okresie 12 godzin od momentu usunięcia IL-2. Na wiele godzin przed obumieraniem zaobserwowano fragmentację genomu tych komórek. Degradację DNA daje się zahamować, a tym samym utrzymać przy życiu komórki w środowisku zawierającym niewielkie stężenie (5 μ g/ml) cykloheksimidu. Podobnie jak w poprzednich przypadkach sugeruje się, że przyczyną obumierania komórek jest aktywacja nukleazy lub jej synteza *de novo*. Jedynym odstępstwem jest, że nie udało się zahamować procesu obumierania przez włączenie do układów jonów cynku, hamujących skutecznie aktywność endonukleazy [23]. Okazało się, że użyte do badań komórki aktywnie usuwają ten jon ze swoich wewnętrznych struktur.

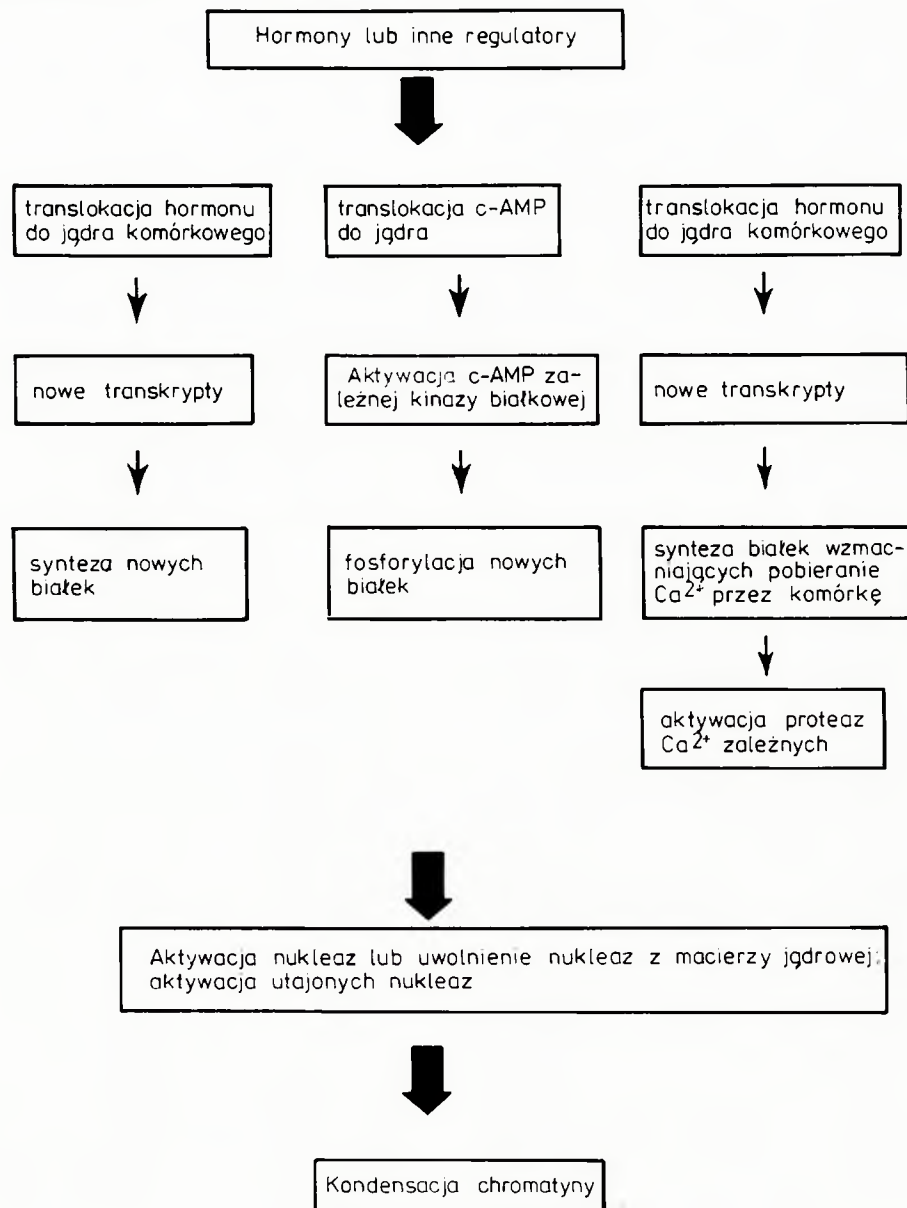
II - 2. Identyfikacja endonukleazy indukowanej przez hormony sterydowe

Liza komórek indukowana przez sterydy jest dobrze opracowanym przykładem kontrolowanego procesu obumierania komórek. Ta forma obumierania jest, jak się wydaje, inicjowana przez tkankowo- lub komórko- swoiste sygnały aktywujące procesy komórkowe, których kulminacyjnym punktem jest śmierć komórki. Najlepszymi komórkami do tego typu badań są komórki limfocytów, które podlegają tej formie obumierania po podziałaniu na nie glikokortykoidami. Dane z wielu laboratoriów wskazują, że degradacja genomu jest najwcześniejszym etapem lizy limfocytów, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [37-39, 24, 25]. Badania genetyczne wspierają ten wniosek i rozszerzają go o sugestię, że wywołana przez działanie sterydów śmierć komórek jest wynikiem ekspresji "genu lizy", którego produkt/-y/ odpowiedzialny jest za śmierć komórek [40]. Celem identyfikacji produktu/-ów/ genu analizowano białka jądrowe komórek tymocytów pod względem ich aktywności nukleolitycznej. Podziałanie na komórki glikokortykoidem objawiło

się indukcją syntezy w tych komórkach kilku białek: dubletu 30-32 kDa polipeptydów oraz 3-4 polipeptydów o masie cząsteczkowej 12-19 kDa. Białka te wykazują aktywność DNazową. Kinetyka indukcji tych nukleaz oraz analiza produktów ich działania na endogenny DNA pozwoliły na sformułowanie sugestii, że polipeptydy te są produktem genu/-ów/ litycznego [41].

Jony wapnia regulują aktywność endonukleazy. Wielokrotnie już podkreślano, że jedną z najwcześniej obserwowanych zmian w komórkach dotkniętych programowanym obumieraniem jest wzmożona aktywność zależnej od wapnia i magnezu endonukleazy [33, 42, 43]. Niedawno wykazano, że tymocyty, na które podziało glikokortykoidami odznaczają się również wzrostem stężenia jonów wapnia w cytosolu [44]. Udział wapnia w programowanym obumieraniu komórek najlepiej prześledzono badając tymocyty, na które podziało 2, 3, 7, 8-czterochlorodwubenzo-p-dioksyną (TCDD). Ten aromatyczny węglowodór stanowi pro-

dukt pośredni wielu procesów przemysłowych. Komórki traktowane TCDD wykazywały identyczne zmiany jak komórki, na które działano glikokortykoidami [45]. Tymocyty, na które podziało TCDD w stężeniach od 1 do 100 μM odznaczają się wzrostem cytoplazmatycznego stężenia Ca^{2+} , przy czym im większe stężenie użytego TCDD, tym większy obserwowany wzrost stężenia Ca^{2+} . Podziało na komórki cykloheksomidem, czynnikiem blokującym syntezę białka, a następnie TCDD nie prowadzi do podwyższenia zawartości Ca^{2+} w cytoplazmie. Dane te wskazują, że podobnie jak komórki poddane działaniu glikokortykoidów, komórki, na które zadziało TCDD wykazują wzrost zawartości wapnia i wzrost ten jest uzależniony od syntezy białka w tych komórkach. Zatem TCDD indukuje w tymocytach syntezę czynnika lub czynników białkowych odpowiedzialnych za ułatwienie wnikania pozakomórkowego wapnia do komórek [46]. Nie obserwowano degradacji DNA w komórkach tymocytów po podziało na nie TCDD w środowisku pozbawionym jonów wapnia [47, 48].



Ryc.1 Schemat przypuszczalnej drogi aktywacji endonukleaz w komórce w programowanym jej obumieraniu.

Sugeruje się następującą sekwencję zdarzeń towarzyszących kontrolowanemu obumieraniu komórek [46]: 1. Synteza czynników białkowych jako odpowiedź na czynniki środowiska (TCDD, glikokortykoidy itp.), 2. Wzrost zawartości Ca^{2+} w cytosolu jako konsekwencja syntezy czynników ułatwiających wnikanie tego jonu, 3. Aktywacja endonukleaz, 4. Fragmentacja genomu, 5. Dalsze zmiany biochemiczne i morfologiczne prowadzące do śmierci komórek.

II - 3. Podsumowanie

Podobnie jak w przypadku wielu procesów znanych w biologii komórki, również obumieranie komórek jest determinowane przez wewnątrzkomórkowe określone zmiany. Wśród obumierających komórek wyróżnia się komórki nekrotyczne, których obumieranie wydaje się być w dużej mierze przypadkowe, niekontrolowane oraz komórki apoptotyczne nazywane również komórkami z programem do obumierania, których destrukcja jest często spowodowana czynnikami fizjologicznymi oraz znajduje się pod kontrolą genetyczną. Komórki apoptotyczne budzące ze zrozumiałych względów największe zainteresowanie, charakteryzują się fragmentacją endogennej chromatyny jako najwcześniejszym etapem obumierania komórek. We wszystkich opisanych przypadkach apoptozy jony wapnia i magnezu są absolutnie konieczne. Proces degradacji DNA i lizy komórek jest hamowany przez czynniki hamujące syntezę RNA i białka (aktynomycyna D, cykloheksomid). Sugeruje się obecność "genów lizy" w genomie komórki, których ekspresja determinuje programowane obumieranie komórek (Ryc.1). Sądzi się, że produktami ekspresji tych genów są endonukleazy. Wykazano podwyższoną zawartość endonukleaz o masie cząsteczkowej 32 kDa i 18 kDa w komórkach znajdujących się we wczesnym etapie apoptozy. Niedawno zasugerowano nowy sposób aktywacji nukleaz, a mianowicie poprzez syntezę czynników białkowych zwiększających zawartość wapnia w komórce. Zatem aktywacja nukleaz może polegać raczej na dostarczeniu jonów aktywujących enzym niż na wzmożonej ekspresji genów endonukleaz. Ostatecznych danych dostarczyć może jedynie wyizolowanie tych genów.

Pozagenetyczny sposób regulacji poziomu aktywności endonukleolitycznej w komórkach apoptotycznych wydaje się bardziej przekonujący, jeżeli wziąć pod uwagę wyniki eksperymentów na komórkach roślinnych opisanych w podrozdziale I. Wykazano, że komórki stymulowane do wzrostu fitohormonami odznaczają się wzmożoną translokacją endonukleazy 32 kDa z nukleoplazmy do macierzy jądrowej, przy czym zmienia się z nieswoistego na swoisty sposób działania enzymu, proces ten jest odwracalny. Wydaje się wysoce prawdopodobnym, że w komórkach apoptotycznych następuje uwolnienie endonukleazy z macierzy jądrowej zdolnej następnie do degradacji endogennej chromatyny. Również degradacja niektó-

rych polipeptydów może prowadzić do ujawnienia ukrytej aktywności nukleolitycznej. Zjawisko takie obserwowano podczas degradacji dużej podjednostki (190 kDa) DNA-zależnej RNA polimerazy I w komórkach limfocytów T i B [49]. Produktem degradacji były trzy endonukleazy o masach cząsteczkowych od 14 do 18 kDa.

Z powyższego wynika, że zwiększona aktywność nukleaz w komórkach obumierających jest wynikiem raczej ich aktywacji, uwolnienia z substruktur komórkowych lub ujawnienia się aktywności kryptycznej niż wzmożonej ekspresji genów endonukleaz.

Artykuł otrzymano 7 sierpnia 1989 r.

Zaakceptowano do druku 19 września 1990 r.

III. Piśmiennictwo

1. Brown D.R., Hurwitz J., Reinberg D., Zipursky S.L., (1982), w *Nucleases* (red. Linn S.M., Roberts R.J.), str. 187-209 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
2. Boulikas T., (1987), *Int. Rev. Cytol.*, Supl. 17, 599-684.
3. Heidekamp F., Baas P.D., Jansz H.S., (1982), *J. Virol.*, 42, 91-99.
4. Eisenberg S., Ascarelli R., (1981), *Nucleic Acids Res.*, 9, 1991-2001.
5. Langeveld S.A., van Mansfeld A.D.M., van der Ende A., van de Pal J.H., van Arkel G.A., Weisbeck P.J., (1981), *Nucleic Acids Res.*, 9, 545-556.
6. van der Ende A., Langeveld S.A., Teertstra R., van Arkel G.A., Weisbeck P.J., (1981), *Nucleic Acids Res.*, 9, 2037-2051.
7. Meyer T.F., Baumell, Geider K., Bedinger P., (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 5810-5813.
8. Francke B., Garret D., (1982), *Virology*, 116, 116-127.
9. Chenet-Monte C., Mohammad E., Celluzzi C.M., Schaffer P.A., Farber F.E., (1986), *Virus Res.*, 6, 245-260.
10. Linial M., Shlomai J., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 290-297.
11. Linial M., Shlomai J., (1988), *Nucleic Acids Res.*, 16, 6477-6492.
12. Hafner J., Mohammad F., Farber F.E. (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, 910, 72-84.
13. Hafner J., Mohammad F., Farber F.E. (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, 910, 85-88.
14. Littler E., Purifoy D.J.M., Minson A., Powell K.I., (1983), *J. Gen. Virol.*, 64, 893-896.
15. Giles M.G., Rennie P.S., Bruchovsky N., (1986), *Molec. Cell. Endocrinol.*, 45, 167-173.
16. Rzepecki R., Bułaj G., Szopa J., (1989), *J. Plant. Physiol.*, 134, 364-369.
17. Wiśniowska J., Rudnicki K., Szopa J., (1987), *J. Plant. Physiol.*, 129, 407-413.
18. Rudnicki K., Rzepecki R., Szopa J., (1988), *J. Plant. Physiol.*, 132, 658-663.
19. Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R., (1980), *Int. Rev. Cytol.*, 6, 251-306.
20. Wyllie A.H., (1981), w *Cell Death in Biology and Pathology*, (red. Bowen I.D., Lockshin R.A.), str 9-34, Chapman and Hall, London.
21. Searle J., Kerr J.F.R., Bishop C.J., (1982), *Pathol. Annu.*, 17, 229-259.
22. Wyllie A.H., Duvall E., Blow J.J., (1984), w *Cell Ageing and Cell Death*, (red. Davies I., Sigeo D.C.), 269-294, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
23. Cohen J.J., Duke R.C., Chervenak R., Sellins K.S., Olson L.K., (1985), w *Mechanism of Cell-mediated Cytotoxicity II*, (red. Henkart P., Martz E.), Plenum Publ. Co. New York.
24. Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L., Dunlop D., (1984), *J. Pathol.*, 142, 67-77.

25. Cohen J.J., Duke R.C., (1984), *J. Immunol.*, **132**, 38-42.
26. Wyllie A.H., (1985), *Anticancer Res.*, **5**, 131-136.
27. Kerr J.F.R., Searle J., (1980), w *Radiation Biology in Cancer Research*, (red. Meyn R.E., Withers H.R.), Raven, New York.
28. Wyllie A.H., (1987), *Int. Rev. Cytol.*, Supl. **17**, 755-785.
29. Sellins K.S., Cohen J.J., (1984), *Fed. Proc.*, **43**, 1640-1641.
30. Sanderson C.J., (1981), *Biol. Rev.*, **56**, 153-197.
31. Russell J.H., (1983), *Immunol. Rev.*, **72**, 97-118.
32. Meuer S.C., Acuto O., Hercend T., Schlossman S.F., Reinherz E.L., (1984), *Annu. Rev. Immunol.*, **2**, 23-50.
33. Duke Z.C., Chervenak R., Cohen J.J., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 6361-6365.
34. Dennert B., Podack E.R., (1983), *J. Exp. Med.*, **157**, 1483.
35. Milliard P.J., Henkart M.P., Reynolds C.W., Henkart P.A., (1984), *J. Immunol.*, **132**, 3137-3141.
36. Cohen J.J., Fairchild S.S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 6587-6590.
37. Compton M.M., Cidlowski J.A., (1986), *Endocrinology*, **11**, 38-45.
38. Vedeckis W.V., Bradshaw H.D., (1983), *Mol. Cell. Endocr.*, **30**, 215-227.
39. Vanderbilt J.N., Bloom K.S., Anderson J.S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13009-13017.
40. Bourgeois S., Newby R.F., Huet M., (1978), *Cancer Res.*, **28**, 4279-4284.
41. Compton M.M., Cidlowski J.A., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 8288-8292.
42. Duke R.C., Cohen J.J., Chervenak R., (1986), *J. Immunol.*, **137**, 1442-1447.
43. Ucker D.S., (1987), *Nature, (Lond.)*, **327**, 62-63.
44. Orrenias S., McConkey D.J., Nicotera P., (1988), w *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, (red. Ceruti P., Friedovich I.).
45. Ceredig L.R., Dialynas D.P., Fitch F., McDonald H.R., (1983), *J. Exp. Med.*, **158**, 1654-1671.
46. McConkey D.J., Hartzell P., Duddy S.K., Hakansson H., Orrenius S., (1988), *Science*, **242**, 256-259.
47. Ostergaard H.L., Kane K.P., Mescher M.F., Clark W.F., (1987), *Nature, (Lond.)*, **330**, 71-72.
48. Trenn G., Takayama H., Sitkovsky M.V., (1987), *Nature, (Lond.)*, **330**, 72-73.
49. Szopa J., Rose K.M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **262**, 9022-9028.

Oddziaływanie restrykcyjnej endonukleazy Eco RI i DNA

Interactions between Eco RI restriction endonuclease and DNA

MARIA KOZIOŁKIEWICZ¹

Spis treści:

- I. Specyficzne oddziaływania białek i DNA
- II. Endonukleaza Eco RI
 - II-1. Aktywność Eco RI*
 - II-2. Oddziaływania białka Eco RI i DNA
 - II-3. Zastosowanie syntetycznych oligonukleotydów w badaniach mechanizmu działania endonukleazy Eco RI
 - II-4. Analiza rentgenostrukturalna kompleksu endonukleaza Eco RI — DNA

Contens:

- I. Specific interactions between proteins and DNA
- II. Eco RI endonuclease
 - II-1. Eco RI* activity
 - II-2. Contact-points between Eco RI protein and DNA
 - II-3. Application of synthetic oligonucleotides in the studies on the mechanism of Eco RI endonuclease action
 - II-4. X-Ray studies on the Eco RI endonuclease — DNA complex

Wykaz stosowanych skrótów

N, N' — deoksynukleotydy; (*) — oznacza obniżoną specyficzność enzymu restrykcyjnego wobec substratu.

I. Specyficzne oddziaływania białek i DNA

Przedmiotem szczególnego zainteresowania stały się w ostatnich latach mechanizmy specyficznego i niespecyficznego rozpoznawania DNA przez różnorodne białka strukturalne, enzymatyczne bądź regulatorowe [1]. Podstawą niespecyficznego interakcji białek i DNA są elektrostatyczne oddziaływania dodatnio naładowanych łańcuchów bocznych i ujemnie naładowanych reszt fosforanowych kwasu nukleinowego. Są to oddziaływania niezależne od sekwencji nukleotydowej.

Natomiast oddziaływania określane jako specyficzne zależą od sekwencji nukleotydowej rozpoznawanych fragmentów DNA, jak również od struktury I-rzędowej rozpoznających je białek. Decydującą rolę w procesie specyficznego rozpoznawania odgrywają wiązania wodorowe. Szczególny układ akceptorów i donorów protonu wynikający z określonej sekwencji nukleotydów w DNA jest rozpoznawany przez komplementarny układ donorów i akceptorów utworzony przez elementy struktury białka.

¹ Dr. Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

Badania nad specyficznym rozpoznawaniem przez pewne białka określonych sekwencji nukleotydowych podjęto już w połowie lat 70-tych, aczkolwiek znajomość struktury owych białek była wówczas znikoma. Do znaczących opracowań należy opublikowana w 1976 r. praca Seemana i współautorów, którzy przeanalizowali układ donorów i akceptorów protonu w 4 możliwych parach zasad (G-C, C-G, A-T, T-A), po to, aby wykazać, iż bezbłędna identyfikacja przez białko określonej pary zasad jest możliwa tylko wówczas, gdy pomiędzy nią, a białkiem zaistnieje więcej niż jedno wiązanie wodorowe [2]. Obecność większości donorów i akceptorów w dużej bruzdzie DNA sugerowała, iż właśnie ten region DNA jest miejscem kontaktu z białkiem. Tego rodzaju mechanizm rozpoznawania został określony mianem „odczytu bezpośredniego”.

Wybitną specyficzność w rozpoznawaniu określonych sekwencji nukleotydowych wykazują m.in. białka represorowe regulujące proces transkrypcji. Pod koniec lat 70-tych szczegółowo opisano np. oddziaływanie z DNA takich białek jak: białko CAP (*catabolite activator protein* [3,4], represory *cro* i λ bakteriofaga λ [5,6] oraz represor faga 434 [7,8].

Wyniki badań nad mechanizmem działania represora *trp* wykazują, iż w tym wypadku powstanie kompleksu represor-operator wymaga utworzenia aż 30 wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów i resztkami fosforanowymi w DNA [10,11]. Nie stwierdzono natomiast wiązań wodorowych pomiędzy białkiem i zasadami w DNA, jak również oddziaływań o charakterze hydrofobowym. Warunkiem specyficznego rozpoznawania sekwencji operatorowej przez represor *trp* jest prawdopodobnie odpowiednia konformacja jej szkieletu fosforano-cukrowego, uwarunkowana z kolei sekwencją zasad. Powstanie kompleksu represor-operator *trp* określa się jako odczyt pośredni [9,10], w przeciwieństwie do opisanego wyżej odczytu bezpośredniego.

II. Endonukleaza Eco RI

W ostatnich latach przedmiotem zainteresowania biologów molekularnych zajmujących się badaniem oddziaływań białek i kwasów nukleinowych stały się enzymy restrykcyjne odznaczające się, tak jak białka regulatorowe, wybitną specyficznością rozpoznawania określonych fragmentów DNA [11]. Znaczne różnicowanie takich właściwości enzymów restrykcyjnych jak: masa cząsteczkowa, ilość podjednostek, konieczne kofaktory oraz mechanizm działania wymagało ich klasyfikacji. Spośród znanych obecnie trzech typów tych enzymów najbardziej interesujące ze względu na charakter oddziaływań z DNA są enzymy typu II. Mechanizm ich funkcjonowania jest jednak znacznie bardziej skomplikowany, niż mechanizm działania białek regulatorowych ponieważ nie tylko rozpoznają określone fragmenty DNA, ale dokonują

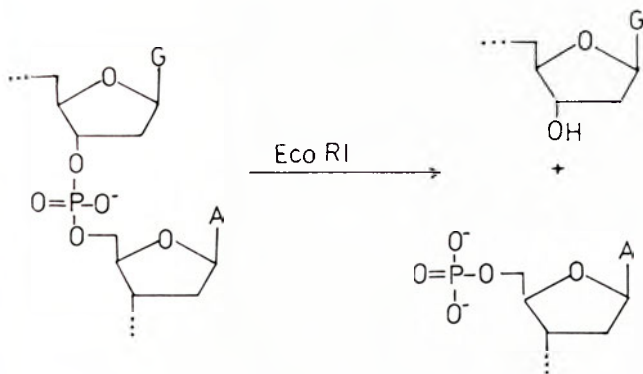
również ich degradacji. Pomimo odkrycia kilkuset enzymów restrykcyjnych typu II [12,13] stosunkowo dobrze poznano mechanizm działania tylko jednego z nich, mianowicie endonukleazy Eco RI. Poniżej zostały zaprezentowane wyniki badań prowadzonych nad mechanizmem jej działania za pomocą różnorodnych metod badawczych, nie wyłączając analizy rentgenostrukturalnej, w kolejnym zaś artykule opisano wyniki uzyskane dzięki użyciu syntetycznej oligonukleotydów modyfikowanych w obrębie szkieletu fosforano-cukrowego.

Enzymy restrykcyjne typu II są to stosunkowo małe białka o masie cząsteczkowej 20-70 kDa. Formą aktywną biologicznie są zwykle dimery, czasami - monomery. Jedynym kofaktorem niezbędnym dla ich działania są jony Mg^{2+} . Najistotniejszą cechą endonukleaz typu II jest zdolność hydrolizy specyficznie rozpoznawanego wiązania internukleotydowego znajdującego się w obrębie unikalnej sekwencji nukleotydów zwanej „sekwencją kanoniczną”. Wykazano, że restryktazy rozpoznają na ogół dwuniciowe 4- lub 6-nukleotydowe sekwencje DNA o podwójnej symetrii rotacyjnej. Są to sekwencje zasad, w których komplementarne zasady (A i T oraz G i C) są ułożone wzajemnie symetrycznie (palindromowo) względem osi. W wyniku hydrolizy wiązań internukleotydowych powstają fragmenty DNA z wolną grupą hydroksylową na końcu 3' oraz fragmenty z resztą fosforanową na końcu 5'. Ponieważ hydrolizie ulegają na ogół wiązania nie leżące na przeciwko sobie, fragmenty DNA powstające w wyniku działania enzymów mają oligonukleotydowe jednoniciowe zakończenia (tzw. lepkie końce). Istnieją jednakże i takie enzymy, które degradują w obu niciach DNA wiązania internukleotydowe leżące na przeciwko sobie, dając w ten sposób tzw. tępe końce [2,13].

Jak dotychczas, najlepiej poznana endonukleaza typu II jest restrykcyjna endonukleaza Eco RI. W 1972 roku została ona wyizolowana przez Hedgpetha i współautorów z komórek *E. coli* należących do szczepu RY13 [14]. Ustalono wówczas, iż enzym ten rozpoznaje następującą sekwencję kanoniczną:



i hydrolizuje wiązanie internukleotydowe pomiędzy deoksyguanozyną i deoksyadenozyną tworząc fragment $\dots G$ z wolną grupą hydroksylową na końcu 3' oraz fragment $p\text{AATTC} \dots$ z resztą fosforanową na końcu 5' (Ryc. 1). Masa cząsteczkowa pojedynczego łańcucha polipeptydowego restryktazy Eco RI, złożonego z 277 aminokwasów wynosi ok. 31.000 [15,16], jednakże w roztworze enzym występuje jako dimer lub tetramer. Fakt, iż w roztworze o stężeniu enzymu $10^{-10}M$ (stężenie katalityczne) stabilną formą jest dimer, wskazuje, iż właśnie ta postać enzymu wykazuje aktywność biologiczną.



Ryc. 1. Hydroliza wiązania internukleotydu katalizowana przez restrykcyjną endonukleazę Eco RI.

II-1. Aktywność Eco RI*

Zjawiskiem, które w pewnym stopniu przyczyniło się do wyjaśnienia mechanizmu powstawania kompleksu endonukleaza Eco RI — DNA stała się tzw. aktywność Eco RI*. Taki zapis zastosowali po raz pierwszy w 1975 r. Polisky i współautorzy na oznaczenie zaobserwowanej wówczas obniżonej specyficzności rozpoznawania sekwencji kanonicznej [17] przez restryktazę Eco RI. Specyficzność rozpoznawania zależy w dużym stopniu od warunków, w jakich zachodzi katalizowana przez endonukleazę reakcja. W buforze o składzie: 100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (pH 7.6) enzym rozpoznaje kanoniczną sekwencję GAATTC. Jednakże obniżenie siły jonowej rozworu poprzez zastosowanie buforu o składzie: 25 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂ oraz podwyższenie pH do wartości 8.5 zmienia specyficzność enzymu i sprawia, iż rozpoznaje on sekwencję tetranukleotydu NAATTN'. W trakcie badań nad aktywnością Eco RI* okazało się, iż obniżoną specyficzność rozpoznawania wywołują również obecne w buforze glicerol (40-50%), dimetylosulfotlenek, dimetyloformamid (1-6%) oraz wprowadzone zamiast jonów magnezu jony Mn²⁺ (100-150 μM). Dla zbadania aktywności Eco RI* Polisky i współautorzy zastosowali jako substrat plazmid pVH51 (M.c. 2.1x10⁶). Ponieważ posiada on jedno miejsce rozpoznawane przez Eco RI, trawienie w warunkach standardowych powoduje przekształcenie formy kolistej DNA w formę liniową, która charakteryzuje się mniejszą ruchliwością elektrostatyczną w żelu agarozowym, podczas gdy w warunkach wywołujących zredukowaną specyficzność enzymu plazmid pVH51 ulega degradacji z utworzeniem 6-8 fragmentów. Ilość tych fragmentów była różna w zależności od czasu inkubacji. Mogło to świadczyć o pewnych preferencjach enzymu wobec zasad N i N'. Istotnie, zasadą N w sekwencji NAATTN' była głównie guanina (60%); w znacznie mniejszym stopniu adenina (26%), tymina (14%) oraz cytozyna (jedynie 0,5%). Mimo obniżenia specyficzności enzymu miejscem hydrolizowanym z największą szybkością pozostała sekwencja kanoniczna. Szybkość hydrolizy heksameru GAATTC była bo-

wiem o 1-2 rzędy wielkości większa, niż szybkość degradacji którejkolwiek innej sekwencji NAATTN' [17]. W zespole von Hippel'da [18] zastosowano jako substrat dwuniciową (replikatywną) formę DNA faga øX174 nie zawierającą sekwencji kanonicznej Eco RI. Mimo to, w warunkach powodujących redukcję specyficzności rozpoznawania, w DNA pojawiło się 5 miejsc wrażliwych na działanie endonukleazy Eco RI. Również w tym wypadku zaobserwowano, że podatność na działanie enzymu Eco RI* zależy od rodzaju zasad N i N'. Co więcej, stwierdzono, iż enzym degraduje DNA także w miejscach o sekwencji innej niż NAATTN', np. NN'ATTT gdzie N=N'=G. Hipoteza, iż aktywność Eco RI* jest związana z obecnością innego enzymu restrykcyjnego będącego zanieczyszczeniem preparatu endonukleazy Eco RI [19] została wkrótce odrzucona. Okazało się bowiem, że wskutek opisanych powyżej zmian składu buforu obniżeniu ulega specyficzność rozpoznawania właściwej sekwencji przez takie enzymy jak Bam HI [20], Bst I [21], Bsu I [22], Hha I i Hind III. W odpowiednich warunkach aktywność Eco RI* wykazują ponadto preparaty endonukleazy o takim stopniu czystości, który umożliwia ich krystalizację. Należało przyjąć, iż aktywność (*) jest wywołana zmianą środowiska, w którym odbywa się reakcja katalizowana przez enzym restrykcyjny. Mechanizm tych zmian nie został jednak wyjaśniony. Można przypuszczać, że w warunkach niestandardowych może następować zmiana konformacji zarówno białka jak i DNA. Nie wykluczone jest, że wskutek takich zmian zwiększa się elastyczność struktur zaangażowanych w bezpośrednie oddziaływanie białko-DNA. Konsekwencją tej niestabilności może być zwiększony dostęp cząsteczek wody i ich udział w tworzeniu wiązań wodorowych zarówno z DNA jak i z białkiem. Jakkolwiek nie udało się wyjaśnić mechanizmu generującego aktywność (*, (szczególnie aktywność Eco RI*), to badania nad obniżoną specyficznością rozpoznawania przeprowadzone przez J. Rosenberga i P. Greene przyniosły wiele nowych informacji na temat powstawania kompleksu Eco RI—DNA [23]. Wykorzystali oni rezultaty wcześniejszych prac na temat aktywności Eco RI* oraz szybkości hydrolizy wiązania internukleotydu w miejscach innych niż sekwencja kanoniczna [24,25]. Pozwoliło to na opracowanie prezentowanej poniżej tabeli hierarchii podstawień, w której uszeregowano 6-nukleotydu sekwencje (różne od sekwencji kanonicznej Eco RI) w zależności od szybkości, z jaką są one hydrolizowane przez endonukleazę Eco RI w warunkach obniżonej specyficzności (*).

5' G A A T T C 3' +1 +2 +3 +4 +5 +6	Hierarchia podstawień
N1	G >> A > T >> C
N2	A >> [G, C] >> T
N3	A >> [G, C] >> T
N4	T >> [C, G] >> A
N5	T >> [C, G] >> A
N6	C >> T > A > G

N1, N2... itd. oznaczają kolejne nukleotydy sekwencji kanonicznej, natomiast „hierarchia podstawień” oznacza względne prawdopodobieństwo hydrolizy fragmentów różniących się od sekwencji kanonicznej jednym nukleotydem (podstawionym w jednej z pozycji od N1 do N6). Zdaniem Rosenberga i Greene różna szybkość hydrolizy odzwierciedla zmiany w procesie rozpoznawania wywołane obecnością w określonej pozycji nukleotydu innego niż w sekwencji kanonicznej.

W 1976 r. Seeman i współautorzy [2] zwrócili uwagę, iż warunkiem bezbłędного rozpoznania przez białko określonej pary zasad w DNA jest utworzenie między tymi komponentami przynajmniej dwóch wiązań wodorowych (Ryc.2). Utworzenie tylko jednego wiązania nie gwarantuje wyboru właściwej zasady. Dla przykładu: o prawidłowym rozpoznaniu guaniny decydują należące do pierścienia purynowego atomy tlenu O6 i azotu N7 skierowane do dużej bruzdy DNA i pełniące funkcję akceptorów protonu. Taki układ jest charakterystyczny tylko dla guaniny, ale obecność atomu azotu N7 jest cechą wspólną guaniny i adeniny, natomiast położenie atomu O6 w dużej bruzdzie jest podobne do tego, które zajmuje atom O4 tyminy. Toteż tworzenie przez białko tylko pojedynczego wiązania wodorowego z udziałem azotu N7 zasady uniemożliwiłoby rozróżnienie adeniny i guaniny; w przypadku tworzenia pojedynczego wiązania z udziałem tlenu O6 lub O4 nie byłoby również możliwe odróżnienie przez białko guaniny i tyminy. Tę niejednoznaczność albo degenerację systemu rozpoznawania par zasad możliwą w przypadku tworzenia pojedynczych wiązań wodorowych między białkiem i zasadami azotowymi przedstawia tabela 1.

W zależności od tego, czy odpowiadające sobie atomy mają takie samo położenie (jak w przypadku atomu N7 guaniny i adeniny), czy tylko podobne (np. atomy tlenu — O6 guaniny i O4 tyminy), degeneracja może mieć dwojaki charakter. W cytowanej pracy określono je odpowiednio jako „hard” i „soft”. Rosenberg i Greene założyli, iż w warunkach standardowych endonukleaza Eco RI tworzy dwa wiązania wodorowe z każdą z 6 par zasad wchodzących w skład sekwencji kanonicznej. Natomiast w warunkach generujących aktywność Eco RI* zmieniają się w nieznanym sposobie właściwości białka i to powoduje utratę możliwości tworzenia przez nie jednego lub kilku spośród 12 wiązań wodorowych, a tym samym zmniejsza się specyficzność rozpoznawania substratu. Odzwierciedleniem utraty kolejnych wiązań wodorowych, jest malejąca specyficzność rozpoznawania oraz malejąca szybkość hydrolizy miejsc różnych od sekwencji kanonicznej. Dla przykładu: hierarchia podstawień w pozycji +1 jest następująca: G » A > T » C. W warunkach standardowych endonukleaza tworzy dwa wiązania wodorowe z guanini-

Tabela 1

Niejednoznaczność (degeneracja) systemu rozpoznawania wywołana powstawaniem pojedynczych wiązań wodorowych pomiędzy białkiem i zasadami azotowymi

Symbol degeneracji*	Symbol degeneracji w nici komplementarnej	Typ	Bruzda	Atomy zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych
A i G Pu	Py	Hard	Duża	N7 (puryna)
T i C Py	Pu	Hard	Duża	N7 (puryna)
A i C Ac	Gt	Soft	Duża	N6(A) i N4(C) lub O4(T) i O6(G)
G i T Gt	Ac	Soft	Duża	O4(T) i O6(G) lub N6(A) i N4(C)
A i T At	At	Hard	Mała	N3(A) i O2(T)
G i C Gc	Gc	Soft	Mała	N2(G)

* - oznacza zasadę w nici komplementarnej

* Brak możliwości „rozdzielania” przez białko dwóch zasad np. A i G lub T i C został symbolicznie oznaczony jako, odpowiednio degeneracja Pu (puryny) i degeneracja Py (pirymidyny). Brak możliwości rozróżnienia dwóch zasad w jednej nici powoduje w konsekwencji brak możliwości rozróżnienia zasad do nich komplementarnych w drugiej nici, stąd degeneracje w nici komplementarnej zostały oznaczone jako, odpowiednio, Py i Pu.

ną, w czym biorą udział atomy O6 i N7. Jednak w warunkach generujących aktywność (*) białko traci możliwość tworzenia wiązania wodorowego z atomem O6 lub N7, a tym samym traci możliwość odróżnienia odpowiednio guaniny i adeniny oraz guaniny i tyminy. Czwarte miejsce, jakie przypada w przedstawionej hierarchii cytozynie wynika z faktu, iż sekwencje, w których zajmuje ona pozycję +1 są substratem enzymu Eco RI* tylko wówczas, gdy całkowicie traci on zdolność tworzenia wiązań wodorowych z zasadą znajdującą się w pozycji +1. Niewielka preferencja, jaką enzym Eco RI* wykazuje w stosunku do adeniny (w porównaniu z tyminą), jest prawdopodobnie wywołana efektem sterycznym grupy metylowej tyminy, która to grupa jest skierowana ku dużej bruzdzie DNA i znajduje się w pozycji analogicznej z tą, jaką zajmuje atom N7 guaniny. Jest to prawdopodobnie dodatkowy czynnik, który utrudnia interakcje białka z tyminą w pozycji +1. Hierarchie podstawień w pozycjach +2 i +3 są również wynikiem utraty przez białko zdolności tworzenia jednego lub dwóch wiązań wodorowych z zasadami zajmującymi te pozycje. Zamiast dwóch wiązań wodorowych powstających przy udziale atomów N6 i N7 adeniny, białko może tworzyć jedno wiązanie z atomem N6 adeniny lub N4 cytozyny (degeneracja Ac) albo z atomem N7 adeniny lub guaniny (degeneracja Pu).

Leksykon nowych terminów biochemicznych

opracowała Janina Kwiatkowska-Korczak

Pierwszą część leksykonu zamieszczono w „Postęпах Biochemii” tom 36, nr 3-4 (1990). Definicje haseł noszą niejednokrotnie charakter roboczy, wydaje się jednak pożyteczne podanie ich w takiej formie z możliwością powtórnego ogłoszenia hasła po uzyskaniu pełniejszej informacji. Zachęcamy czytelników do uzupełniania naszego leksykonu hasłami z własnej dziedziny badań.

mezosekretyna (*mesosecretin*), glikoproteina o M_r około 46 000, wydzielana przez hodowle komórek ludzkich, wywodzących się z mezodermy oraz nabłonkowych (Rheinwald J-G. et al., *J.Cell.Biol.*, 1987, 104 (263-275).

micRNA blokujący mRNA komplementarny RNA (*mRNA-interfering complementary RNA*), także: anty-mRNA, nowy rodzaj RNA, który reguluje ekspresję genów. Hamuje translację, hybrydując z mRNA (Mizuno T. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1984, 81, 1966-1970).

mikrowilina (*microvillin*), nieufosforylowane i pozabawione reszt cukrowych białko o M_r 200 kDa, występuje w mikrokosmkach komórek gruczołu mlecznego szczurów (Allen R. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1984, 81, 5459-5463).

mini-ekson (*miniexon*), mały ekson, jak np. w genie troponiny T (Hedford R.M. et al., *Cell*, 1984, 38, 409-421).

mitochondrialny plazmidowy DNA (*mitochondrial plasmid DNA*), odrębna klasa elementów genowych, znalezionych w niektórych dzikich szczepach *Neurospora*, a nie wykazujących homologii sekwencyjnej ze standardowym mtDNA, badanej za pomocą doświadczalnej hybrydyzacji DNA. Osiąga dużą liczbę kopii, nie okazuje supresyjnych zachowań względem dzikiego mtDNA (Nargang et al., *J.Biol.Chem.*, 1983, 258, 4257-4269).

moduł (*module*), zwarty region cząsteczki polipeptydu, o długości 20-50 reszt aminokwasowych, oznaczany na mapie odległości węgli α . Różni się od domeny, której długość może wynosić 100 i więcej reszt. Podczas gdy domeny mają jedynie ograniczony kontakt wzajemny, sąsiednie moduły mogą mieć rozległe powierzchnie kontaktu między sobą. Domena może składać się z kilku modułów (Levin R., *Science*, 1982, 217, 921-922).

monenzyna (*monensin*), jednowartościowy, kationowy jonofor, hamuje transport pęcherzyków błonowych

z aparatu Golgi'ego do błony cytoplazmatycznej w komórkach eukariotycznych. W komórkach traktowanych monenzyną obserwuje się blokowanie wydzielania rozpuszczalnych białek i upośledzenie transportu białek do błon. Monenzyna hamuje też recykлизację receptorów LDL w fibroblastach. (Whittaker J. et al., *Biochem.J.*, 1986, 234, 463-468).

morficeptyna (*morphiceptin*), amid tetrapeptydu (Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂), stanowiący fragment β -kazeiny mleka. Jest agonistą receptorów opiatowych, blokowanych przez nolokson. Stanowi N-terminalny peptyd β -Kazomorfiny heptapeptydu otrzymanego z peptonowego produktu trawienia β -kazeiny (Chan K.J. et al., *J.Biol. Chem.*, 1985, 260, 9706-9712).

MPP, przetwarzające białko macierzy (*matrix processing protein*), białko o M_r około 57 000, występuje w macierzy mitochondrialnej (*Neurospora crassa*), katalizuje przetwarzanie białek prekursorowych, kodowanych w jądrze i transportowanych do mitochondrium. Współdziała z nim PEP (białko wzmagające przetwarzanie, Processing Enhancing Protein) białko o M_r 52000. (Hawlitschek G. et al., *Cell*, 1988, 53, 795-806).

MSEL-neurofizyna (*MSEL-neurophysin*), /synonim: neurofizyna II/, białko zasocjowane z hormonem neuroprzysadkowym. Odmiana ludzka składa się z 93 reszt aminokwasowych, zawiera metioninę w pozycji 2, serynę w pozycji 3, kwas glutaminowy w pozycji 6 i leucynę w pozycji 7 (Chauvet M.T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 2839-2843).

N

nefrokalcyna (*nephrocalcine*), kwaśna glikoproteina moczu ssaków (w tym ludzi), zawiera kwas γ -karboksylol glutaminowy. Silnie hamuje tworzenie się kryształów szczawianu. Macierz organiczna szczawianowych kamieni moczowych oraz mocz ludzi, u których te kamienie występują zawiera zmodyfikowaną nefrokalcynę, w której brak jest kwasu γ -karboksylol glutaminowego.

minowego (Nakagawa Y. et al., *J. Clin. Invest.*, 1987, 79, 1782-1787).

neksyna (*nexin*), białko wydzielone z fibroblastów wiążące proteazy. Kowalencyjnie wiąże urykaze i inne proteazy serynowe. Ma wysokie powinowactwo do heparyny (Scott R.W. et al., *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 4397-4403).

neplanomycyna A (*neplanomycin A*), cyklopentenylowy analog adenozy, naturalny antybiotyk, hamujący aktywność hydrolazy S-adenozynohomocysteino-wej i namnażanie wirusa krowianki (Borchardt R.T. et al., *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 4353-4358).

neuromedyna C (*neuromedin C*), dekapeptyd o sekwencji identycznej z C-końcowym peptydem Peptydu Uwalniającego Gastrynę (*Gastrin Releasing Peptide*). Wydzielono ją z rdzenia kręgowego świni (Minamino N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 119, 14-20).

neuromedyna N (*neuromedin N*), heksapeptyd wydzielony z rdzenia kręgowego świni. Jej C-końcowy tetrapeptyd jest identyczny z występującym w neurotensynie (Minamino N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 119, 14-20).

neuropeptyd Y (*neuropeptide Y*), synonim: neuropeptydotyrozyna, (*neuropeptide tyrosine*), peptyd składający się z 36 reszt aminokwasowych, wydzielony z mózgu świni, homologiczny z trzustkowym polipeptydem i peptydem YY (Gu J. et al., *Lancet*, 1983, 1, 1008-1010).

nidogen (*nidogen*), samoregulująca się glikoproteina błon podstawnych, zawiera około 1% węglowodanów w postaci N- lub O-związanych łańcuchów sacharydowych. Wydzielono ją z błon podstawnych nowotworu myszy. Stanowi 2-3% białka całkowitego tych błon (Timpl R. et al., *Eur. J. Biochem.*, 1983, 137, 455-465).

niukleolina (*nucleolin*), główne białko jąderka, ulegające fosforylacji, występuje w asocjacji z chromatyną wewnątrzjąderkową i cząstkami prerybosomalnymi. Wydedukowano, że sekwencja aminokwasowa zawiera 713 reszt. Nukleolina odgrywa rolę w transkrypcji genów rRNA i dojrzewaniu pre-rRNA (Lapeyre B. et al., *Nucl. Acid. Res.*, 1985, 13, 5805-5816; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 2327-2330).

numatryna (*numatrin*), białko o M 40 kDa, pI = 5.0, występuje w macierzy jądrowej limfocytów B u myszy, ma udział w indukowaniu proliferacji tych komórek (Feuerstein N., Monod J.J., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 11389-11397).

O

odwrotna giraza (*reverse girase*), topoizomeraza, któ-

ra wprowadza dodatnie superhelikalne skręty do cząsteczek DNA. Występuje w wyciągach komórkowych *Sulfolobulus*, archebakterii kwaso- i termofilnych (Kikuchi A., Asai K., *Nature*, 1984, 309, 677-681).

oligosacharyny (*oligosaccharins*), grupa regulatorowych oligosacharydów (np. heptaglukozyd grzybów i oligogalakuronid roślin), otrzymanych ze ścian komórkowych roślin. Kontrolują różnorodne funkcje, np. wzrost, rozwój, reprodukcję i obronę przeciw chorobom roślin (Albersheim P., Darvill A.G. *Sci. Amer.*, 1985, 253/3, 58-64).

onkomodulina (*oncomodulin*), kwaśne białko wiążące wapń, składa się ze 108 reszt aminokwasowych. Wykrywa się ją jedynie w nowotworach (Klee C.B., Heppel L.A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 30, 420-424).

osteokalcyna (*osteocalcin*) /synonimy: gļaproteina kostna, BGP/, białko wiążące Ca²⁺, występujące w organicznej macierzy kości, w dentynie i innych zmineralizowanych tkankach. Zawiera 47-51 reszt aminokwasowych, w zależności od gatunku. 3 reszty γ -karboksylglutaminianowe powstają w wyniku posttranslacyjnej modyfikacji, drogą karboksylacji, zależnej od witaminy K (Hauschka P.V. et al., *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 176-182).

osteonektyna (*osteonectin*), swoiste białko błonowe, M_r 32 000. Wiąże kolagen, Ca²⁺ i hydroksyapatyt, nie ma zdolności wiązania jonu fosforanowego. Znajduje się ją w miejscach świeżo osadzonych minerałów kostnych (Termine J.D. et al., *Cell*, 1981, 26, 99-105).

osteopontyna (*osteopontin*), siałoproteina swoista dla kości, składa się z 317 reszt aminokwasowych. Powstaje w komórkach macierzy kostnej może tworzyć mostki między komórkami i substancją mineralną macierzy (poprzez sekwencję Arg-Gly-Asp) (Oldberg A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 8819-8823).

owotioli (*ovothiol*), nowy związek tiohistydynowy, wydzielony z jaj jeżowca morskiego. Nadaje owoperosydazie aktywność oksydoreduktazy NAD(P)H: O₂ (Turner E. et al., *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 13056-13063).

P

p21, transformujące białko, kodowane przez wirus mięsaka Harveya. Funkcja p21 *in vivo* nie jest wyjaśniona, ale wydaje się, że jest ona istotna dla transformacji komórek zainfekowanych tym wirusem. Zawiera silnie związany lipid (Sefton B.M. et al., *Cell*, 1982, 31, 465-474).

p60^{src}, transformujące białko, kodowane przez wirus mięsaka Rousa, kinaza białkowa o swoistości wyłącznej względem reszt tyrozynowych. Fosforylacja polipeptydów komórkowych odgrywa przypuszczalnie istotną rolę w transformacji nowotworowej zakażonych komórek. W regionie N-końca zawiera silnie związany lipid. (Sefton B.M. et al., *Cell*, 1982, 31, 465-474).

p120, transformujące białko, kodowane przez wirus Abelsona, kinaza białkowa swoista względem reszt tyrozynowych, zawiera silnie związany lipid (Sefton B.M. et al., *Cell*, 1982, 31, 465-474).

“palce cynkowe” (“*zinc fingers*”), domeny lub moduły w cząsteczce białkowej, wiążące DNA lub RNA. Jeden “palec” składa się z helisy - skrętu - helisy, zawiera atom cynku skoordynowany z dwiema resztami cysteinyłowymi i dwiema histydyłowymi (Klug A., Rhodes D., *Trends Biochem. Sci.*, 1987, 12, 464-469).

pankreatatyna (*pancreastatin*), peptyd składający się z 49 reszt aminokwasowych, wydzielony z trzustki. Na N-końcu ma amid glicyny. Silnie hamuje wydzielanie insuliny, pobudzane przez glukozę (Tatemoto K. et al., *Nature* 1986, 324, 476-478).

pardaksyny (*pardaxins*), trzy peptydy zabójcze dla ryb, (P-1, P-2, P-3), wydzielone z wydzieliny ochronnej soli *Pardachirus pavoninus*. Każdy zawiera 33 reszty aminokwasowe, odmienny hydrofilny region C-końcowy oraz hydrofobowy region N-końcowy. Wykazują fizyczne i farmakologiczne podobieństwo do mellityny, ale nie wykazują homologii sekwencyjnej (Thompson S.A. et al., *Science*, 1986, 223, 341-343). Białko soli *Pardachirus marmoratus*, toksyczne dla rekinów nazwano też pardaksyną (Tachibana K. et al., *Science*, 1984, 226, 703-705).

patatyna (*patatin*), rodzina glikoprotein o M_r około 40 000, stanowiących około 40% rozpuszczalnych białek w bulwach ziemniaka. Wykazuje esterazową aktywność acylohydrolazy lipidowej (Mignery G.A. et al., *Nucl. Acid Res*, 1984, 12, 7978-8000).

pawonininy (*pavoninins*), grupa hemolitycznych aminoglikozydów steroidowych, wydzielonych z obronnej wydzieliny soli *Pardachirus pavoninus*. Mają właściwości odstraszenia rekinów (Tachibana K. et al., *Science*, 1984, 226, 703-705).

PDGF /synonim: płytkowy czynnik wzrostu (*platelet derived growth factor*), ciepłostała glikoproteina, otrzymana z płytek krwi człowieka. $pI = 9,8 - 10,2$. Stymuluje wzrost komórek tkanki łącznej w hodowlach. Może występować w różnych postaciach molekularnych o M_r między 27 000 a 35 000. Redukcja PDGF powoduje uwolnienie trzech łańcuchów polipeptydowych o M_r 17 000, 16 000 i 14 500-15 000, odpowiednio.

Może mieć udział w aterogenezie (Maciag T., *Trends Biochem. Sci.*, 1982, 7, 270).

pekalosomy (*pekalosomes*), /synonim: transgenomy (*transgenoms*)/, duże kompleksy DNA wewnątrz komórek biorców, transfekowanych przez DNA, wytrącane za pomocą fosforanu wapnia (Small J., Scangos G., *Science*, 1982, 219, 174-176).

peptaboile (*peptaboils*), liniowe antybiotyki peptydowe, pochodzące z grzybów, zawierają w wysokich proporcjach kwas α -aminoizomasłowy, czasem izowalinę. Mają acetylowane N-końce, a C-końce połączone wiązaniem peptydowym z aminoalkoholem, np. walinolem, leucynolem itp. Należą do tej grupy: alamecytyna, antyamebina, emerymocylna, suzukalicyna, trichotoksyna, zerwamycyna IIA. Mają zdolność zmieniania przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej. Dawniej zwano je peptaibofolami (peptaibophols) (Kokkinidis M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 139, 590-595).

peptyd łączący (*joining peptide*), kwaśny oktapeptyd, położony w pro-opiomelanokortynie między γ_3 -MSH i ACTH, połączony z nimi za pomocą dwu zasadowych reszt aminokwasowych z każdej strony (Eipper B.A. et al., *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 8686-8694).

peptyd towarzyszący cukrzycy (*diabetes-associated peptide*) /akronim: DAP/, peptyd złożony z 37 reszt aminokwasowych, wydzielony z bogatych w amyloid wyciągów trzustki osobników cierpiących na cukrzycę typu 2. Nie występuje u osób zdrowych. Homologiczny względem CGRP (calcitonin-generated peptide), wykazuje immunoreaktywność właściwą temu ostatniemu. (Clark A. et al., *The Lancet*, 1987, 231-234).

peptyd wazopresyno-podobny (*vasopresin-like peptide*), peptyd szeroko rozpowszechniony w sympatycznym układzie nerwowym ssaków, wykazuje bioaktywność i immunoreaktywność wazopresyny. Może spełnić rolę mediatora nie — adrenergicznych odpowiedzi na stymulację sympatyczną (Hanley M.R. et al., *Nature*, 1984, 309, 258-261).

perforiny (*perforins*), białka wydzielone z cytotoksycznych komórek T, eozynofilnych leukocytów, *E.histolytica*. Tworzą otwory w błonach komórek. Prawdopodobnie pokrewne cytolizynom (Marx J.L., *Science*, 1986, 231, 1367-1369).

PEST-hipoteza (*PEST-hypothesis*), hipoteza, zgodnie z którą obecność jednego lub więcej regionu bogatego w prolinę (P), kwas glutaminowy (E), serynę (S) i treoninę (T) w pierwszorzędowej strukturze białka nadaje mu podatność na wewnątrzkomórkową proteolizę (Rogers S. et al., *Science*, 1986, 234, 364-368).

PHV 42 /akronim Peptydu Histydyna-Walina 42 (*Peptide Histidine-Valine 42*), peptyd zawierający 42 reszty aminokwasowe, histydynę na N-końcu i walinę na C-końcu. Powstaje z jelitowego prepropeptydu naczynio-aktywnego (reszty 81-122). (Yiangou Y. et al., *J.Biol.Chem.*, 1987, 262, 14010-14013).

PIG /akronim fosfatydyloinozytologlikanu (*phosphatidylinositolglycan*). Jest to inozytlofosfatyd, połączony z oligosacharydem przez resztę inozytlową. Występuje jako wolny składnik błony cytoplazmatycznej, a także jako "kotwica PIG" (*PIG-anchor*), za pośrednictwem której wiele białek błonowych zakotwicza się w błonie. Białka te, określane jako zakotwiczone za pomocą PIG (*PIG-anchored proteins*, *PIG-tailed proteins*) łączą się z terminalną resztą glikozylową PIG. Do białek tych należą m.in.: cholinesteraza, fosfataza zasadowa, antygeny powierzchniowe, heparyny u ssaków i glikoproteiny powierzchniowe (*VSG*, *Variant Surface Proteins*) u *Trypanosoma* (Berger G. et al., *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 4885-4887). Inni autorzy używają na określenie PIG innego skrótu: G-IP (od: glycosyl-phosphatidylinositol, glikozylofosfatydyloinozytol) i określenia: **kotwica G-IP** (*G-IP anchor*) (Ferguson A.J. et al., *Science*, 1988, 239, 753-759).

pirochinolinochinon (*pyrrolo-quinoline quinone*) /synonim: PQQ/, koenzym dehydrogenazy metanolowej (EC 1.1.99.8) i dehydrogenazy metyloaminowej (EC 1.4.99.3), a przypuszczalnie i innych enzymów bakteryjnych (Dekker R.H. et al., *Eur. J.Biochem.*, 1982, 125, 69-73).

plakoglobina (*plakoglobin*), polipeptyd o M_r około 83 000, uczestniczący w różnych rodzajach adhezyjnych funkcji komórek. Pojawia się także w rozpuszczalnej, globularnej postaci w cytoplazmie komórek pozbawionych takich funkcji (Cowin P. et al., *Cell*, 1986, 46, 1063-1073).

plazminogen Tochigi (*plasminogen Tochigi*) dziedziczny, nieprawidłowy typ plazminogenu, w którym alanylowa reszta w pozycji 600 cząsteczki glikoproteinowej (liczącej 790 reszt) jest zastąpiona resztą treonylową. Plazmina, która powstaje z nieprawidłowego plazminogenu pod wpływem urokinazy jest pozbawiona aktywności (Miyata T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 6132-6136).

podokaliksyna (*podocalyxin*), główna sjaloproteina nabłonkowych komórek kłębuszków nerkowych (podocytów). M_r około 140 000 (Kerjaschki D.J., *J. Cell Biol.*, 1984, 98, 1591-1596).

"pozostający DNA" ("remnant DNA"), DNA, który rozdziela zmienne (V) i stałe (C) regiony genów immunoglobulin. W wielu komórkach produkujących immunoglobuliny jest on zachowywany po rekombinacji segmentów genów regionów V i C i utworzeniu

jednostki transkrypcyjnej (Voss J., Streb U., *Nucl. Acid Res.*, 1984, 12, 4229-4236).

predynorfina (*predynorphin*) /synonim: prekursor β -neodorfiny/dynorfiny, proenkefalina B/, polipeptydowy prekursor neodorfiny- β , dynorfiny i sekwencji Leu-enkefalin. Składa się z 236 reszt aminokwasowych (Rossier J., *Nature*, 1982, 298, 221-222).

prekursorowe białko poliubikwityny (*polyubiquitin precursor protein*), białko z drożdży, zawierające kilka dokładnych kopii 76-aminokwasowej sekwencji ubikwityny, połączonych wiązaniem Gly-Met między ostatnią i pierwszą resztą kolejnych ubikwityn (Oz-kaynak E. et al., *Nature*, 1984, 312, 663-666).

preprocholecystokinina (*preprocholecystokinin*), białko zawierające 115 reszt aminokwasowych, prekursor cholecystokininy. Sekwencję aminokwasową oznaczono na podstawie sekwencji DNA, kodującego to białko w komórkach szczura (Deschenes R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 726-730).

prepro-CRF /synonim: prepro-czynnik uwalniający kortykotropinę (*prepro-corticotropin-releasing factor*), preprokortykoliberyna/, białko składające się z 190 reszt aminokwasowych, zawiera sekwencję 40 reszt stanowiących czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF), mieszczącą się w pozycji 148-188. Sekwencję prepro-CRF oznaczono na podstawie budowy owczego mRNA, kodującego to białko (Fututani Y., *Nature*, 1983, 301, 537-540).

preprodynorfina (*preprodynorphin*), polipeptydowy prekursor predynorfiny, zawiera na N-końcu peptyd sygnałowy złożony z 20 reszt aminokwasowych (Kakidani H. et al., *Nature*, 1982, 298, 245-249).

preprorenina (*preprorenin*), prekursor reniny i proreniny, występuje w przykłębuszkowych komórkach nerki. Pojedynczy łańcuch polipeptydowy, złożony z 406 reszt aminokwasowych. Gen kodujący preproreninę zawiera 10 eksonów i rozciąga się na około 11,7 kb (Mizyaki H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 5999-6003).

preprotachikinina (*preprotachykinin*), prekursor substancji P w mózgu wołu. α -preprotachikinina zawiera sekwencję substancji P, a β -preprotachikinina - substancji P i substancji K, dekapeptydu wydzielonego z rdzenia kręgowego świni, pobudzającego skurcz jelita, znanego też pod nazwą neurokininy (Nawa H. et al., *Nature*, 1984, 312, 729-734).

proenkefalina (*proenkephalin*) /synonim: proenkefalina A/, polipeptydowy prekursor enkefalin, wydzielony z rdzenia nadnerczy. Podobny może występować w podwzgórze. Każda cząsteczka zawiera 4 Kopie Met-enkefalin i po jednej Kopii Leu-enkefalin.

heptapeptydu Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷ i oktapeptydu Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷-Leu⁸ (Rossier J., *Nature*, 1982, 298, 221-222).

profilina (*profilin*), białko wydzielone z tkanek ssaków i *Acanthamoeba*, zapobiega polimeryzacji monomerów aktywny (Craig S.W., Pollard T.D., *Trends Biochem. Sci.*, 1982, 7, 88-92).

progastryksyna (*progastricsin*) /synonim: pepsynogen II), zymogen wydzielany do soku żołądkowego u człowieka, prekursor gstryksyny (proteinyazy EC 3.4.23.3) (Foltman B., Jensen A.L., *Eur. J.Biochem.*, 1982, 128, 63-70).

pronatriodilantyna (*pronatriodilantin*), prekursor peptydów o charakterze hormonalnym z serca człowieka: przedsionkowego czynnika natriuretycznego (ANF, -109 reszt aminokwasowych) i kardiodilantyny (16 reszt). Strukturę pierwszorzędową oznaczono na podstawie sekwencji genu (Nemer M., *Nature*, 1984, 312, 654-656).

proosteokalcyna (*proosteocalcin*), białko o wysokiej masie cząsteczkowej, zawiera sekwencję aminokwasową osteokalcyny (Hauschka P.V. et al., *J.Biol. Chem.* 1983, 258, 176-182).

prosom (*prosome*), cząstka rybonukleoproteinowa (RNP, *rybonucleoprotein particle*) o zwartej strukturze wyraźnie widocznej w mikroskopie elektronowym, połączona z reprimowanymi mRNP (informacyjnymi cząstkami rybonukleinowymi), zawiera też swoiste małe cytoplazmatyczne RNA (cRNA) i charakterystyczny zestaw białek (Schmidt H.P. et al., *The EMBO J.*, 1984, 3, 29-34).

proto-onkogen (*proto-oncogene*), prawidłowy gen komórkowy o potencjalnej możliwości wywoływania transformacji komórki (po odpowiedniej aktywacji genu) (Marx J.L., *Science*, 1982, 218, 667).

pro-UK /synonim UK: nerkowy aktywator plazminogenu (*kidney plasminogen activator*), jednołańcuchowa forma zymogenowa urokinazy (Goldsmith M.F., *JAMA*, 1985, 1694-1695).

przedsionkowe polipeptydy natriuretyczne (*atrial natriuretic polypeptides*) /synonimy: ANP, atriopertyny, kardionatryny (*atriopeptins, cardionatryns*) /, polipeptydy występujące w tkance przedsionka serca u ludzi i szczurów, wykazują silną aktywność natriuretyczno-diuretyczną. α -ANP zawiera 28 reszt aminokwasowych, β -ANP - 56 reszt i jest dimerem anytrónolegle ułożonych łańcuchów α -ANP, połączonych za pomocą dwu mostków dwusiarczkowych. γ -ANP składa się z 126 reszt aminokwasowych. Wszystkie trzy ANP powstają z prekursora o 151 resztach, zawierającego 25-aminokwasowy peptyd sygnałowy. (Kangawa K. et al., *Nature*, 1985, 313, 397-400).

pseudoekson, białko kodowane przez ekson, który jest powtórzony w przyległym intronie (Fornace A., et al., *Science*, 1984, 224, 161-164).

pseudointron, intron zawierający odpowiednie miejsca wycięcia go po stronie 3' i 5', które nie są jednak wykorzystywane do wycięcia tego intronu (Hedford R-M. et al., *Cell*, 1984, 38, 409-412).

R

receptor SRP (*SRP receptor*), /synonim: receptor cząstki rozpoznania sygnału (*signal recognition particle receptor*)/, białko siateczki śródplazmatycznej, rozpoznające cząstkę rozpoznania sygnału (SRP) i umożliwiające proces wydzielenia białka sekrecyjnego (Levin R., *Science*, 1982, 218, 777-778).

renokortyna (*renocortin*), białko indukowane przez glukokortykoidy. Produkują ją komórki rdzenia nadnerczy w hodowli. Hamuje aktywność fosfolipazy A₂. Renokortyna wykazuje podobieństwo, a może jest identyczna z dwoma białkami indukowanymi przez glukokortykoidy: lipomoduliną wydzieloną z obojętnochłonnych leukocytów królika i makrokortyną z makrofagów szczura. (Rothut B. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 117, 878-884).

retroendocytoza (*retroendocytosis*), proces, dzięki któremu cząstki LDL po związaniu przez receptor i endocytozie są z powrotem uwalniane do środowiska i nie ulegają degradacji wewnątrz lizosomów. Szereg innych makrocząsteczek także ulega temu procesowi (Greenspan P., St. Clair R.W., *J.Biol.Chem.*, 1984, 259, 1703-1723).

retropozony (*retroposons*), rozproszone, powtarzające się sekwencje DNA u ssaków. Wydaje się, że pochodzą z RNA, np. pseudogeny reprezentujące mRNA, pseudogeny reprezentujące małe jądrowe RNA, Alu i pokrewne sekwencje. Zakończone są segmentem bogatym w adeniny, flankującą sekwencją z 7-21 par zasad, stanowiącą duplikat obszaru insercji. Należy je odróżnić od transpozonów (*transposons*), które są rozproszonymi, powtarzającymi się sekwencjami, przesuwanymi przy transpozycji DNA (Rogers J., *Nature*, 1983, 301, 460).

rianodyna (*ryanodin*), obojętny alkaloid roślinny, wydzielony z *Ryania speciosa*, wpływa silnie na mięśnie. Składa się z dwu głównych aktywnych składników: rianodiny i 9,21-didehydrorianodiny, występujących w stosunku 1:3. Oba składniki wykazują jednakową toksyczność i wiążą się w nanomolowych stężeniach, w sposób zależny od Ca²⁺, z preparatami ciężkich pęcherzyków SR z serca i mięśnia szkieletowego (Meissner G., *J.Biol.Chem.*, 1986, 261, 6300-6306).

rybozym (*ribozyme*), pierwotny transkrypt genu rybosomalnego RNA (pre-rRNA) pierwotniaka *Tetrahymena*, który może wycinać własne sekwencje intronowe bez udziału białek (Walsh C.T. *Trends Biochem. Sci.*, 1984, 9, 159-162). Niektórzy autorzy używają określenia samo składający^s się RNA (*self-splicing RNA*) (Levin R., *Science*, 1981, 218, 873-874).

^s patrz: składanie RNA (*RNA splicing*)

rymorfina (*rymorphin*), naturalnie występujący, unikalny tridekapeptyd. W tkankach, zawierających dynorfinę i α -neodynorfinę rymorfina jest głównym peptydem, zawierającym sekwencję Leu-enkefalin. Z jednej cząsteczki prekursora pochodzą 3 sekwencje enkefalin (Kilpatrick D.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 6480-6483).

S

α -sarcyna (*α -sarcin*), zasadowe, cytotoksyczne białko produkowane przez *Aspergillus giganteus*. Składa się z 150 reszt aminokwasowych. Hamuje syntezę białek, hydrolizując wiązania fosfodiesterowe w 28S RNA w dużej podjednostce rybosomów (Sacco G. et al., *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 5811-5818).

sarkofagina (*sarcophagine*), dipeptyd α -alanylo-L-tyrozyna (Kano Y., Natori S., *J. Biochem.* (Tokyo), 1985, 97, 463-471).

SERGE, wewnątrzkomórkowe miejsce inicjacji odkładania glikogenu w wątrobie szczura. Składa się z siateczki śródplazmatycznej i małych cząstek o dużej gęstości elektronowej, w skład których wchodzi glikogen i enzymy (Cardell R.R. et al., *J. Cell. Biol.* 1985, 101, 201-206).

serpiny (*serpins*), rodzina inhibitorów proteaz serynowych, do której zaliczamy inhibitor α -proteinazy, antytrombinę III, α_1 -antytrypsynę osocza, α_1 -antychymotrypsynę i in. (Pannehoek H. et al., *EMBO J.*, 1986, 5, 2539-2544).

SF2 /synonim: czynnik składania, (*splicing factor*), białko o M_r około 50 000, odporne na działanie ciepła, ale unieczynniane przez N-etylomaleimid. Występuje w wyciągach jąder komórkowych, działa we wczesnych stadiach składania pre-mRNA (Kramer A., Keller W., *EMBO J.*, 1985, 4, 3571-3581).

składanie RNA (*RNA splicing*), precyzyjne wycinanie intronów z pierwotnych transkryptów genów, tzn. z pre-rRNA, z pre-mRNA, pre-tRNA i in. Zespół zdarzeń, zachodzących w jądrze po transkrypcji i prowadzących do przetworzenia pre-RNA w funkcjonalne, cytoplazmatyczne formy RNA (a więc nie tylko składanie, ale m.in. metylacje) określa się mianem dojrzewania, przetwarzania (*processing*) lub redagowania (*editing*) RNA (m.in. B.Seliwanowicz, *Post. Biochem.*, 1988, 34, 351).

somatokrynina (*somatocrinin*), nazwa proponowana na określenie czynnika uwalniającego hormon wzrostu /synonimy: GFR, GHRF, GHRH /, wydzielonego z nowotworu wysepek trzustki. Jest to polipeptyd, składający się z 44 reszt aminokwasowych, wywołuje akromegalię, a *in vitro* uwalnia przysadkowy hormon wzrostu (Brazeau P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 7909-7913).

somatostatyna-28 (*somatostatin-28*), /synonim: SS-28 /, polipeptyd składający się z 28 reszt aminokwasowych, w którym C-terminalny tetradekapeptyd jest identyczny z somatostatyną ("somatostatyna-14", SS-14). Występuje w różnych regionach mózgu szczura, w ciałach komórek i w zakończeniach nerwowych (Bakhit C. et al., *Nature*, 1983, 301, 524-526).

somatostatyna-28 (1-12) (*somatostatin-28 (1-12)* /synonim: SS-28 (1-12) /, N-terminalny dodekapeptyd somatostatyny-28, występuje w różnych korowych i podkorowych regionach mózgu. Może być neurotransmiterem. (Bakhit C. et al., *Nature*, 1983, 301, 524-526).

splenina (*splenin*) /synonim: **tymopoetyna III** (*thymopoietin III*) /, polipeptyd składający się z 48 reszt aminokwasowych, produkowany w trzustce wołu, różni się od tymopoetyny wołu wyłącznie resztą w pozycji 34, którą w tymopoetynie jest asparaginian, a w spleninie glutaminian (Audhya T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 2847-2849).

splenopentyna (*splenopentin*), syntetyczny polipeptyd, odpowiada sekwencji 32-36 spleniny (Audhya T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 2847-2849).

SRP - patrz: receptor SRP

stefina (*stefin*), cytozolowy białkowy inhibitor proteinaz cysteinowych, wydzielony z ludzkich granulocytów polimorfojądrzastych. Strukturalnie podobny do cystatyny ludzkiej (Brzin J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 118, 103-109).

stromolizyna (*stromolysin*), metaloproteinaza zdolna do degradowania fibronektyny, lamininy i kolagenu typu IV (ale nie typu I), wydzielana przez fibroblasty maziowe królika i skóry człowieka. Preprostromolizyna (4777 reszt) przekształca się w prostromolizynę po utracie 17 aminokwasowego peptydu sygnałowego. Trypsyna uwalnia aktywną stromolizynę z proenzymu odszczepiając N-terminalny peptyd złożony z 84 reszt aminokwasowych (Wilhelm S.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 6725-6729).

struktura choinkowa (*holliday structure*), rozgałęziona forma DNA, utworzona drogą wzajemnej wymiany wycinków jednoniciowego lub dwuniciowego DNA; jest to pośrednia struktura we wzajemnym *crossing-over* prostych łańcuchów, zachodzącym między podwójnymi

w cząsteczkami DNA. Powstaje w niektórych szlakach rekombinacji genetycznej (Mizuki K. et al., *Cell*, 1982, 29, 357-365).

synapsyna I (*synapsin I*), główne białko swoiste neuronów, występuje w pęcherzykach synaptycznych większości (lub wszystkich) zakończeń nerwowych. Synapsyna jest substratem kinaz białkowych zależnych od Ca-kalmoduliny i cAMP, ulega fosforylacji w wielu miejscach cząsteczki (Navone F., *Science*, 1984, 226, 1209-1211).

synaptofizyna (*synaptophysin*), integralne białko błonowe, stanowi 6-8% białek błon pęcherzyków synaptycznych. Struktura pierwszorzędowa łańcucha złożonego z 307 reszt aminokwasowych została określona na podstawie klonowania i sekwencjonowania cDNA (Südhof T.C. et al., *Science*, 1987, 238, 1142-1144).

T

tachikiny (*tachykinins*), rodzina peptydów, zawierających C-końcówką sekwencję Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, wywołujących skurcz mięśni gładkich i różnych ich preparatów. Do tej grupy należą: substancja P, eleodoizyna, neurokinina- α i neurokinina- β (Cascieri M.A. et al., *J.Biol.Chem.*, 1985, 260, 1501-1507).

talopeptyna (*talopeptin*), N-(6-deoksy- α -L-talopiranozyle-oksyfosfo-L-leucylotryptofan. Inhibitor licznych metaloproteaz, z termolizyną włącznie (Katagishi K., Hiromi K., *J. Biochem.* (Tokyo), 1984, 95, 529-534).

tapsygargina (*thapsigargin*), czynnik mobilizujący wapń i pobudzający wzrost nowotworów. Podnosi stężenie wolnego wapnia w cytoplazmie płytek krwi do stałego poziomu, co rozpatruje się jako możliwy mechanizm pobudzania wzrostu nowotworów (Thastrup O. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 142, 654-660).

tenascyna (*tenascin*) synonim: antygen mięśniowo-ścięgnowy (*myotendinous antigen*), glikoproteina macierzy pozakomórkowej, uczestniczy w oddziaływaniach tkankowych podczas rozwoju płodu i onkogenezy. Podobnie jak fibronektyna składa się z podjednostek o M_r około 240 000, połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi (Chiquet-Ehrisman R. et al., *Cell* 1986, 47, 131-139).

tentoksyna (*tentoxin*), cykliczny tetrapeptyd o sekwencji: cyklo L-leucylo-N-metylo-(Z)-dehydrofenyloalanylo-glicylo-N-metyloalanylo-. Wykazano, że peptyd ten, początkowo wydzielony jako metabolit *Alternaria alternata*, po wprowadzeniu go do kiełkujących nasion niektórych wrażliwych gatunków roślin wybiórczo indukuje chlorozę (Edwards J.V., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1986, 28, 603-612).

tiolaktomycina (*thiolactomycin*), antybiotyk wydzielony

z przesączu hodowli *Nocardia sp.*, selektywnie i odwracalnie hamuje syntezę kwasów tłuszczowych (typ II), działając na trzy jej składniki enzymatyczne (Mishida I. et al., *J.Biochem.* (Tokyo), 1986, 99, 1447-1454).

tonina (*tonin*), endopeptydaza występująca w różnych tkankach szczura. Trawi angiotensynogen i angiotensyno-tetradekapeptydowy substrat reniny, tworząc bezpośrednio angiotensynę II. Hydrolizuje też wiązanie Phe-His angiotensyny I, tworząc angiotensynę II. Należy do proteaz serynowych (Gutkowska J. et al., *Canad.J.Biochem.*, 1982, 60, 843-846).

transducyna (*transducin*), białko wiążące GTP /synonim: białko G_i/ występuje w pręcikach siatkówki, pośredniczy w sprzęganiu sygnału między rodopsyną a fosfodiesterazą cGMP, związaną z błoną zewnętrznymi segmentów pręcików (Naven S.E., Fung B.K.K., *J.Biol.Chem.*, 1984, 259, 6686-6693).

transportosomy (*transportosomes*), organelle komórkowe, co do których postuluje się, że mogą być aktywnym narzędziem jądrowo-cytoplazmatycznego transportu mRNA, tRNA i podjednostek rybosomów. Uważa się je za rybonukleinowe cząstki, zawierające unikalny rodzaj hnRNA. Agregują, tworząc włókno-podobną, wysoce zorganizowaną strukturę, tzw. "rusztowanie". Rybonukleinowe kompleksy pre-mRNA (lub innych RNA) przyczepiają się do transportosomów przy przechodzeniu do porów jądra, a w czasie transportu ulegają składaniu i dojrzewaniu (Page A.O., Miller K.S., *BioEssays*, 1986, 5, 162-165).

"tranzytowy peptyd" ("transit peptide"), synonim peptydu sygnałowego (van den Broeck, *Nature*, 1985, 313, 358-363).

trihydroksytetraeny (*trihydroxytetraenes*), nowa grupa związków, tworzonych z kwasu arachidonowego w leukocytach ludzkich. Są to trihydroksy- pochodne kwasu 7, 9, 11, 13-ejkozetetraenowego (Serhan C.S., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 118, 943-949).

trombomodulina (*thrombomodulin*), białko powierzchniowe komórek nabłonkowych, tworzy kompleksy z trombiną i modyfikuje jej właściwości katalityczne (Salem H.H. et al., *J.Clin.Invest.*, 1984, 75, 968-972).

trombospodyna (*thrombospodin*), glikoproteina o M_r 420 000, wydzielana przez płytki krwi, poddana działaniu α -trombiny. Składa się z trzech łańcuchów polipeptydowych o jednakowej masie cząsteczkowej, połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi. Wiąże heparynę. N-terminalne ejkozepeptydy trombospodyny oraz peptyd wiążący heparynę (o M_r 30 000), otrzymywany z trombospodyny za pomocą plazminy mają identyczną sekwencję aminokwasową (Slayter H.S., *J.Biol.Chem.*, 1984, 259, 3944-3949).

trypanotion (*trypanothione*), N¹, N⁸ bis (glutationylo) spermidyna, jest kofaktorem reduktazy glutationowej z *Trypanosoma* i *Leishmania* (Fairlamb A.H. et al., *Science*, 1985, 227, 1485-1487).

tryptaza (*tryptase*), trypsyno-podobna proteaza serynowa, otrzymana z komórek tucznych płuc człowieka (Smith T.J. et al., *J.Biol.Chem.*, 1984, 259, 1046-1051).

TSAb, akronim przeciwciała, stymulującego tarczycę (*thyroid stimulating antibody*). Synonimy: stymulator tarczycy o długim działaniu (*long-acting thyroid stimulator*), przeciwciało receptora tyreotropiny (*thyrotropin-receptor antibody*) (Stracosch C.R. et al., *New.England J.Med.*, 1982, 307, 1499-1507).

tymulina (*thymulin*) /synonim: surowiczy czynnik grasiczy (*serum thymic factor*), nonapeptyd, zawierający cynk, produkowany selektywnie przez komórki nabłonkowe grasicy, wpływa na różnicowanie limfocytów (Lauzac J.P. et al., *J.Biol.Chem.*, 1986, 261, 7784-7790).

U

ubikwityna (*ubiquitin*), termostabilny polipeptyd, powszechnie występujący w tkankach. W chromatynie może występować w wolnej postaci, lub wiązać się z histonami 2A i 2B za pośrednictwem wiązania izopeptydowego, powstającego między C-końcową resztą glicyny w ubikwitynie a ϵ -aminową grupą reszty lizylowej histonu. Powstająca przy tym rozgałęziona cząsteczka wiąże się trwale z nukleosomem. Różne inne cząsteczki ubikwityny mogą wiązać się podobnie silnie z innymi białkami w reakcji wymagającej udziału ATP. Przyłączenie ubikwityny może być wewnątrzkomórkowym sygnałem degradacji białek (Herschko A., Ciechanover A., *Ann.Rev.Biochem.*, 1982, 51, 335-364).

urodilantyna (*urodilantin*), peptyd zbudowany z 32 reszt aminokwasowych, wydzielony z moczu ludzkiego. Ma sekwencję identyczną z α -prędionkowym peptydem natriuretycznym, ale zawiera dodatkowy tetrapeptyd na N-końcu (Feller S.M. et al., *Trends Biochem.Sci.*, 1989, 10, 93-94).

uromodulina (*uromodulin*), glikoproteina o M_r 85 kDa, wydzielona z moczu ciężarnej kobiety, zbudowana z 616 reszt aminokwasowych. Identyfikowana z glikoproteina Tamm-Horsfall. Jest jednym z białek najobficiej występujących w moczu (Pennica D. et al., *Science*, 1987, 236, 83-88).

U-snRNA, małe jądrowe RNA, bogate w urydylan. Rodzina cząsteczek snRNA (oznacza się je jako U₁,.....do U₆-snRNA), zawierających 100 - 215 nukleotydów i "oczepczony" koniec 5', których przypuszczalną funkcją jest udział w procesach składania hnRNA do dojrzałych RNA (Busch H. et al., *Ann.Rev.Biochem.*, 1982, 51, 617-654).

uwomodulina (*uromodulin*), glikoproteina uczestnicząca w adhezji, zależna od Ca²⁺, bierze udział w utworzeniu wczesnego płodu myszy. Rozpowszechniona w wielu tkankach, prawdopodobnie homologiczna z "cząsteczkami adhezji" innych gatunków (Peyeras N. et al., *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 8067-8071).

V

VAMP-1, błonowe białko-1 związane z pęcherzykami (*vesicle associated membrane protein-1*), białko swoiste dla pęcherzyków neuronowych, składa się z 120 reszt aminokwasowych. Wydzielono go z organu elektrycznego *Torpedo*. Hydrofobowy C-końiec może stanowić kotwicę błonową, zaś reszta cząsteczki jest zwrócona ku cytoplazmie (Trimble W.S. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1988, 85, 4538-4542).

W

wersykan (*versikan*), wielkocząsteczkowy proteoglikan, występujący w ludzkich fibroblastach. Dojrzały polipeptyd składa się z 2389 reszt aminokwasowych, zawiera domenę wiążącą kwas hialuronowy na N-końcu, oraz miejsca przyłączania glikozaminoglikanów i kilka innych domen na C-końcu (Zimmermann D.R., Ruoslahti E., *EMBO J.*, 1989, 8, 2975-2981).

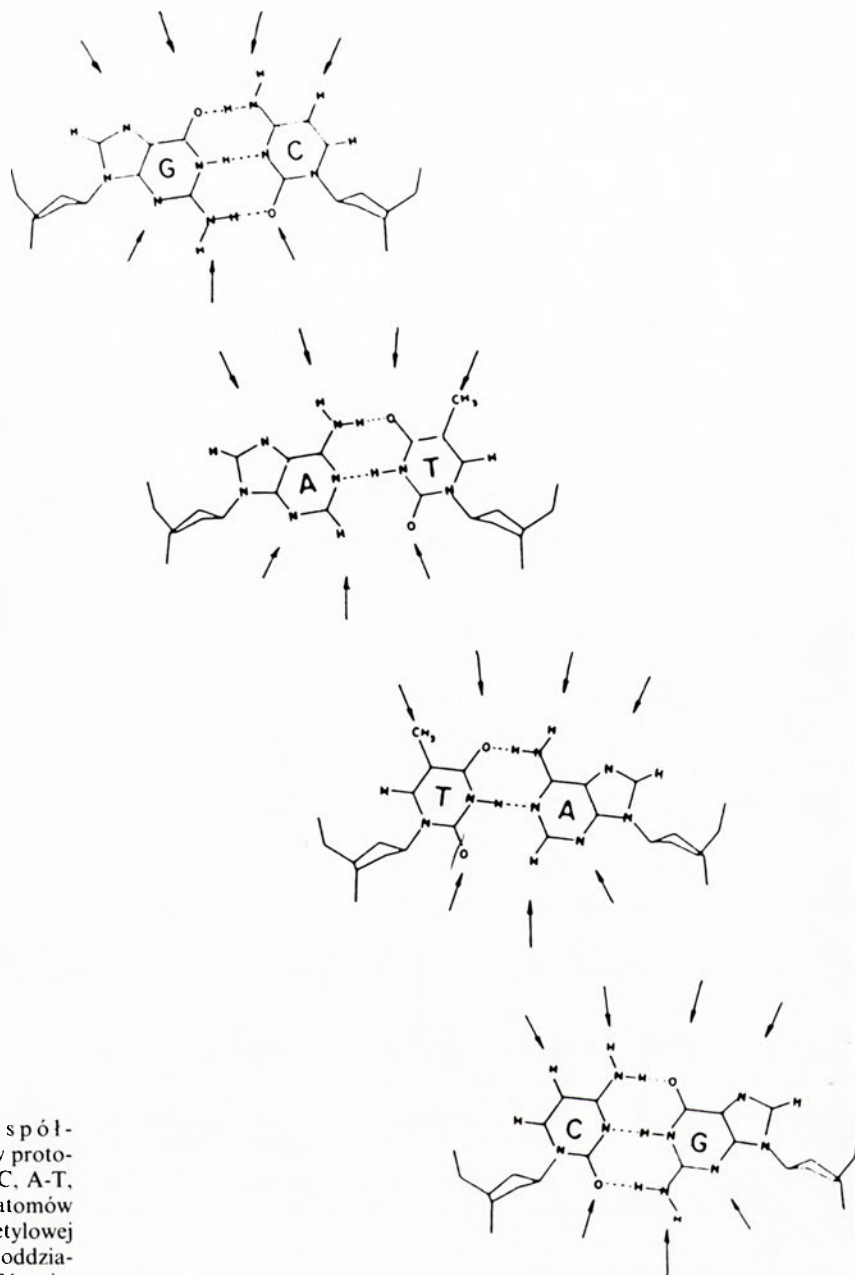
wimentyna (*vimentin*), białko tarczek, wydzielone z mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych. M_r 52 000. Występuje także w pośrednich filamentach w większości różnicujących się komórek, w komórkach rosnących w hodowlach tkankowych oraz w niektórych komórkach w pełni zróżnicowanych (Lazarides E., *Ann.Rev.Biochem.*, 1982, 51, 219-250).

winkulina (*vinculin*), cytoszkieletowe białko związane z cytoplazmatyczną powierzchnią płytek adhezyjnych, które zakotwiczą mikrofilamenty, zawierające aktynę, w błonie komórkowej i przyczepiają komórkę do podłoża. Zawiera fosfoserynę, fosfotreoninę i fosfotyrozynę. W komórkach transformowanych przez wirus mięsaka Rousa zawartość fosfotyrozyny w winkulinie wzrasta 8-krotnie w porównaniu z niezainfekowanymi komórkami (Sefton B.M. et al., *Cell*, 1981, 24, 165-174).

wolkenzyna (*volkensin*), toksyczne białko o M_r 62 000, oczyszczone z korzeni *Adenia volkensii*, krzewu rosnącego w Kenii (Barbieri L., et al., *FEBS Lett.*, 1984, 171, 277-279).

Z

zasada N-końca (*N-end rule*), zasada, zgodnie z którą okres półtrwania białka *in vivo* zależy od jego N-końcowych reszt (Bachmair A. et al., *Science*, 1986, 234, 179-186).



Ryc. 2. Zaproponowany przez Seemana i współautorów układ donorów i akceptorów protonu, charakterystyczny dla par zasad G-C, A-T, T-A i C-G (strzałki wskazują położenie atomów tlenu i azotu oraz położenie grupy metylowej tyminy potencjalnie zaangażowanych w oddziaływanie z białkami (wg McClarin i współautorów [27])).

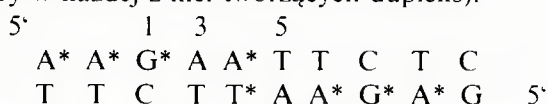
II-2. Oddziaływania białka Eco RI — DNA

Na początku lat 80-tych podjęto w kilku laboratoriach próby identyfikacji elementów struktury DNA zaangażowanych w oddziaływanie z białkiem Eco RI [28-30]. Wiele informacji na ten temat uzyskano w zespole Modricha [31] stosując opracowaną nieco wcześniej metodę „alkylation protection and alkylation interference” [32]. Wykorzystano w niej zjawisko specyficznego wiązania się (w środowisku pozbawionym jonów magnezu) endonukleazy z sekwencją kanoniczną, ale bez aktu hydrolizy [33]. Jako substrat endonukleazy zastosowano tu oligonukleotyd (34 pary zasad) zawierający sekwencję GAATTC, otrzymany po wycięciu przez restryktazy BspI i AluI odpowiedniego fragmentu z DNA plazmidu pBR322. Niezależne metylowanie tego oligonukleotydu, przed i po utworzeniu kompleksu z endonukleazą, pozwoliło ziden-

tyfikować zasady purynowe pozostające w kontakcie z enzymem. Interakcje endonukleazy z oligonukleotydem chroniły przed metylowaniem atom N7 guaniny +1 (w dużej bruzdzie) oraz atomy N3 reszt adeniny +2 i +3 (mała bruzda). Z kolei metylowanie poprzedzające próby tworzenia kompleksu DNA-białko wykazało, iż tylko modyfikacje atomu N7 guaniny oraz atomu N3 centralnie położonej adeniny +3 uniemożliwiają tworzenie kompleksu między DNA i endonukleazą. Metylowanie adeniny +2 poprzedzające inkubację z białkiem nie interferowało z tworzeniem kompleksu. Można więc było przypuszczać, iż osłonięcie atomu N3 adeniny +2 było dodatkowym efektem interakcji enzymu z guaniną +1 oraz adeniną +3. Porównanie wyników obu eksperymentów pozwoliło sądzić, iż w oddziaływaniu z enzymem są zaangażowane atom N7 guaniny +1 oraz atom N3 adeniny +3, a więc miejscem kontaktu endonukleazy Eco RI

z DNA jest zarówno duża, jak i mała bruzda. Było to dość niejasne, ponieważ wyniki badań uzyskane dzięki użyciu DNA metylowanego przez metylotransferazę Eco RI (która rozpoznaje również heksamer GAATTC i katalizuje metylowanie adeniny +3) wskazały, iż miejscem kontaktu białka z adeniną +3 jest atom azotu N6 grupy egzaminowej znajdującej się w dużej bruzdzie łańcucha nukleotydowego DNA. Natomiast z prac Modricha wynikało, że kontakty enzymu z adeniną +3 mają miejsce zarówno w dużej, jak i w małej bruzdzie DNA. Rozwiązanie tego problemu przyniosły ostatnio badania rentgenostrukturalne.

Metoda „alkylation interference” umożliwia także identyfikację wiązań internukleotydowych zaangażowanych w oddziaływanie z białkiem. Służy temu modyfikowanie DNA za pomocą etylnitrozomocznika, który w 0.1M roztworze kakodylanu sodowego alkiluje głównie grupy fosforanowe (60–65%), natomiast w znacznie mniejszym stopniu atom tlenu O2 tyminy (30%) oraz atomy N3 adeniny i O4 tyminy (łącznie ok. 5%) [34]. Obecność grupy etylowej modyfikującej wiązanie internukleotydowe może zmienić charakter interakcji z białkiem w wyniku utraty ładunku lub poprzez efekty steryczne. W laboratorium Modricha ustalono, że w oddziaływaniach z endonukleazą uczestniczy osiem grup fosforanowych (po cztery w każdej z nici tworzących dupleks):



Sześć z nich jest rozmieszczonych symetrycznie w stosunku do osi symetrii, dwie natomiast są położone pomiędzy resztami A i T, gdzie przebiega oś symetrii sekwencji kanonicznej. Bardzo silny efekt (polegający na hamowaniu tworzenia kompleksu białko-DNA) miało alkiłowanie internukleotydowych reszt fosforanowych znajdujących się poza sekwencją kanoniczną (w kierunku końca 5'). W oddziaływaniach endonukleazy z DNA uczestniczą także reszty fosforanowe leżące pomiędzy nukleozydami G i A oraz A i T, przy czym Modrich zwraca uwagę, iż efekt alkiłowania internukleotydowej reszty fosforanowej pomiędzy G i A (tzn. wiązania rozszczepianego przez enzym) jest znacznie mniejszy niż efekt alkiłowania trzech pozostałych reszt fosforanowych. Jakkolwiek przyczyna tego zróżnicowania pozostaje nieznana, Modrich sugeruje, iż wiązanie internukleotydowe pomiędzy G i A może być odpowiedzialne w warunkach katalitycznych za koordynację jonów Mg^{++} koniecznych w procesie hydrolizy; toteż alkiłowanie tego wiązania w warunkach braku jonów magnezu w środowisku reakcji wywołuje mniejszy efekt niż alkiłowanie innych reszt fosforanowych. Zastosowanie opisanej metody dla zidentyfikowania miejsc kontaktu pomiędzy endonukleazą Eco RI a substratem wymagało usunięcia jonów Mg^{++} ze środowiska reakcji. Jakkolwiek w tych warunkach endonukleaza Eco RI rozpoznaje sekwencję kanoniczną, a powstające kompleksy są trwałe

(stała asocjacji $K_a = 7 \times 10^{-10} M$), to w obecności jonów magnezu interakcje między DNA i enzymem mają prawdopodobnie nieco inny charakter. Toteż miejsca kontaktu między DNA i endonukleazą wskazane przez Modricha należy uznać jako istotne dla procesu rozpoznania, ale niekoniecznie dla procesu hydrolizy.

II-3. Zastosowanie syntetycznych oligonukleotydów w badaniach mechanizmu działania endonukleazy Eco RI

W ostatnich latach wiele informacji na temat mechanizmu działania endonukleazy Eco RI uzyskano na podstawie badań, w których wykorzystano jako substraty syntetyczne oligonukleotydy.

Fakt, iż substratem endonukleazy Eco RI (i innych enzymów restrykcyjnych) jest na ogół dwuniciowy DNA, nakazywał syntezę oligonukleotydów o strukturze palindromowej, a ponadto zastosowanie takich warunków inkubacji z enzymem, w których nawet krótkie fragmenty DNA, liczące jednak nie mniej niż 8 nukleotydów, występowałyby jako struktury dwuniciowe. Ponieważ ich temperatura mięknienia jest stosunkowo niska i czasami nie przekracza $20^\circ C$, należało obniżyć temperaturę inkubacji z 37° do $15-16^\circ C$, co niewątpliwie miało niekorzystny wpływ na aktywność endonukleazy, ale jednocześnie czyniło oligonukleotyd bardziej dostępnym dla enzymu. Badania przeprowadzone przy użyciu oktanukleotydu pTGAATTC wykazały, iż maksymalna szybkość (V_{max}) reakcji hydrolizy tego oligomeru katalizowanej przez endonukleazę Eco RI jest równa szybkości maksymalnej wyznaczonej dla przeprowadzonej w analogicznych warunkach reakcji hydrolizy DNA wirusa SV40 [35]. Jednakże wartość stałej Michaelisa wyznaczona dla tej reakcji ($K_M = 30 nM$) jest około 200 razy mniejsza niż wartość K_M wyznaczona dla reakcji hydrolizy oligonukleotydu ($K_M = 7 \mu M$), wykazując tym samym, iż powinowactwo enzymu jest znacznie mniejsze wobec oligonukleotydu niż wobec naturalnego DNA. Mimo to, w wielu laboratoriach zaczęto stosować oligonukleotydy zawierające 8-12 par zasad jako substraty endonukleazy Eco RI oraz wielu innych enzymów restrykcyjnych. Możliwość syntezy fragmentów DNA zawierających zarówno klasyczne jak i nietypowe nukleozydy, oraz możliwość modyfikowania wiązań internukleotydowych pozwoliła na wyjaśnienie niektórych problemów związanych z mechanizmem działania wielu enzymów restrykcyjnych, szczególnie jednak endonukleazy Eco RI.

Jakkolwiek obecność sekwencji GAATTC decyduje o specyficznym rozpoznawaniu i hydrolizie substratu przez restryktazę Eco RI, to jednak rodzaj i sekwencja zasad otaczających miejsce rozpoznawania mają istotny wpływ na szybkość hydrolizy DNA. Pierwsze informacje na ten temat pochodzą z pracy Thoma i Davisa, którzy zauważyli różnice w szybkości hydrolizy pięciu sekwencji kanonicznych Eco RI wy-

stępujących w DNA bakteriofaga λ . Podobne zjawisko zaobserwowano podczas degradacji DNA adenowirusa katalizowanej przez Eco RI [29].

Dla ustalenia roli sekwencji otaczających miejsce rozpoznawane przez Eco RI zsyntetyzowano dwa dekanukleotydy o podanej niżej sekwencji [36]. Stwierdzono, iż szybkość hydrolizy dekanukleotydu oznaczonego jako I jest 10-krotnie wyższa niż szybkość hydrolizy oligomeru II.



Enzym wyraźnie preferuje sekwencję bogatą w reszty deoksyadenozyny: w obecności par A-T szybkość hydrolizy wzrasta, podczas gdy obecność par G-C zmniejsza ją. Nie są jednak znane bliższe szczegóły dotyczące roli nukleozydów sąsiadujących z miejscem Eco RI. Można przypuszczać, iż nie biorą one bezpośredniego udziału w oddziaływaniach z enzymem, a raczej zmieniają konformację sekwencji zaangażowanej w interakcje z białkiem.

Syntetyczne oligonukleotydy wykorzystano dla wyjaśnienia jeszcze jednego problemu dotyczącego mechanizmu działania endonukleazy Eco RI, mianowicie możliwości hydrolizy jednoniciowego DNA. W połowie lat 70-tych uważano, iż tylko dwuniciowe formy DNA, wykazujące podwójną symetrię rotacyjną, są rozpoznawane i degradowane przez enzymy restrykcyjne typu II. Jednakże wyniki dalszych badań wskazywały, iż niektóre spośród nich np. Hae III specyficznie hydrolizują jednoniciowy DNA fagów ϕ X174, M13 oraz f1 [37, 38]. Obecnie lista endonukleaz, które specyficznie rozpoznają i degradują wymienione rodzaje jednoniciowego DNA, zawiera już kilkanaście enzymów [39], ale mechanizm tego procesu wciąż jest nieznan. Według niektórych autorów degradacja jednoniciowego DNA jest możliwa dzięki tworzeniu się (przejściowo) form dwuniciowych [39, 40] o strukturze szpilki do włosów. Ewidentny brak zdolności niektórych restryktaz do rozpoznawania i degradacji jednoniciowego DNA wynika raczej z określonych właściwości substratu, a nie enzymu, i jest spowodowany brakiem lub niestabilnością struktur dwuniciowych zawierających sekwencję kanoniczną. Jednakże katalizowana przez enzym MspI hydroliza oligonukleotydów o podanej niżej sekwencji zachodzi nawet wówczas, gdy substrat ma formę jednoniciową (ponieważ w każdym z tych oligomerów region samokomplementarny jest ograniczony do tetrameru CCGG, dla którego wartość temperatury mięknienia (T_m) jest znacznie niższa niż temperatura, w której prowadzono inkubację, tzn. temp. 25°C) [41].



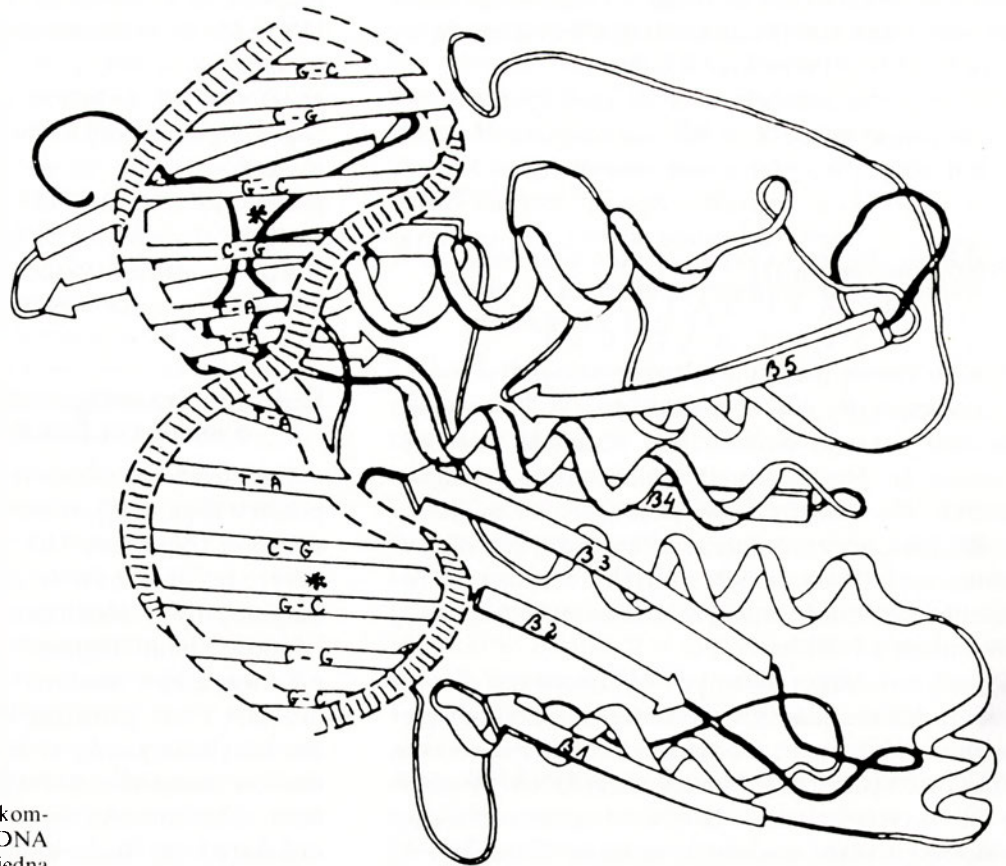
Również analiza sekwencji nukleotydów sąsiadujących z miejscem MspI w genomie faga ϕ X174 wykazała, iż najdłuższy region dwuniciowy, jaki może tworzyć się z udziałem tetrameru CCGG liczy 6 par zasad. To też wydaje się wysoce prawdopodobne, że enzym MspI

rozpoznaje i degraduje *sensu stricte* jednoniciowy DNA. Co do endonukleazy Eco RI jeszcze do niedawna sądzono, iż enzym ten nie degraduje jednoniciowego DNA [39]. Jednakże wyniki hydrolizy syntetycznego oligonukleotydu związanego kowalencyjnie ze złożem wskazują, iż endonukleaza rozpoznaje i degraduje jednoniciowy DNA nie wymagając obecności struktur dwuniciowych [42]. Immobilizowanie substratu na złożu wyklucza, zdaniem autorów, możliwość powstania wewnątrzcząsteczkowych duplikatów.

II-4. Analiza rentgenostrukturalna kompleksu endonukleaza Eco RI-DNA

Badania rentgenostrukturalne takich białek jak represory faga λ [6], białko CAP [3, 4] oraz represor operonu tryptofanu [10, 11] przyczyniły się w dużej mierze do opracowania za pomocą metody symulacji komputerowej modeli interakcji między tymi białkami i odpowiednimi fragmentami DNA. Metoda ta jednak nie uwzględnia znacznych zmian konformacji białka lub DNA, co poważnie ogranicza jej stosowalność. Bardziej wiarygodną wydaje się analiza rentgenostrukturalna kompleksów białko-DNA. Zastosowano ją m.in. w badaniach kompleksu represor 434-tetradekankleotyd [8] oraz kompleksu endonukleaza Eco RI-tridekankleotyd d[TCGCGAATTCGCG] [26, 27]. Wybór tej sekwencji był nieprzypadkowy, ponieważ w 1981 dokonano analizy rentgenostrukturalnej dodekameru o podobnej sekwencji, mianowicie d[CGCGAATTCGCG] [43, 45]. Porównanie wyników analizy tego dodekameru z wynikami analizy kompleksu białko Eco RI-d[TCGCGAATTCGCG] pozwoliło Rosenbergowi stwierdzić, że konformacja oligonukleotydu związanego z enzymem znacznie różni się od tej, jaką obserwowano w kryształach zawierających jedynie oligomer [26, 27]. Tę nową konformację stabilizowaną przez enzym określono jako „neo” konformację, natomiast odkształcenia helisy DNA spowodowane przez enzym znajdujące się pomiędzy nukleozydami A i T oraz C i G (Ryc. 3) oznaczono jako „neo-kink”-I i „neo-kink”-II. Odkształcenie występujące pomiędzy A i T („neo-kink”-I polega na rozwinięciu DNA (o 25°), a jego efektem jest poszerzenie w tym rejonie dużej bruzdy. Odległość między fosforanami położonymi naprzeciwko siebie w dużej bruzdzie, a należącymi do przeciwnych nici zwiększa się o 3.5 Å.

Zwiększenie odległości między elementami szkieletu fosforanowocukrowego znajdującymi się w dużej bruzdzie jest konieczne, aby α -helikalne fragmenty białka zaangażowane w oddziaływania z sekwencją kanoniczną mogły zbliżyć się do odsłoniętych w ten sposób zasad. W wyniku odkształceń pomiędzy nukleozydami A i T zmienia się położenie dwóch sąsiadujących ze sobą reszt adeniny, co umożliwia oddziaływania pomiędzy nimi i łańcuchami bocznymi odpowiednich aminokwasów. Gdyby w tym rejonie DNA nie na-



Ryc. 3. Schemat przedstawiający kompleks białko Eco RI - DNA (zaznaczona została jedna podjednostka białka i zmiana konformacji „neo-kink”-I).

stąpiła zmiana konformacji, atomy azotu N6 i N7 każdej z dwóch reszt adeniny byłyby zbyt oddalone od białka, aby uczestniczyć w oddziaływaniach z jego cząsteczką. Zmianie ulega również konformacja grup fosforanowo-cukrowych pomiędzy nukleozydami C i G (w miejscach oznaczonych na Ryc. 3 gwiazdkami). Odkształcenia występujące w tych regionach są zmianami typu „neo-kink”-II. Nie wywołują one tak dużych zmian konformacji jak „neo-kink”-I, ale mogą mieć pewien wpływ na hydrolityczną aktywność enzymu.

Analiza rentgenostrukturalna pozwoliła stwierdzić, że każda z podjednostek endonukleazy Eco RI jest zorganizowana w taki sam sposób. Składa się z pięciu fragmentów o strukturze β oraz 3 fragmentów α -helikalnych utworzonych przez aminokwasy 29-43 oraz 146-158 i 201-209. Trzy z pięciu fragmentów o strukturze β tworzą tzw. region równoległy zaangażowany w bezpośrednie oddziaływania z zasadami jak również w interakcje pomiędzy dwoma podjednostkami enzymu. W skład tego regionu wchodzi fragmenty $\beta 3$, $\beta 4$ oraz $\beta 5$. Natomiast region antyrównoległy, w skład którego wchodzi fragmenty $\beta 1$, $\beta 2$ oraz częściowo $\beta 3$ jest odpowiedzialny za proces hydrolizy wiązania internukleotydowego (Ryc. 3). Fragment $\beta 3$ uczestniczy więc zarówno w procesie rozpoznawania jak i rozszczepiania DNA. Ponadto w każdej podjednostce endonukleazy Eco RI zidentyfikowano fragmenty łańcucha polipeptydowego tworzące tzw. ramię, które owija się wokół helisy DNA. Oba ramiona (po jednym

w każdej podjednostce) działają jako swego rodzaju kleszcze, które unieruchamiają fragmenty DNA w określonym położeniu w stosunku do powierzchni białka. Każde ramię jest złożone z pierwszych 17 aminokwasów łańcucha polipeptydowego oraz aminokwasów 176-192 leżących pomiędzy fragmentami $\beta 4$ i $\beta 5$. Aminokwasy wchodzące w skład ramienia tworzą strukturę złożoną z trzech dodatkowych fragmentów β całkowicie niezależnych od wyżej opisanych pięciu fragmentów o strukturze β .

Udział N-końcowego fragmentu białka („ramienia”) w interakcjach z DNA zaproponowano po raz pierwszy dla wyjaśnienia oddziaływań pomiędzy DNA i represorem λ [6]. Jednakże N-końcowe ramię represora λ jest zaangażowane w specyficzne oddziaływania z zasadami, podczas gdy ramiona endonukleazy Eco RI uczestniczą w oddziaływaniach ze szkieletem fosforanowo-cukrowym. Wyniki badań Jen-Jacobson [46] wskazują, że kontakty pomiędzy DNA a pierwszymi dwunastoma aminokwasami wchodzącymi w skład ramienia są konieczne dla aktywności katalitycznej enzymu. Prawdopodobnie mają one wpływ na tworzenie się odkształceń typu „neo-kink”-II, a tym samym zmieniają konformację szkieletu fosforanowo-cukrowego w pobliżu miejsca hydrolizy. Oddziaływania pomiędzy DNA i endonukleazą prawdopodobnie powodują zmiany konformacyjne także w cząsteczce białka, ale ich istnienie nie zostało dotychczas udowodnione.

Szczegółowa analiza rentgenostrukturalna kompleksu endonukleazy Eco RI-tridekanukleotydu [TCGCGAATTCGCG] (przeprowadzona przy rozdzielczości 2,3 Å [27]) pozwoliła stwierdzić, i spośród sześciu zasad heksameru GAATTC tylko zasady purynowe kontaktują się z białkiem za pomocą wiązań wodorowych. Atom azotu N7 oraz atom tlenu O6 guaniny +1 tworzą dwa wiązania wodorowe z arginina 200 jednej z podjednostek dimeru Eco RI, podczas gdy atomy azotu N6 dwóch reszt adeniny tworzą dwa wiązania wodorowe z łańcuchem bocznym glutaminianu 144 tejże podjednostki. Natomiast atomy N7 tych samych reszt adeniny uczestniczą w oddziaływaniach z drugą podjednostką białka poprzez wiązania wodorowe z łańcuchem bocznym argininy 145.

Ponieważ sekwencja kanoniczna Eco RI ma charakter dimeru w oddziaływaniach z dimerem enzymu uczestniczy trinukleotydu GAA jednej nici oraz trinukleotydu o tej samej sekwencji należący do drugiej nici. Trimer pirymidyn TTC nie jest bezpośrednio zaangażowany w oddziaływanie z białkiem, chociaż może mieć wpływ na konformację heksameru GAATTC. Tak więc analiza rentgenostrukturalna wykazała, iż kompleks enzym Eco RI-DNA jest stabilizowany przez 12 wiązań wodorowych utworzonych pomiędzy strukturą GAATTC/CTTAAG i łańcuchami bocznymi sześciu aminokwasów białka Eco RI.

Uzyskanie krystalicznego kompleksu białko-DNA, a następnie jego analiza rentgenostrukturalna przy odpowiednio dużej rozdzielczości, pozwalają wyjaśnić wszystkie aspekty funkcjonowania białek regulatorowych, ponieważ ich funkcja ogranicza się do utworzenia kompleksu z odpowiednim fragmentem DNA. Tymczasem w przypadku endonukleazy Eco RI analiza rentgenostrukturalna kompleksu enzym-oligonukleotydu (zawierający sekwencję kanoniczną) wyjaśnia jedynie mechanizm rozpoznawania substratu. Proces hydrolizy wymaga bowiem udziału jonów magnezu. Usunięcie go ze środowiska jest konieczne, aby można było analizować oddziaływanie enzymu z substratem, ale jednocześnie uniemożliwia to analizę procesu hydrolizy. Toteż pomimo niewątpliwie doniosłych wyników uzyskanych przez Rosenberga i współautorów problem mechanizmu rozszczepienia wiązania internukleotydu przez endonukleazę Eco RI pozostał nie rozwiązany. Można przypuszczać, że jony magnezu powodują zmianę konformacji białka związanego specyficznie z DNA. Efekt allosteryczny wywołany przez jony magnezu polega na powstaniu nowego konformeru różnego od tego, jaki Rosenberg obserwował w kryształach otrzymanych pod nieobecność magnezu. W obecności jonów Mg^{++} kompleks DNA-białko Eco RI staje się mniej stabilny [33]. Ich obecność zwiększa szybkość dysocjacji enzymu od DNA. Wywołana przez jony magnezu destabilizacja kompleksu enzym-DNA ułatwia katalizę, ponieważ obniża różnicę energii aktywacji pomiędzy

kompleksami enzym-substrat i enzym-produkt. Biorąc pod uwagę możliwość zmiany konformacji białka pod wpływem jonów Mg^{++} można przypuszczać, iż miejsca kontaktu pomiędzy białkiem i DNA są nieco różne w procesie rozpoznawania i hydrolizy. Toteż jakkolwiek wyniki kilkuletnich badań zespołu Rosenberg'a wyjaśniły mechanizm rozpoznawania sekwencji kanonicznej przez endonukleazę Eco RI, to nadal w wielu laboratoriach podejmowane są wysiłki zmierzające do wyjaśnienia procesu specyficznego rozszczepiania DNA przez ten enzym. Wiele nowych informacji na ten temat uzyskano na podstawie badań, w których wykorzystano jako substraty dla Eco RI zmodyfikowane oligonukleotydy.

Artykuł otrzymano 18 maja 1990 r.

Zaakceptowano do druku 5 grudnia 1990 r.

Piśmiennictwo

- Ollis D.L., White S.W., (1987), *Chem. Rev.*, **87**, 981-995.
- Seeman N.C., Rosenberg J.M., Rich A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 804-808.
- McKay D.B., Steitz T.A., (1981), *Nature (Lond.)*, **290**, 744-749.
- McKay D.B., Weber I.T., Steitz T.A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9518-9524.
- Ohlendorf D.H., Anderson W.F., Fisher R.G., Take-da Y., Matthews B.W., (1982), *Nature (Lond.)*, **298**, 718-723.
- Pabo C.O., Krovatin W., Jeffrey A., Sauer R.T., (1982), *Nature (Lond.)*, **298**, 441-443; Pabo C.O., Lewis M., *ibid*, 443-447; Sauer R.T., Yocum R.R., Doolittle R.F., Lewis M., Pabo C.O., *ibid* 447-451.
- Anderson J.E., Ptashne M., Harrison S.C., (1985), *Nature (Lond.)*, **316**, 596-601.
- Anderson J.E., Ptashne M., Harrison S.C., (1987), *Nature (Lond.)*, **326**, 846-852.
- Schevitz R.W., Otwinowski Z., Joachimiak A., Lawson C.L., Sigler P.B., (1985), *Nature (Lond.)*, **314**, 782-786.
- Otwinowski Z., Schevitz R.W., Zhang R.G., Lawson C.L., Joachimiak A., Marmorstein R.Q., Luisi B.F., Sigler P.B., (1988), *Nature (Lond.)*, **335**, 321-329.
- Stasiak A., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 343-387.
- Roberts R.J., (1988), *Nucl. Acid. Res.*, **16**, r271-r313.
- Roberts R.J., (1987), *Nucl. Acid. Res.*, **15**, r189-r217.
- Hedgpeth J., Goodman H.M., Boyer H.W., (1972), *Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3448-3452.
- Newman A.K., Rubin R.A., Kim S.-H., Modrich P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2131-2142.
- Greene P.J., Gupta M., Boyer H.W., Brown W.E., Rosenberg J.M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2143-2153.
- Polisky B., Greene P., Garfin D.E., McCarthy B.J., Goodman H.M., Boyer H.W., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3310-3314.
- Woodbury C.P., Hagenbuchle O., von Hippel P.H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11534-11546.
- Tikhonenko T.I., Karamov E.V., Zavizion B.A., Norditsky B.S., (1978), *Gene*, **4**, 196-212.
- George J., Blakesley R.W., Cirikjian J.G., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6521-6524.
- Catherine M.C., Hattley B.S., (1979), *Biochem. J.*, **177**, 49-54.
- Heininger K., Horz W., Zachau H.G., (1977), *Gene*, **1**, 291-303.
- Rosenberg J.M., Greene P., (1982), *DNA*, **1**, 117-124.
- Joyce C., Grindley R., - dane nieopublikowane.
- Gardner R.C., Howarth A.J., Messing J., Shepherd R.J., (1982), *DNA*, **1**, 109-115.
- Frederick C.A., Grable J., Melina M., Samudzi C., Jen-Jacobson L., Wang B.-Ch., Greene P., Boyer H.W., Rosenberg J.M., (1984), *Nature (Lond.)*, **309**, 327-331.
- McClarín J.A., Frederick C.A., Wang B.-Ch., Greene

- P., Boyer H.W., Grable J., Rosenberg J.M., (1986), *Science*, **234**, 1526-1541.
28. Kaplan D.A., Nierlich D.P., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2395-2397.
29. Berkner K.L., Falk W.R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3185-3193; Forsblum S., Rigler R., Ehrenberg M., Pattersson U., Philipson L., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 3255-3261.
30. Modrich P., Rubin R.A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7273-7278.
31. Lu A.-L., Jack W.E., Modrich P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 13200-13206.
32. Siebenlist U., Gilbert W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 122-126; Siebenlist U., Simpson R.B., Gilbert W., (1980), *Cell*, **20**, 269-281.
33. Halford S.E., Johnson N.P., (1980), *Biochem. J.*, **191**, 593-604.
34. Jensen D.E., Reed D.J., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5098-5107; Jensen D.E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5108-5113.
35. Greene P.J., Poonian M.S., Nussbaum A.L., Tobias L., Garfin D.E., Boyer H.W., Goodman H.W., (1975), *J. Mol. Biol.*, **99**, 237-261.
36. Alves J., Pingoud A., Haupt W., Langowski J., Peters F., Maass G., Wolff C., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **140**, 83-92.
37. Horiuchi K., Zinder N.D., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2555-2558.
38. Goodson G.N., Roberts R.J., (1976), *Virology*, **73**, 561-567.
39. Nishigaki K., Kaneko Y., Wakuda H., Husimi Y., Tanaka T., (1985), *Nucl. Acids Res.*, **13**, 5747-5760.
40. Blakesley R.W., Dodgson J.B., Nes I.F., Wells R.D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7300-7306.
41. Yoo O.J., Agarwal K.L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10559-10562.
42. Bischofberger N., Ng P.G., Webb T.R., Matteucci, (1987), *Nucl. Acids Res.*, **15**, 709-716.
43. Dickerson R.E., Drew H.R., (1981), *J. Mol. Biol.*, **149**, 761-786.
44. Dickerson R.E., Drew H.R., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7318-7322.
45. Dickerson R.E., (1983), *J. Mol. Biol.*, **166**, 419-423.
46. Jen-Jacobson L., - dane nieopublikowane.

NAGRODY PRYZNANE W 1990 ROKU PRZEZ POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

1. Nagroda im. Jakuba Karola Parnasa
Tomasz Łoziński, Wojciech T. Markiewicz, Tadeusz K. Wyrzkiewicz, Kazimierz L. Wierzchowski
Effect of the sequence-dependent structure of the 17 bp AT spacer on the strenght of consensus-like E.coli promoters in vivo.
Nucleic Acid Research, Vol. 17, 3855-3863, 1989

2. Nagroda im. Włodzimierza Mozołowskiego
Grzegorz Nowak, Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, Gdańsk
Deaminaza AMP z nerki ludzkiej
XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk, 13-15 IX 1990

Katarzyna Kwiatkowska, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Pasteura 3, Warszawa
Udział podbłonowego cytoszkieletu komórkowego w procesie agregacji receptorów nabłonkowego czynnika wzrostu w komórkach A 431.
XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk 13-15 IX 1990

Ryszard Smoleński, Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku Dębinki 1,
Nukleotydy adeninowe i ich katabolizm w sercu człowieka w trakcie zabiegów kardiochirurgicznych
XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk 13-15, IX 90

Grzegorz Bukato, Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, Dębinki 1,
Dominująca rola formy mitochondrialnej w przyroście aktywności enzymu jabłczanego w mózgu rozwijającego się szczura
XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk 13-15 IX 90

3. Nagroda im. Bolesława Skarżyńskiego
Barbara Grzelakowska-Sztabert
Oporność wielolekowa komórek nowotworowych — fakty i hipotezy. Modulatory oporności wielolekowej komórek nowotworowych.
Postępy Biochemii 35, 4, 1989, 513-541, 543-561

Uprzejmie informujemy, że firma

Calbiochem

reprezentowana jest w Polsce przez Pharm Supply AG

02-954 Warszawa

ul. Marconich 6 m 1

tel., fax: 642 87 77

tlx: 816 930

Sprzedajemy odczynniki chemiczne, biochemiczne i immunologiczne, w szczególności:

- przeciwciała
- bufory
- aminokwasy
- detergenty
- hormony
- enzymy
- inhibitory
- czynniki wzrostu
- lipidy
- peptydy
- nukleotydy
- białka
- antybiotyki
- toksyny
- hodowle komórkowe
- surowice odpornościowe

Od 1 stycznia 1991 roku ceny wszystkich pozycji zawartych w katalogu na rok 1990/1991 ulegają obniżce o 30%

Niektóre zmiany w cytoszkielecie po transformacji nowotworowej

Some changes in the cytoskeleton after neoplastic transformation — minireview

KRZYSZTOF JAGŁA¹
BARBARA SAFIEJKO-MROCZKA²
JAN DOMANIEWSKI³

Wykaz stosowanych skrótów:

PDGF — czynnik wzrostowy pochodzący z płytek krwi, EGF - epidermalny czynnik wzrostowy, CSF-1 - ang. *colony stimulating factor* — 1, tsRSV — mutant termowrażliwy wirusa mięsaka Rousa, MT — mikrotubula, MF — mikrofilament, MAP2 — ang. *microtubule associated protein 2*, GFAP — ang. *glial fibrilar acidic protein*.

Badania biochemiczne i ultrastrukturalne pozwoliły na identyfikację trzech głównych układów włóknistych w cytoplazmie: mikrofilamentów, mikrotubul i filamentów pośrednich*. Tworzą one trójwymiarową sieć cytoplazmatycznych włókien, która zostaje uwidoczniiona w komórkach po ekstrakcji detergentami niejonowymi i określona jest mianem cytoszkieletu [1].

Uważa się [2, 3, 4], że poszczególne elementy cytoszkieletu poza funkcjami cytomechanicznymi, związanymi z zachowaniem kształtu komórki, zdolnością do migracji i adhezji komórek oraz rozmieszczeniem organelli w cytosolu, odgrywają istotną rolę w przewodzeniu informacji z błony cytoplazmatycznej do jądra i indukcji odpowiedzi biochemicznej. Hipoteza przedstawiona przez Edmanna [5] zakłada, że receptory powierzchni komórki oraz mikrofilamenty i mikrotubule działają wspólnie w procesie inicjacji syntezy DNA przez czynniki wzrostowe. Wskazuje to na możliwość udziału poszczególnych elementów cytoszkieletu w regulacji dwóch podstawowych funkcji życiowych komórki — wzrostu i różnicowania. Zaburzenia tych procesów, jak wiadomo, mogą prowadzić do wytworzenia nowotworowego fenotypu komórki. Wiadomo również, że szereg białkowych produktów onkogenów (odpowiedzialnych za transformację no-

wotworową) działa bądź jako czynniki wzrostowe (produkt *c-sis* - PDGF [6], bądź jako receptory (produkt *c-erbB* - receptor EGF [7, 8], produkt *c-fms* - receptor CSF-1 [9], produkt *c-erbA* - receptor glukokortykoidów [10]), bądź też wykazuje aktywność kinaz białkowych (produkty *c-src*, *c-yes*, *c-abl*, *c-fes/fps*, *c-fgr*, *c-mil/raf*, *c-mos*, *c-rel* [9]**). Informacje te wskazują na istnienie wzajemnych powiązań pomiędzy ekspresją białek cytoszkieletu, strukturą jego elementów, a własnościami transformującymi produktów onkogenów.

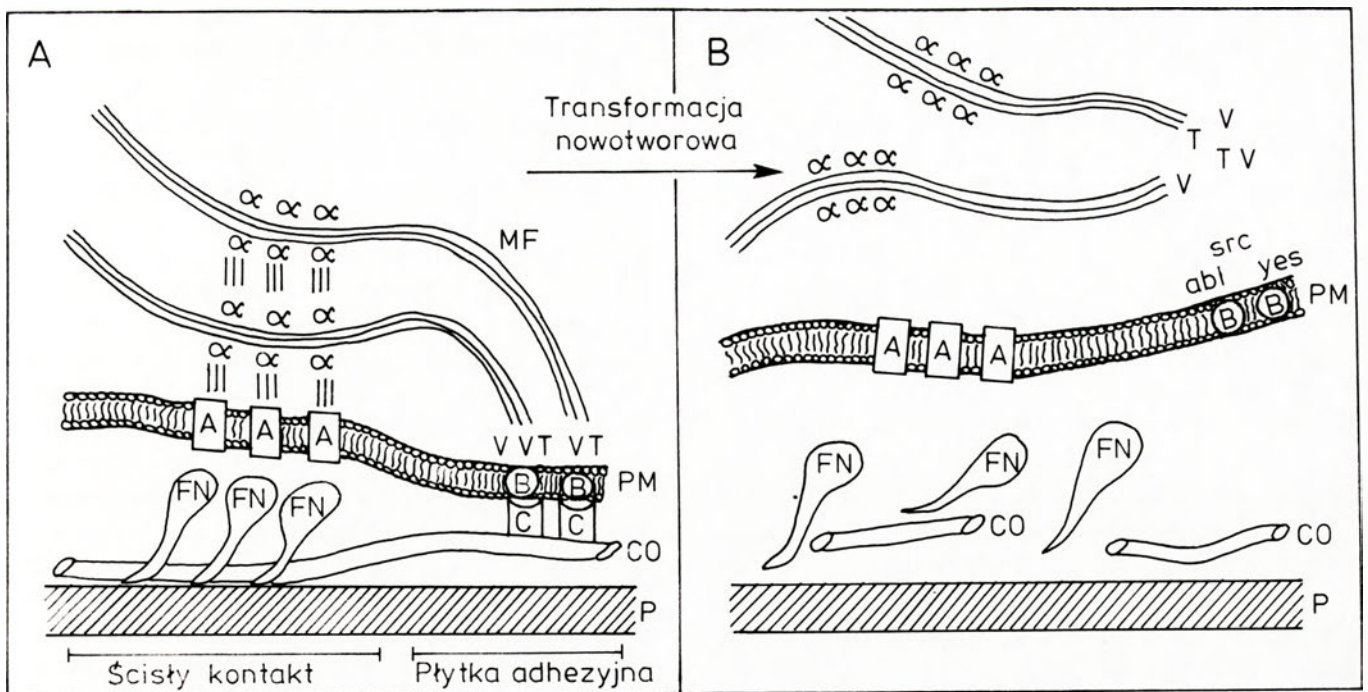
Podczas transformacji nowotworowej indukowanej *in vitro* zaobserwowano [3, 11, 12] istotne zmiany zachodzące w cytoszkielecie komórek. Stwierdzono, że ujawnianiu oraz utracie fenotypu nowotworowego towarzyszy zmiana kształtu komórek. Napromienienie fibroblastów mysich C3H 10T1/2 powoduje [13], że komórki hodowane w dużej gęstości w warunkach uniemożliwiających adhezję, przybierają kulisty kształt i są zdolne do wywoływania nowotworów u "nagich" myszy, natomiast hodowane w małej gęstości, w naczyniach plastikowych, zachowują morfologię normalnych fibroblastów i nie wywołują nowotworów u "nagich" myszy. Podobnie, w przypadku komórek pochodzących z niektórych linii czerniaka myszy [14], zdolność do przerzutowania może być znacznie podwyższona w efekcie hodowli w naczyniach uniemożliwiających wytworzenie przez komórki płytek adhezyjnych.

Mikroskopowo-elektronowe badania komórek stransformowanych wykazały, że w porównaniu z komórkami prawidłowymi następuje w nich redukcja ilości i grubości wiązek filamentów aktynowych (fibryli) oraz połączeń mikrofilament — błona cytoplazmatyczna [15, 16]. Za pomocą technik immunofluorescencyjnych [17] ustalono, że w wyniku transformacji nowotworowej w komórkach następuje spadek ilości lub całkowity brak włókien naprężeniowych (ang. *stress fibers*), związany z depolimeryzacją F-aktyny do G-aktyny oraz towarzyszące temu zjawisku obniżenie zdolności do tworzenia włókien fibronektynowych na powierzchni komórki (Ryc.1). Jednocześnie zachodzi znaczne ograniczenie w ilości trans-

¹Dr, ²Dr, ³Prof. dr hab. med., Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Akademii Medycznej w Bydgoszczy, 85-094 Bydgoszcz, ul. Skłodowskiej-Curie 9

* Ogólna charakterystyka mikrofilamentów, mikrotubul i filamentów pośrednich została przedstawiona na łamach Postępów Biochemii w artykule Z. Pietrzykowski i go, *Post. Biochem.*, **33**, (1987), 501-514.

** Bliższe informacje na temat genów transformujących i ich produktów zawarto w artykule "Geny transformujące wykrywane metodą transfekcji", K. Jagła, J. Domaniewski, *Post. Biochem.*, **33**, (1987), 433-450.



Ryc. 1. Schemat interakcji zachodzących pomiędzy cytoszkieletem i matriks pozakomórkową: A - w komórce prawidłowej, B - w komórce transformowanej. MF - mikrofilament; PM - błona komórkowa; CO - włókna kolagenowe; P - podłoże; α - aktynina; FN - fibronektyna; V - winkulina; T - talina; *src*, *abl*, *yes* - produkty onkogenów o aktywności fosfokinaz, występujące w obrębie płytek adhezyjnych; A - białko transbłonowe uczestniczące w wiązaniu pozakomórkowej fibronektyny z α -aktyniną mikrofilamentów; B - białko transbłonowe uczestniczące w wiązaniu mikrofilamentów z błoną komórkową przy udziale winkuliny i taliny w obrębie płytek adhezyjnych; C - białko pośredniczące w wiązaniu pozakomórkowych włókien kolagenowych z błoną komórkową w obrębie płytek adhezyjnych.

Przygotowano na podstawie pozycji literaturowych nr 3,26-30.

blonowych powiązań (fibronexus) pomiędzy białkiem matriks pozakomórkowej — fibronektyną, a subblonowymi mikrofilamentami (Ryc. 1.) oraz obniżenie zdolności do adhezji, co w efekcie wpływa na zmianę kształtu komórek [3]. Czynniki powodujące rozkład powierzchniowej fibronektyny (np. plazmina, trypsyna) zmieniają przestrzenną organizację włókien aktynowych, natomiast poddanie komórek działaniu cytochalazyny B, zapobiegającej tworzeniu się nowych i wydłużaniu już istniejących mikrofilamentów, prowadzi do uwolnienia fibronektyny [3]. Biochemiczne podstawy zmian w filamentach aktynowych transformowanych komórek nie zostały całkowicie wyjaśnione. Stwierdzono, że w komórkach transformowanych kancerogenami chemicznymi dochodzi do mutacji punktowej genu β -aktyny [18], której następstwem może być obniżenie włączania zmienionej formy aktyny do cytoszkieletu. Zmianie ulega również ekspresja białka wiążącego się z aktyną, tropomiozyny.

W diploidalnych fibroblastach ludzkich linii KD i transformantach HuT (pochodzących z komórek KD) wykryto 6 izocząsteczek tropomiozyny. Stwierdzono różnice w ekspresji tych izocząsteczek w komórkach prawidłowych i transformowanych oraz różnice w "utkaniu" mikrofilamentów aktynowych, specyficzne dla zmian zachodzących w ekspresji tropomiozyny [19].

Ponadto wyniki prowadzonych ostatnio badań wskazują na bezpośredni związek białek onkogennych z białkami odpowiedzialnymi za strukturę mikrofila-

mentów. Zidentyfikowany w laboratorium Barbacid a [20] onkogen *trk** koduje białko fuzyjne złożone z fragmentów tropomiozyny mięśniowej i kinazy białkowej, a produkt onkogenu *c-fgr* jest hybrydem fragmentu aktyny i kinazy tyrozynowej [21].

Szczególnie dogodnym materiałem do badania zmian w organizacji cytoszkieletu są komórki transformowane mutantami termowrażliwymi wirusa mięsaka Rousa (tsRSV) [22-24]. W wyniku wprowadzenia do fibroblastów kurczęcia mutantów tsRSV stwierdzono redukcję syntezy α -izoaktyny [24]. Białko pp60^{src}, produkt onkogenu *v-src*, który jest odpowiedzialny za transformację wirusem RSV, jest związane z siecią cytoszkieletu po ekstrakcji detergentami [25] i może wpływać na polimeryzację aktyny poprzez fosforylację miejsc tyrozynowych. Za pomocą technik immunofluorescencyjnych i immunoenzymatycznych ustalono, że pp60^{src} występuje zarówno na wewnętrznej powierzchni błon komórkowych jak i w płytkach adhezyjnych [26], a jednym z substratów fosforylacji jest znajdująca się w płytkach adhezyjnych winkulina i talina [27], (Ryc. 1). Najnowsze wyniki badań Ballmera — Hofera i współautorów [28], przeprowadzonych na komórkach CEF (*chicken embryo fibroblasts*) transformowanych wirusem RSV, wskazują, że białko pp60^{src} oraz tzw. średni antygen

* Dokładny opis identyfikacji onkogenu *trk* przedstawiono w artykule K. Jagły i J. Domaniewskiego. *Post. Biochem.*, 33, (1987), 433-450.

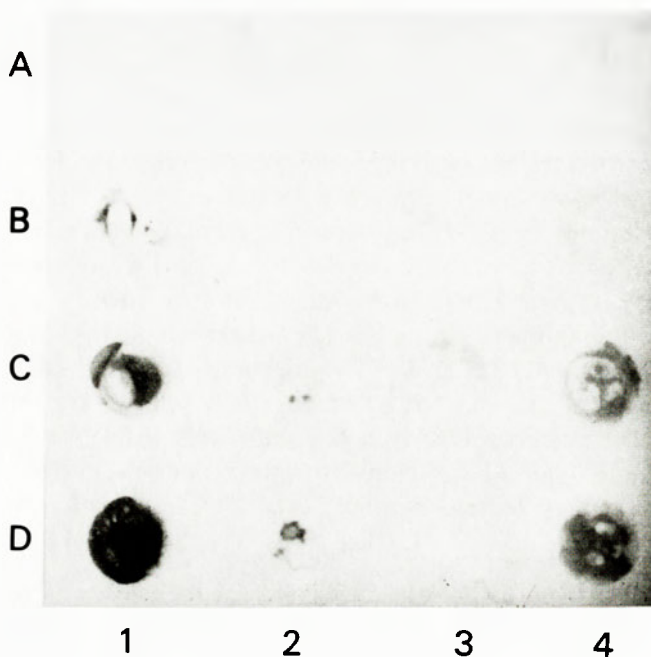
T (ang. *middle T antigen*) tworzą kompleks z winkulina, powodując dezorganizację sieci filamentów aktynowych.

W miejscach kontaktu komórek z podłożem wykryto również produkty innych onkogenów wykazujących aktywność kinazy tyrozynowej (np. *c-abl* i *c-yes*) [29, 30]. Może to tłumaczyć zmiany adhezywności komórek po transformacji. Funkcja białek hybrydowych (produktów *trk* i *c-fgr*) jest słabo poznana, lecz przypuszcza się, że mogą one pełnić rolę elementów cytoszkieletu, zakłócając tworzenie prawidłowego "utkania" włókien aktynowych, podobnie jak w przypadku zmutowanej β -aktyny w komórkach transformowanych chemicznie [18]. Zmiany zachodzące w mikrotubulach po transformacji nowotworowej [31, 32] związane są najczęściej z zachwianiem równowagi pomiędzy formą spolimeryzowaną i wolną tubuliną (*dimery tubulinowe*).

W wyniku oznaczeń radioimmunologicznych przeprowadzonych w pracowniach Webera [33] i Meana [34], nie stwierdzono różnic w poziomie tubuliny w komórkach prawidłowych i transformowanych.

Ryc. 2. Immunoenzymatyczna detekcja β -tubuliny we frakcjach białek cytoplazmatycznych z fibroblastów sznurczkiej linii NRK oraz transformantów opornych na Geneticin G-418, otrzymanych po transfekcji przy użyciu DNA z komórek raka sutka człowieka i plazmidu pSV2neo.

Białka cytoplazmatyczne immobilizowano punktowo na membranie nitrocelulozowej przy użyciu aparatu do punktowego nanoszenia prób MiniFold I (Schleicher & Schuell). Miejsca niespecyficznego wiązania blokowano 0,5% odczynnikiem blokującym firmy Boehringer Mannheim. Do immunodetekcji użyto przeciwciał monoklonalnych anti- β -tubulin (Amersham), biotynylowanych przeciwciał przeciw mysim IgG (Amersham), kompleksu streptawidyna-biotynylowana peroksydaza (Amersham) oraz substratu, 4-chloro-1-naftolu (Aldrich). Kolumna oznaczona 1 przedstawia ekspresję tubuliny w komórkach NRK przed transfekcją, kolumny 2, 3, 4 w trzech różnych liniach transformantów. Szeregi A, B, C, D odpowiadają rozcieńczeniu nanoszonych białek cytoplazmatycznych, odpowiednio: A-1:50, B-1:25, C-1:5, D-1:1. W punkcie D3 naniesiono 1% roztwór BSA jako kontrolę negatywną.



zaobserwowano jednak, że w wyniku transformacji następuje 2-krotny wzrost poziomu kalmoduliny [34], która powoduje depolimeryzację mikrotubul. Badania ekspresji tubuliny (niepublikowane), wykonane w naszym laboratorium metodą immunoenzymatycznej detekcji białek cytoplazmatycznych immobilizowanych punktowo na membranie nitrocelulozowej, wykazały nieznaczne obniżenie poziomu β -tubuliny w komórkach 2 linii NRK (*normal rat kidney*), do których wprowadzono DNA z komórek raka sutka człowieka (Ryc. 2). Jednocześnie przy użyciu techniki immunofluorescencji stwierdziliśmy, że w uzyskanych hodowlach transformantów dochodzi do wzrostu ekspresji tubuliny w komórkach, które uległy wyraźnym zmianom morfologicznym (kształt kulisty) i są zdolne do wzrostu wielowarstwowego (Ryc. 3).

Za pomocą metod immunofluorescencyjnych i technik mikroskopowo-elektronowych [35, 36, 37] stwierdzono strukturalne interakcje pomiędzy mikrotubulami (MT) i mikrofilamentami (MF) (Ryc. 4). W komórkach transformowanych tsRSV w temperaturze permissywnej następowało rozerwanie połączeń pomiędzy MT i MF [35]. Skłania to do przypuszczeń, że pp60^{src} może powodować fosforylację białka MAP2 (ang. *microtubule associated protein*), odpowiedzialnego za tworzenie kompleksu MT-MF [38, 39, 40], prowadząc do oddzielenia tych elementów cytoszkieletu (Ryc. 4).

Procesowi polimeryzacji tubuliny oraz tworzenia wzajemnych powiązań pomiędzy filamentami aktynowymi towarzyszy hydroliza GTP (w przypadku mikrotubul) i ATP (w przypadku mikrofilamentów) [41], co świadczy o roli tych nukleotydów w regulacji stabilności cytoszkieletu. Obecnie przyjmuje się, że najbardziej prawdopodobnym sposobem oddziaływania ATP na cytoszkielet jest interakcja z białkami związanymi z mikrotubulami i mikrofilamentami, winkulina i filamina, które ulegają fosforylacji [41], (Ryc. 4). Założenie to jest zgodne z wynikami badań, wskazujących na zmiany aktywności cAMP-zależnej kinazy białkowej podczas polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul [42]. Na tej podstawie możliwe jest również wyjaśnienie zmian zachodzących w cytoszkielecie komórek transformowanych onkogenami, których produkty wykazują aktywność kinaz białkowych [43]. Udział w reorganizacji cytoszkieletu przypisuje się również białkom G (białka wiążące GTP) [44], do których należy produkt onkogenów z rodziny *ras*, białko p21 [45]. Znaczenie mechanizmu działania białek G w procesie transformacji nowotworowej wydaje się szczególnie istotne w świetle wyników badań wskazujących na to, że większość genów transformujących zidentyfikowanych dotąd w komórkach nowotworowych należy do rodziny *ras* [46].

Ostatnio [44] przedstawiono próbę wyjaśnienia roli białek G w transbłonowym przewodzeniu sygnałów z receptorów powierzchni komórki. Neer i Clapham [44] uważają, że przewodzenie bodźca dostar-

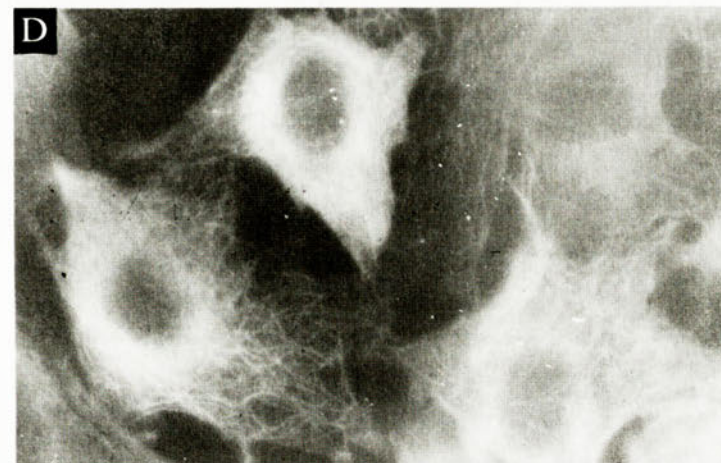
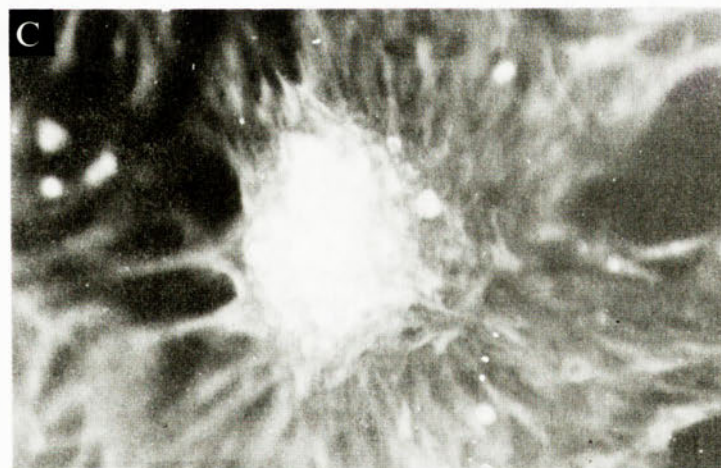
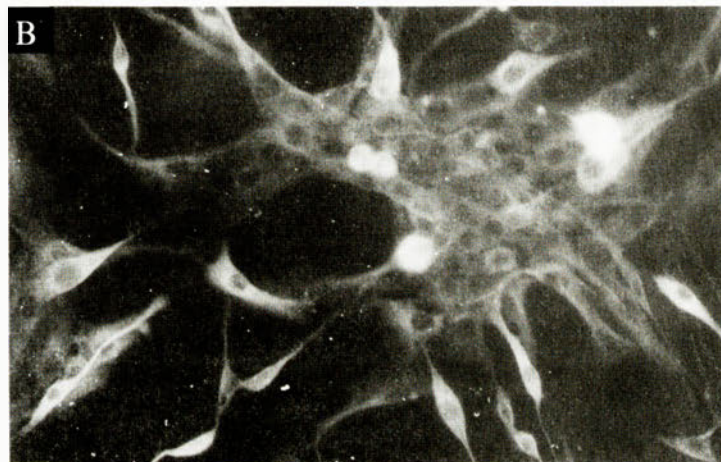
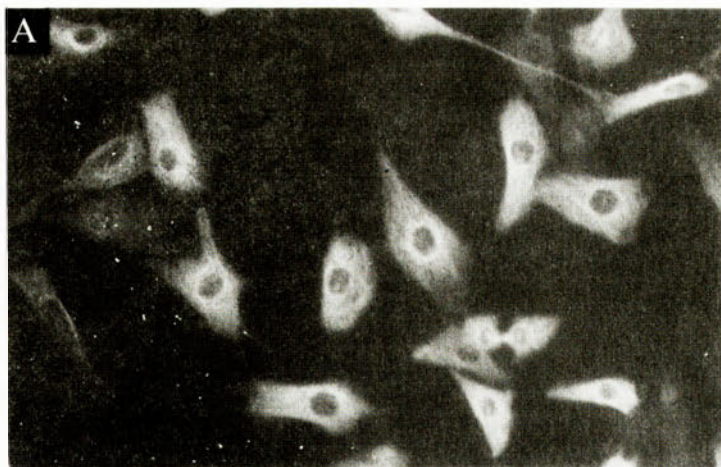
Ryc. 3. Immunofluorescencyjna ocena ekspresji tubuliny w prawidłowych komórkach NRK oraz transformantach otrzymanych po wprowadzeniu DNA z komórek raka sutka człowieka. A - fibroblasty NRK przed transfekcją; B, C, D - utkanie włókien tubulinowych w transformantach.

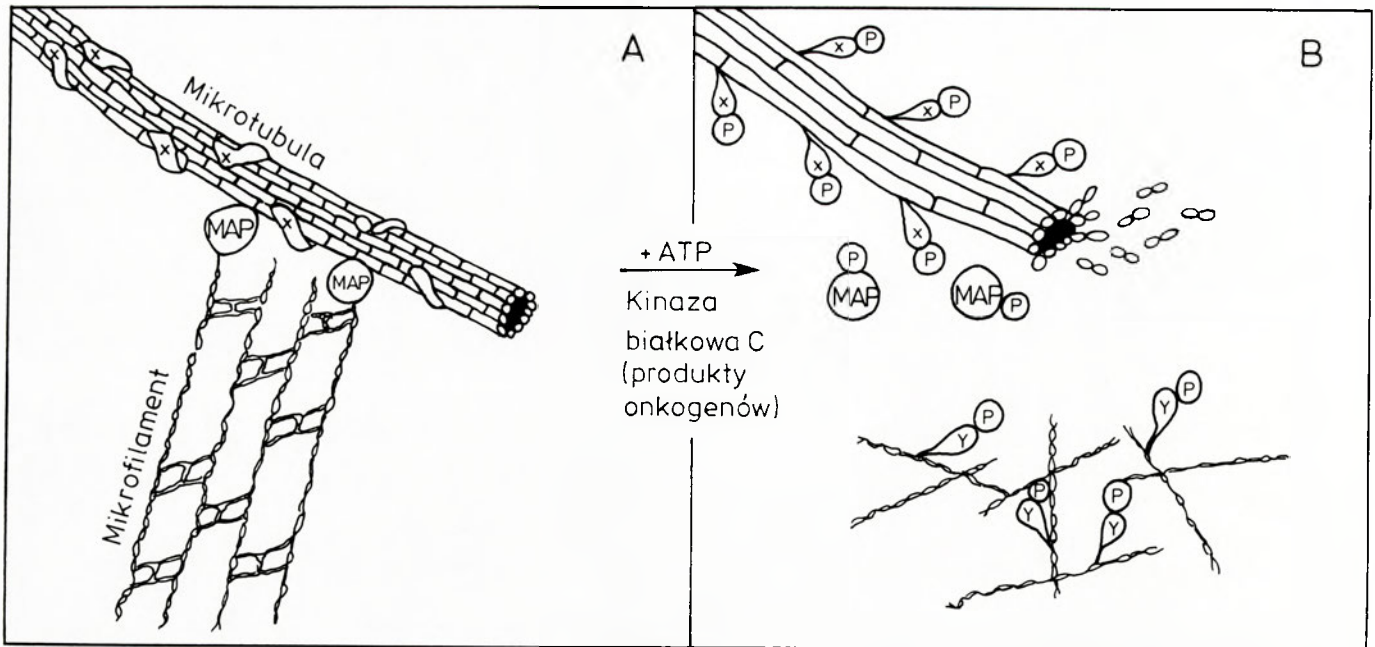
Komórki rosące na szkiełkach nakrywkowych ekstrahowano 0,5% roztworem Tritonu X-100. Do immunodetekcji użyto przeciwciał monoklonalnych anty- β -tubulinowych (A, B) oraz anty- α -tubulinowych (C, D) (Amersham) oraz biotynylowanych przeciwciał przeciw mysim IgG (Amersham) i streptawidyny skoniugowanej z fluoresceiną (Amersham).

czanego przez agonistę prowadzi do połączenia podjednostki białka G z receptorem, oddysocjowania podjednostki i aktywacji efektora, którym jest cyklaza adenylowa lub kanały jonowe w błonie, z równoczesną interakcją z cytoszkieletem (Ryc. 5). Można przypuszczać, że mutacje punktowe, stwierdzone w onkogenach *ras* w komórkach nowotworowych [47, 48], prowadzą do zaburzeń w funkcjonowaniu tego systemu i w efekcie do obniżenia zdolności komórek do odpowiedzi na sygnały dopływające z receptorów powierzchniowych. Przedstawiony na Ryc. 5 model pobudzenia efektorów błonowych po zadziałaniu czynnika hormonopodobnego przez związane z cytoszkieletem białka G, potwierdza cytowane wcześniej założenia koncepcji Edelmana [5].

Zgromadzone dotychczas dane doświadczalne wskazują na aktywny udział mikrofilamentów i mikrotubul w transformacji nowotworowej większości badanych komórek, mniej jednak wiadomo o zmianach jakim ulega trzeci element cytoszkieletu, filamenty pośrednie. Komórki nowotworowe przejawiają tkankowo specyficzną ekspresję białek budujących filamenty pośrednie (desmina, wimentyna, cytokeratyny, GFAP) [3, 49]. Ustalenie składu chemicznego filamentów pośrednich stanowi niejednokrotnie podstawową metodę określenia pochodzenia nowotworu i właściwej diagnozy [50, 62]. Ostatnio zauważono jednak [63], że wimentyna może być cytoszkieletalnym substratem kinazy białkowej C, a więc również produktów niektórych genów transformujących. Wykazano bowiem, że w efekcie podania estrów forbolu (kokancerogen chemiczny blokujący różnicowanie) do hodowli komórek, następuje wzrost aktywności związanej z błoną kinazy białkowej oraz wzrost włączenia ^{32}P z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ do wimentyny [63, 64].

Podsumowując przedstawione informacje należy stwierdzić, że podczas transformacji nowotworowej komórek zachodzą istotne zmiany w organizacji cytoszkieletu i w interakcjach pomiędzy różnymi jego elementami. Objawiają się one szczególnie wyraźnie w odmiennej organizacji przestrzennej mikrofilamentów i mikrotubul oraz redukcji ilości połączeń pomiędzy nimi. Dotyczą również dezorganizacji płytek adhezyjnych i ich składników, co wpływa na uwalnianie fibronektyny z powierzchni komórek, rozrywanie połączeń filamentów aktynowych z błoną i w efekcie na zmianę kształtu komórki i obniżoną adhezywność. Molekularne podłoże tych zmian pozostaje w związku





Ryc. 4. Prawdopodobny mechanizm kontroli stabilności mikrotubul i mikrofilamentów zależny od fosforylacji białek związanych z cytoszkieletem. A - mikrotubule i mikrofilamenty w postaci spolimeryzowanej; B - rozerwanie wzajemnych połączeń i depolimeryzacja mikrotubul i mikrofilamentów w wyniku fosforylacji; X, Y - białka związane z mikrotubulami i mikrofilamentami, np. winkulina i filamina; MAP - (ang. *microtubule associated protein*) - białka uczestniczące w interakcjach mikrotubul z mikrofilamentami.

Przygotowano na podstawie pozycji literaturowych nr 35-41

Ryc. 5. Schemat mechanizmu działania białek G po połączeniu agonisty z receptorem błonowym. A - agonista; R - receptor; AC - cyklaza adenylova; JC - kanał jonowy; α , β , γ - podjednostki białka G; CS - cytoszkielet.

Przygotowano na podstawie pozycji literaturowej nr 44.

z ekspresją białkowych produktów niektórych onkogenów, które powodują fosforylację elementów cytoszkieletu lub białek z nim związanych. Efektem są zaburzenia w przewodzeniu sygnałów wzrostu i różnicowania.

Artykuł napisano w ramach prac finansowanych z CPBR 3.13.3

Artykuł otrzymano 15 października 1988 r.
Zaakceptowano do druku 19 października 1989 r.

Piśmiennictwo

1. Weber K., Osborn M., (1982), *Path. Res. Pract.*, **175**, 128-145.
2. Porter K.R., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 3-12.
3. Ben-Ze'ev A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **780**, 197-212.
4. Wolosewick J.J., Porter K.R., (1979), *J. Cell Biol.*, **82**, 114-139.
5. Edelman G.M., (1976), *Science*, **192**, 218-226.
6. Heldin C.-H., Betsholtz A., Johnsson A., Nister M., Ek B., Ronnstrand L., Westesson A., Westermark B., (1985), *J. Cell Sci. Suppl.*, **3**, 65-76.
7. Douward J., Yarden Y., Mayes E., Serace G., Totty N., Stockwell P., Ullrich A., Schlessinger J., Waterfield M.D., (1984), *Nature (Lond.)*, **307**, 521-527.
8. Bergmann C.L., Hung M.C., Weinberg R.A., (1986), *Nature (Lond.)*, **319**, 226-229.
9. Sefton B.M., (1985), *Trends Genet.*, **1**, 306-308.
10. Weinberg C., Thompson C.C., Ong E.S., Lebo R., Gruol D.J., Evans R.M., (1986), *Nature (Lond.)*, **324**, 641-646.
11. Puck T.T., (1987), *Som. Cell Mol. Genet.*, **13**, 451-457.
12. Bannasch P., Zerban H., Mayer D., (1982), *Path. Res. Pract.*, **175**, 196-211.

13. Bronty-Boyd D., Tucker R.W., Folkman J., (1980), *Int. J. Cancer*, **26**, 501-507.
14. Raz A., Ben-Ze'ev A., (1983), *Science*, **221**, 1307-1310.
15. Wang E., Goldberg A.R., (1978), *J. Histochem. Cytochem.*, **26**, 745-749.
16. Pollack R., Osborn M., Weber K., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 994-998.
17. Carley W.W., Barak L.S., Webb W.W., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 797-802.
18. Leavitt J., Ng S.-Y., Aebi U., Varma M., Latter G., Burbeck S., Kedes L., Gunning P., (1987), *Mol. Cell Biol.*, **7**, 2456-2457.
19. Leavitt J., Latter G., Lutomski L., Goldstein G., Burbeck S., (1986), *Mol. Cell Biol.*, **6**, 2721-2726.
20. Martin-Zanca D., Hughes S.H., Barbacid M., (1986), *Nature (Lond.)*, **319**, 743-748.
21. Naharro G., Robbins K.C., Reddy P.E., (1983), *Science*, **223**, 63-66.
22. Edelman G.M., Yahara I., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2047-2051.
23. McNutt N.S., Culp L.A., Black P.H., (1973), *J. Cell Biol.*, **56**, 412-428.
24. Witt D.P., Brown D.J., Gordon J.A., (1983), *J. Cell Biol.*, **96**, 1766-1771.
25. Burr J.G., Dreyfuss G., Penman S., Buchanan J.M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3484-3488.
26. Rohrschneider L.R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3514-3518.
27. Sefton B.M., Hunter T., Ball E.H., Singer S.J., (1981), *Cell*, **24**, 165-174.
28. Ballmer-Hofer K., Ziegler A., Burger M.M., (1988), *Oncogene*, **3**, 365-371.
29. Rohrschneider L.R., Najita L., (1984), *J. Virol.*, **51**, 547-552.
30. Gentry L., Rohrschneider L.R., (1984), *J. Virol.*, **51**, 539-546.
31. Brinkley B.R., Fuller G.M., Highfield D.P., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4981-4985.
32. Denk H., Krepler R., (1982), *Path. Res. Pract.*, **175**, 180-195.
33. Hiller G., Weber K., (1978), *Cell*, **14**, 795-804.
34. Chafouleas J.C., Pardue R.L., Brinkley B.R., Dedman J.R., Means A.R., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 996-1000.
35. Ball E.H., Singer S.J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6986-6990.
36. Pollard T.D., Selden S.C., Maupin P., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 33s-37s.
37. Weber K., Osborn M., (1985), *Sci. Am.*, **253**, 110-120.
38. Valle R.B., Bloom G.S., Theurkauf W.E., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 38-44.
39. Bloom G.S., Luca F.C., Valle R.B., (1985), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **455**, 18-29.
40. Sloboda R.D., Gilbert S.P., (1989) w Cell Movement, Vol. 2: Kinesin, Dynein, and Microtubule Dynamics, str. 223-232, Alan R. Liss, Inc., New York.
41. Bersnatsky A.D., Gelfand V.I., (1983), *Cell Biol. Int. Rep.*, **7**, 173-187.
42. Valle R.B., DiBartolomeis M.J., Theurkauf W.E., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 568-576.
43. Sefton B.M., Hunter T., Nigg E.A., Singer S.J., Walter G., (1982), *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, **46**, 939-951.
44. Neer E.J., Clapham D.E., (1988), *Nature (Lond.)*, **333**, 129-134.
45. Hurley J.B., Simon M.I., Teplow D.B., (1986), *Science*, **226**, 860-863.
46. Barbacid M., (1986), *Trends Genet.*, **2**, 188-192.
47. Sekiya T., Prassolov V.S., Fushimi M., Nishimura S., (1985), *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 851-855.
48. Veeneman G.H., Van der Eb A.J., van Boom J.H., Janssen J.W.G., Steenvoorden A.C.M., (1985), *Nature (Lond.)*, **315**, 726-730.
49. Nagle R.B., (1988), *Am. J. Surg. Pathol.*, **12**, Suppl. 1, 4-16.
50. Osborn M., Weber K., (1986), *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 469-472.
51. Gown A.M., Vogel A.M., (1985), *Am. J. Clin. Pathol.*, **84**, 413-424.
52. Osborn M., Weber K., (1982), *Cell*, **31**, 303-306.
53. Bolen J.W., McNutt M.A., (1987), *Ultrastruct. Pathol.*, **11**, 175-189.
54. Rungger-Brandle E., Gabbiani G., (1983), *Am. J. Pathol.*, **110**, 361-392.
55. Caselitz J., Osborn M., Wustrow J., Seifert G., Weber K., (1982), *Path. Res. Pract.*, **175**, 266-278.
56. Denk H., Krepler R., Artlieb U., Babbianti G., Rungger-Brandle G., Leoncini P., Franke W.W., (1983), *Am. J. Pathol.*, **110**, 193-208.
57. Krepler R., Denk H., Artlieb U., Fichtinger E., Davidovits A., (1980), *Path. Res. Pract.*, **175**, 212-216.
58. Altmansberger M., Osborn M., Weber K., Schauer A., (1982), *Path. Res. Pract.*, **175**, 227-237.
59. Ramaekers F.C.S., Haag D., Kant A., Moesker O., Jap P.H.K., Vooijs G.P., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2618-2622.
60. Gabbiani G., Kapanci Y., Barazzone P., Franke W.W., (1981), *Am. J. Pathol.*, **104**, 206-216.
61. Altmansberger M., Osborn M., Treuner J., Holscher A., Weber K., Schauer A., (1982), *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, **39**, 203-215.
62. Altmansberger M., Weber K., Holscher A., Schauer A., Osborn M., (1982), *Lab. Invest.*, **46**, 520-526.
63. Huang C.-K., Devanney J.F., Kennedy S.P., (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 1006-1011.
64. Huang C.-K., Devanney J.F., Kanaho Y., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 242-250.



praca - employment

Uwaga, absolwenci i młodzi pracownicy nauki, otwiera się możliwość stażu doktoranckiego w Instytucie Biologii Molekularnej Austriackiej Akademii Nauk w Salzburgu w laboratorium Dr. Apolinarego Sobieszka. Tematyka pracy „Kinetyka fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny”. Chętni proszeni są o skontaktowanie się z Dr. Dariuszem Stępkowskim, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie tel. 659-85-71 w. 318.

★ ★ ★

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Rakowiecka 36 w Warszawie,
zatrudni biochemika, mikrobiologa lub genetyka.
Temat: „Molekularna regulacja glikozylotransferaz”.
Dobre warunki dla właściwej osoby.
Wiadomość: Zakład Fosfolipidów
tel. 49-04-15 (w godz. 9-16)

Każde zlecenie realizujemy z jednakową starannością i sprawnością

BIURO HANDLU ZAGRANICZNEGO RIVER

importuje szybko i solidnie :

- różnego rodzaju aparaturę badawczo-pomiarową
- sprzęt i urządzenia laboratoryjne w tym: mikroskopy, urządzenia do chromatografii, młynki i miazadła
- odczynniki chemiczne, diagnostyczne, testy analityczne
- preparaty biochemiczne, mikrobiologiczne i immunologiczne

Przy realizacji transakcji importowych współpracujemy z wieloma renomowanymi firmami zagranicznymi.



Zakłady Usługowo-Wytwórcze RIVER Sp. z o.o.
Biuro Handlu Zagranicznego
31-148 Kraków ul. Wroblewskiego 5
tel. (12) 33-66-76 fax (12) 33-66-76 telex 32-65-01 river pl

Zapraszamy do korzystania z naszych usług.

Reakcje leku przeciwnowotworowego: cis-diaminodichloroplatyny (II) z DNA

Reactions with DNA of an antitumour drug cis-diamminedichloroplatinum (II)

RYSZARD OLIŃSKI¹

TOMASZ HUBERT ZASTAWNY²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biologiczne efekty działania cis-DDP wskazujące na DNA jako główny akceptor leku.
- III. Zasady azotowe jako główny akceptor kompleksów platyny.
- IV. Modele specyficznych połączeń platyny z DNA
 - IV-1. Międzyznicowe wiązania krzyżowe
 - IV-2. Wewnątrznicowe wiązania krzyżowe
 - IV-3. Tworzenie chelatu z udziałem jednej zasady
 - IV-4. Wiązania krzyżowe DNA-Pt-białko
- V. Naprawa uszkodzeń indukowanych działaniem cis-DDP
 - V-1. Enzymy wycinające addukty platyny z DNA
- VI. Komórkowe mechanizmy oporności na działanie cis-DDP
 - VI-1. Hamowanie transportu cis-DDP przez błonę komórkową
 - VI-2. Rola glutationu
 - VI-3. Tolerowanie nienaprawionych uszkodzeń
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Biological effects of cis-DDP pointing to DNA as a target molecule
- III. Heterocyclic bases as a main binding sites of Pt compounds
- IV. Modes of specific interactions of Pt compounds with DNA
 - IV-1. Interstrand crosslinks
 - IV-2. Intrastrand crosslinks
 - IV-3. Formation of chelate on a single base
 - IV-4. DNA-protein crosslinks
- V. Enzymes responsible for excision of cis-DDP adducts
- VI. Mechanisms of cells resistance to cis-DDP
 - VI-1. Inhibition of cis-DDP transport across the membrane
 - VI-2. Role of glutathione
 - VI-3. Tolerance of unrepaired DNA lesions
- VII. Concluding remarks

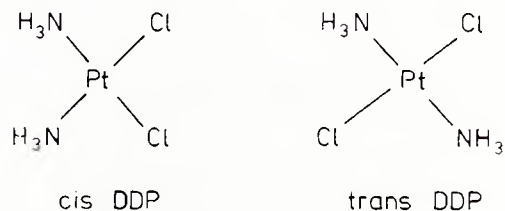
Wykaz stosowanych skrótów:

cis-DDP — cis-diaminodichloroplatyna (II), ELISA — enzymoimmunologiczna metoda fazy stałej, NMR — jądrowy rezonans magnetyczny, trans-DDP — trans-diaminodichloroplatyna (II), numerację atomów w zasadach azotowych oznaczono wskaźnikiem u góry np. N⁷G — atom 7 w cząsteczce guaniny

I. Wstęp

W 1965 roku Rosenberg zaobserwował, że cis-diaminodichloroplatyna (II) (cis-DDP) powoduje zahamowanie podziałów komórkowych i włóknikowy wzrost komórek *E.coli* [1]. Obserwacja ta wkrótce doprowadziła do zainicjowania badań nad użyciem cis-DDP i innych kompleksów platyny w terapii przeciwnowotworowej. Początkowe badania wykazały, że cis-DDP ma znaczną aktywność przeciwnowotworową w przypadku mięsaka S-180 i białaczki L1210 [2, 3]. Po licznych próbach laboratoryjnych, w których wykazano użyteczność cis-DDP w terapii nowotworów, związek ten w 1972 roku został wprowadzony do prób klinicznych [3]*. Właściwości terapeutyczne cis-DDP zadecydowały o tym, że w 1984 roku był to jeden z częściej używanych leków przeciwnowotworowych [4, 5].

Dość powszechnie przyjmuje się, że za aktywność przeciwnowotworową cis-DDP odpowiedzialna jest interakcja tego związku z DNA [3, 4, 6, 7, 8].



Wzór I. Wzory strukturalne cis i trans-DDP

II. Biologiczne efekty działania cis-DDP wskazujące na DNA jako główny akceptor leku.

Chemiczne podobieństwo cis-DDP do dwufunkcyjnych związków alkilujących prowadziło do hipotezy, że za właściwości biologiczne tego i innych kompleksów Pt odpowiada ich zdolność reagowania z DNA. Zasadność powyższej hipotezy znalazła potwierdzenie

* — Problemy zastosowania związków platyny w terapii przeciwnowotworowej zostały omówione w artykule J. Kuduk — Jaworskiej (1984), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **38**, 281-322.

¹Doc.dr hab., ²mgr, Zakład Biochemii Klinicznej AM w Bydgoszczy, ul. Curie-Skłodowskiej 9, 85-317 Bydgoszcz.

w następujących obserwacjach dotyczących biologicznych efektów działania cis-DDP:

1. Cis-DDP wzbudza włóknikowy wzrost bakterii *E. coli* na skutek hamowania podziałów komórkowych [1]. Zastosowanie izotopu Pt¹⁹¹ wykazało, że temu efektowi towarzyszy przyłączanie się platyny do kwasów nukleinowych i białek [9].

2. Wyniki badań cytologicznych sugerują, że cis-DDP lokuje się w jądrze w postaci związanej z DNA [17, 18].

3. W warunkach niskiej cytotoksyczności następuje selektywne hamowanie syntezy DNA bez podobnego wpływu na syntezę RNA i białka [10]. Hamowanie syntezy DNA okazało się wynikiem reakcji cis-DDP z matrycowym DNA, nie stwierdzono natomiast inaktywacji polimerazy DNA [11].

4. Cis-DDP w bardzo niskich stężeniach (0,1 μM) wzbudza indukcję profagów [12]. Wykazano też zależność między przeciwnowotworową aktywnością związków platyny i ich zdolnością do wytwarzania profagów w lizogennych komórkach *E. coli* [12].

5. Cis-DDP powoduje mutacje zarówno w organizmach prokaryotycznych jak i eukaryotycznych, podczas gdy izomer trans stanowi mało aktywny mutagen [13, 14]. Używając testu Amesa wykazano, że cis-DDP i jej pochodne działają bezpośrednio bez wstępnej aktywacji metabolicznej; za ich efekt mutageny odpowiedzialna jest substytucja par zasad [15, 16].

III. Zasady azotowe jako główny akceptor kompleksów platyny w cząsteczce DNA

Znaczenie decydujące o aktywności biologicznej kompleksów platyny mają ich addukty z zasadami azotowymi, chociaż z niektórych doświadczeń wynika, że możliwa jest także ich reakcja z resztą kwasu fosforowego [6, 19], lub (2) cząsteczką cukru [8]. Na podstawie badań przeprowadzonych w ostatnich latach z zastosowaniem spektrometrii ramanowskiej i NMR, miejsca wiązania związków platyny w cząsteczkach zasad azotowych można uporządkować zgodnie z ich reaktywnością w środowisku obojętnym w następujący sposób: N⁷ – G > N⁷ – A > N¹ – A > N³ – C [6, 7, 8]. W pH obojętnym tymina i uracyl nie reagowały ze związkami platyny [7].

IV. Modele specyficznych połączeń platyny z DNA

Obydwa izomery DDP mają po dwie reaktywne grupy Cl⁻, a więc do centralnego atomu Pt mogą być przyłączone dwa ligandy pochodzące z jednej lub dwu zasad azotowych cząsteczki DNA (Ryc. 1). Reakcja wymiany obu ligandów DDP z DNA może przebiegać w różny sposób:

1. Połączenie dwóch zasad azotowych pochodzących z przeciwległych nici DNA wytworzy między-

niciowe wiązanie krzyżowe [20, 21, 22].

2. Reakcja kompleksów platyny z dwiema zasadami azotowymi, pochodzącymi z tej samej nici podwójnego heliksu DNA prowadzi do powstania wewnątrznicowych wiązań krzyżowych [23, 24, 25, 26, 27].

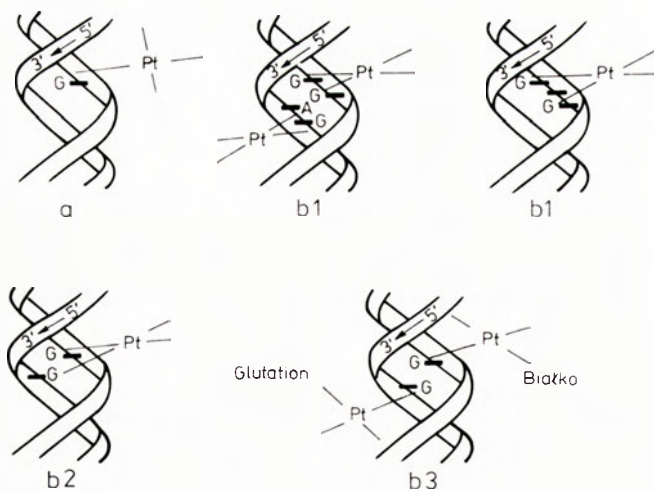
3. Z teoretycznego punktu widzenia możliwe jest utworzenie wiązania chelatowego cis-DDP z udziałem jednej zasady: między grupą NH₂ i N⁷ lub grupą NH₂ i N¹ adeniny i N⁷ i O⁶ cząsteczki guaniny [26, 28, 29, 30].

4. W wyniku reakcji związków platyny z DNA w obecności białek jądrowych lub glutationu powstają wiązania krzyżowe DNA-Pt-białko (DNA-Pt-glutation) [31, 32, 33, 34, 35].

IV-1. Międzyniciowe wiązania krzyżowe

Z badań przeprowadzonych metodą elucji alkalicznej, jak również z doświadczeń opartych na technice Meselsona-Stahla wynika, że międzyniciowe wiązania krzyżowe reprezentują mniej niż 1% całkowitej ilości adduktów Pt-DNA [36, 37, 38, 39]. Wiązania takie mogą się utworzyć głównie w obszarach DNA wzbogaconych w pary GC [40, 41]. Sugeruje to możliwość powstawania wiązań między guaniną i cytozyną [42] albo między dwiema resztami guaniny w przeciwległych niciach DNA [43]. Ta druga możliwość jest bardziej prawdopodobna ponieważ platyna wiąże się przeważnie z atomem N⁷ guaniny. Ciekawa metoda izolowania i charakteryzowania adduktów tworzących wiązania międzyniciowe, została przedstawiona przez Eastmana [40]. Ponieważ międzyniciowe wiązania krzyżowo znacznie ułatwiają renaturację DNA, izolowano frakcje wzbogacone w takie właśnie wiązania. Następnie jednoniciowy DNA trawiono deoksyrybonukleazą S1 (z *Neurospora crassa*), a frakcje DNA dwuniciowego strącano za pomocą kwasu nadchlorowego. Otrzymane frakcje trawiono enzymatycznie do nukleotydów i rozdzielano techniką HPLC [40]. Frakcje, w których wymywane były dwufunkcyjne addukty cis-DDP z nukleotydami reprezentowały międzyniciowe wiązania krzyżowe. Z badań tych wynikało, że międzyniciowe wiązania krzyżowe powstają głównie między dwiema zasadami guaninowymi, a do powstania takiego wiązania konieczne jest rozerwanie wiązań wodorowych obu guanin i ich rotacja w kierunku mniejszego rowka DNA [40] (Ryc. 1). Pociąga to za sobą deformację szkieletu fosfocukrowego (*kink*).

Niektórzy badacze próbowali tłumaczyć cytotoksyczność kompleksów platyny obecnością międzyniciowych wiązań krzyżowych. Zależność taką udało się wykazać w przypadku niektórych linii komórkowych [34, 35, 44, 45]. Brak bezpośredniego związku między cytotoksycznością cis-DDP, a obecnością międzyniciowych wiązań krzyżowych sugerują wyniki uzyskane z badań na komórkach białaczkowych myszy, wrażliwych i opornych na cis-DDP [47]. Również w wielu



Ryc. 1. Modele specyficznych połączeń DDP z DNA:
 a) monoaddukty,
 b) połączenia bifunkcyjne:
 -b1- wewnątrzniowe wiązania krzyżowe,
 -b2- międzycząsteczkowe wiązania krzyżowe,
 -b3- międzycząsteczkowe wiązania krzyżowe:
 DNA-DDP-białko i DNA-DDP-glutation

innych badaniach nie udało się potwierdzić takiej zależności [27, 46, 47, 48, 49].

IV-2. Wewnątrzniowe wiązania krzyżowe

Z punktu widzenia stereochemii możliwość wytwarzania wewnątrzniowych wiązań krzyżowych między sąsiadującymi zasadami powinien mieć tylko izomer cis. Odległość między dwoma labilnymi ligandami Cl^- w cząsteczce cis-DDP jest (3,3Å) niemal dokładnie taka sama jak między dwiema sąsiadującymi zasadami w podwójnym heliksie DNA. Dla porównania podobna odległość w cząsteczce trans-DDP wynosi 4,5Å.

Ponieważ, jak już wspomniano wcześniej, najłatwiej ulega platynacji pozycja N^7 w cząsteczce guaniny należałoby oczekiwać, że sieciowanie dwóch cząsteczek guanin będzie uprzywilejowane podczas reakcji cis-DDP z DNA. Obecność takich produktów reakcji wykazano po raz pierwszy w doświadczeniach, w których DNA wirowano w gradiencie gęstości chlorku cezu i zaobserwowano wzrost gęstości frakcji DNA z przyłączoną cis-DDP [50]. Ten wzrost gęstości był wprost proporcjonalny do zawartości par GC i stosunku Pt/nukleotyd [50]. Doświadczenia z homopolimerem poli (dG) i poli (dC) ujawniły, że po platynacji jego gęstość wzrastała pięciokrotnie w porównaniu z gęstością natywnego DNA [51] co potwierdza, że głównym produktem reakcji jest połączenie cis-DDP z sąsiadującymi zasadami guaninowymi.

Jak się wydaje jednak, nie tylko kompleksy platyny o konfiguracji cis zdolne są do tworzenia wewnątrzniowych adduktów z dwimaguaninami. Również w reakcji trans-DDP z DNA powstają addukty, w których Pt połączona jest poprzez atomy N^7 z dwiema

cząsteczkami guaniny [52]. Odległość między reaktywnymi jonami Cl^- w cząsteczce trans-DDP czyni jednak mało prawdopodobną możliwość wytwarzania połączeń między sąsiadującymi zasadami w tych adduktach. Są to raczej kompleksy, w których cząsteczki guaniny oddzielone są trzecią zasadą.

Zastosowanie metod chromatograficznych i NMR pozwoliło na dokładniejsze scharakteryzowanie natury wewnątrzniowych wiązań krzyżowych. Po reakcji dinukleotydu GpG z cis-DDP zaobserwowano obecność wiązania między atomami N^7 każdej z dwu cząsteczek guaniny [53, 54]. Oprócz powstawania adduktów poprzez dwa atomy N^7 guanin zaobserwowano również wiązanie Pt z N^1 adeniny [55]. Platynacja krótkich oligonukleotydów zawierających sekwencje G-G lub sekwencje, w których guaniny oddzielone były trzecią zasadą, również prowadziła do powstania wiązań wewnątrzniowych pomiędzy pozycjami N^7 dwóch guanin [56, 57, 58, 59].

Chromatograficzna analiza produktów reakcji cis-DDP z oligonukleotydami i DNA potwierdziła, że najczęściej powstaje addukt złożony z dwóch sąsiadujących ze sobą cząsteczek guaniny [23, 60, 61, 62, 63]. Przy niskim stosunku Pt/nukleotyd ponad 50% wszystkich produktów platynacji stanowią addukty pomiędzy sąsiadującymi guaninami [23, 64]. W platynowanym DNA wykazano również obecność adduktów platyny z dwiema resztami guaniny oddzielnymi trzecią zasadą, jak też obecność podobnych adduktów kompleksu Pt i guaniny z adeniną [23, 40, 43, 63].

Jak wynika z badań przeprowadzonych technikami immunologicznymi również w warunkach *in vivo* głównymi produktami reakcji cis-DDP z DNA mogą być wewnątrzniowe wiązania krzyżowe [65, 66, 67]. Otrzymane przez grupę Poirier [66, 67] przeciwciała rozpoznawały w próbie ELISA tylko kompleksy DNA-cis-DDP. Jednofunkcyjne addukty otrzymane z reakcji związku typu (dien Pt Cl) Cl nie były rozpoznawane przez te przeciwciała. Przeciwciała reagowały ze zmodyfikowanym przez cis-DDP homopolimerem poli (dG) poli (dC) nie dając podobnej reakcji z poli/d(G-C)/poli/d(G-C), co wskazywało na wewnątrzniowe połączenia platyny z dwiema guaninami, jako główną rozpoznawaną przez nie determinantą. DNA izolowany z komórek L1210, inkubowanych z cis-DDP oraz DNA leukocytów pobranych od pacjentów poddanych chemioterapii był także rozpoznawany przez te przeciwciała [66, 67]. Potwierdzono też możliwość rozpoznawania przez swoiste przeciwciała połączeń cis-DDP z dwiema zasadami guaninowymi [65].

Decydującą rolę wewnątrzniowych wiązań krzyżowych w cytotoksycznym działaniu cis-DDP sugerują rezultaty badań Poirier i współautorzy [68]. Znaczną ilość wewnątrzniowych wiązań krzyżowych stwierdzono bowiem w DNA leukocytów pobranych od pacjentów z rakiem jąder skutecznie leczonych cis-DDP. Brak takich adduktów obser-

wowano z reguły w DNA leukocytów chorych, u których nie stwierdzono efektów terapeutycznych [68].

IV-3. Tworzenie chelatu z udziałem jednej zasady

Najbardziej atrakcyjną wydaje się hipoteza według której cis-DDP tworzy koordynacyjne wiązanie między N^7 i O^6 w cząsteczce guaniny. Dane rentgenograficzne i spektroskopowe, wskazują na możliwość utworzenia takiego wiązania [28, 29, 30]. Po przyłączeniu się platyny do N^7 guaniny odległość między atomami Pt i O^6 jest jednak zbyt duża by mogło utworzyć się bezpośrednie wiązanie i zbyt mała aby powstało wiązanie za pośrednictwem cząsteczki H_2O [69].

Na podstawie badań krystalograficznych kompleksu cis-DDP z dodekamerem C-G-C-C-A-A-T-T-C-G-C-G o konformacji podwójnego heliksu, wnioskuje się przemieszczenie pierścienia guaniny w wyniku przyłączenia platyny do N^7 , co umożliwia powstanie następnego wiązania z O^6 za pośrednictwem cząsteczki H_2O [69].

IV-4. Wiązania krzyżowe DNA-Pt-białko

Badania interakcji związków platyny z nukleosomami wykazały, że wiązanie histonów z DNA możliwe jest tylko podczas długiej inkubacji i w obecności wysokich stężeń DDP [70]. Łatwiej natomiast powstają wiązania krzyżowe między białkami niehistonowymi, DDP i DNA. Obecność wiązań krzyżowych DNA-DDP-białka niehistonowe wykazano w doświadczeniach przy zastosowaniu dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Stwierdzono zmianę w obrazie elektroforetycznym białek niehistonowych po inkubacji komórek *HeLa* z cis-DDP [71]. Sieciowanie białek niehistonowych z DNA zaobserwowano po inkubacji jąder komórek L1210 z cis-DDP [72]. Wiązania krzyżowe DNA-Pt-białko stabilizowały strukturę jąder nawet w obecności SDS po ekstrakcji histonów. Ten typ sieciowania ujawniono również stosując metody immunologiczne, w komórkach *HeLa* inkubowanych z cis i trans-DDP [31, 32].

Najczęściej stosowaną metodą pozwalającą na badanie kinetyki tworzenia i naprawy wiązań krzyżowych DNA-białko jest alkaliczna elucja lizatu komórkowego po trawieniu proteinazą K (subtilizyna) [73, 74] co pozwala na odróżnienie wiązań międzyciociowych od wiązań krzyżowych DNA-białko.

Opierając się na tej technice Zwellin g i współautorzy [34, 35, 75] stwierdzili, że wiązania krzyżowe DNA-białko są szybko usuwane, zaś ich obecność nie jest związana z cytotoksycznością związków platyny. Wyniki innych prac, w których dokonano podobnej analizy nie potwierdzają jednak tych spostrzeżeń.

Po inkubacji z cis-DDP zarówno w komórkach

jądnika chomika chińskiego [46], jak i w komórkach białaczkowych myszy wrażliwych na cis-DDP [48] stwierdzono zbieżność występowania obecności wiązań krzyżowych DNA-Pt-białko z cytotoksycznością leku. Na taką zależność wskazuje też praca, w której wykazano znaczny wzrost cytotoksyczności trans-DDP w połączeniu z hipertermią [76]. Jedy- nym efektem biochemicznym takiego połączonego działania, był wzrost ilości wiązań krzyżowych DNA-Pt-białko.

Po dootrzewnowym podaniu szczurom z wątrobia-kiem *Novikoffa* terapeutycznych dawek cis-DDP (7 mg/kg wagi ciała) lub równomolowych dawek trans-DDP, izolowano kompleksy DNA-Pt-białko i testowano je analizując przyłączone antygeny białkowe. Stwierdzono, że są to białka zrębu jądrowego, a wśród nich białka filamentów pośrednich - cyto-keratyny, które są charakterystyczne dla komórek nowotworowych. Za pomocą metody immunochemicznej identyfikacji antygenów białkowych wyzna- czono kinetykę naprawy wiązań krzyżowych DNA-Pt-białko, wykazując różnice w szybkości usu- wania białek z adduktów o konfiguracji cis i trans [77].

V. Naprawa uszkodzeń indukowanych działaniem cis-DDP

Należałoby oczekiwać, że analogicznie do procesów naprawy uszkodzeń DNA wywołanych różnymi czyn- nikami chemicznymi i fizycznymi, również uszkodze- nia DNA, powstające w wyniku działania związków platyny powinny być usuwane przez podobne mecha- nizmami. Jednakże wyniki prac dotyczących usuwania adduktów Pt-DNA przez enzymy naprawcze nie po- zwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Niektóre wyniki badań nad *Escherichia coli* sugeru- ją, że uszkodzenia DNA indukowane przez związki platyny są usuwane zarówno za pomocą mecha- nizmów naprawy przez wycinanie, jak i naprawy rekombinacyjnej [78, 79, 80, 81, 82]. P o p o f f i w s p ó ł a u t o r z y [83] utrzymują, że podstawową drogą usuwania adduktów DDP u *E. coli* jest naprawa przez wycinanie. Ponadto zdaniem cytowanych autorów addukty cis-DDP mogą wywoływać również indukcję systemu SOS. Reperacja tych adduktów wymaga udziału specyficznych białek UvrA, UvrB i UvrC. Komórki bakteryjne mają również zdolność urucha- miania adaptacyjnej naprawy DNA znoszącej letalne i mutagenne skutki działania czynników chemicznych [84]. W pracy G e r m a n i e r a i w s p ó ł a u t o r ó w [85] przedstawiono wyniki badań dwu szczepów *E. coli* BS 21, w których funkcjonował adaptacyjny mechanizm naprawy, oraz szczepu BS 23, pozbawio- nym takiego mechanizmu. Wszystkie charakteryzowa- ły się podobną opornością na cis-DDP [85]. Ilość platyny przyłączonej do DNA była u tych bakterii podobna jak w szczepach *E. coli* o normalnej oporno-

ści na cis-DDP. Nie stwierdzono żadnej zbieżności między opornością na cis-DDP, a opornością na promieniowanie UV [85]. Wnioskuje się więc, że w usuwaniu adduktów cis-DDP-DNA biorą udział mechanizmy niezależne od enzymów naprawy adaptacyjnej, niezależne również od enzymów naprawiających uszkodzenia wywołane działaniem promieniowania UV [85].

Podobnie jak w przypadku komórek bakteryjnych również w komórkach *Eukaryota* stwierdzono możliwość usuwania adduktów platyny z DNA za pomocą naprawy przez wycinanie i naprawy rekombinacyjnej [82, 86, 87]. Niewykluczone, że obydwa te procesy biorą udział w usuwaniu adduktów platyny z DNA [88]. Zdolność do usuwania uszkodzeń DNA przed rozpoczęciem procesu replikacji w znacznej mierze decyduje o oporności na działanie leków przeciwnowotworowych. W badaniach przeprowadzonych przez Meyna i współautorów [89] komórki z defektem mechanizmu naprawy przez wycinanie wykazują również wyższą wrażliwość na mitomycynę C i cis-DDP. Zarówno w komórkach z defektem, jak i kontrolnych, stwierdzono ten sam poziom wiązań krzyżowych bezpośrednio po traktowaniu DDP. Po 24 godzinnej inkubacji poziom wiązań krzyżowych obniżył się o 80% w przypadku komórek ze sprawnym mechanizmem naprawy, natomiast w przypadku komórek z niesprawnym mechanizmem naprawy przez wycinanie następowało usunięcie tylko około 20% wiązań krzyżowych [89].

Większa wrażliwość na związki platyny komórek *HeLa* w porównaniu z komórkami chomika chińskiego znajduje uzasadnienie w obecności w tych ostatnich bardziej wydajnych mechanizmów naprawy rekombinacyjnej [87].

Szczególnie użytecznym układem do badania mechanizmów usuwania adduktów DNA-Pt są komórki niezdolne do sprawnej naprawy uszkodzeń DNA. Klasycznym układem są fibroblasty pochodzące od osób cierpiących na *Xeroderma pigmentosum* oraz na anemię *Fanconiego*. Komórki *Xeroderma pigmentosum* są bardzo wrażliwe na promieniowanie UV, ponieważ nie zawierają sprawnie działających enzymów naprawy przez wycinanie wielu nukleotydów [90, 91]. Fibroblasty pobrane od osób chorych na anemię *Fanconiego* są nadwrażliwe na dwufunkcyjne związki alkilujące [90, 94, 95]. Defekt naprawy w tych komórkach polega na niezdolności do usuwania wiązań krzyżowych [93, 96]. W komórkach tych brak jest prawdopodobnie niektórych enzymów aktywnych w naprawie przez wycinanie niewielu nukleotydów [93]. Wysoka wrażliwość *Xeroderma pigmentosum* na cis-DDP sugeruje, że w procesie naprawy adduktów cis-DDP-DNA biorą udział enzymy aktywne w naprawie DNA uszkodzonego promieniowaniem UV. Podobnie wrażliwe na cis-DDP są jednak komórki anemii *Fanconiego* prawidłowo reagujące na promieniowanie UV. Należałoby przyjąć zatem, że cis-DDP wprowadza kilka rodzajów potencjalnie le-

talnych adduktów, których usuwanie uwarunkowane jest obecnością obu typów mechanizmów naprawy przez wycinanie [97].

Badając oporność nowotworów zarodkowych, wykazano znacznie wyższą ich wrażliwość na terapię cis-DDP w powiązaniu z terapią bleomycyną. Leki te wywołują zmiany zarówno w drugo-, jak i pierwszorzędowej strukturze DNA. Oprócz wiązań krzyżowych związanych z działaniem DDP, bleomycyna wywołuje podwójne pęknięcia DNA. Ponieważ natura tych uszkodzeń wydaje się wymagać działania mechanizmu naprawy rekombinacyjnej, sugeruje to, że embrionalne komórki nowotworowe nie mają zdolności szybkiej naprawy tego typu [98]. Natomiast komórki potworniaków złośliwych (*teratocarcinoma*) wykazują wyższą oporność na cis-DDP w stosunku do komórek prawidłowych, co wskazuje, że enzymy biorące udział w naprawie rekombinacyjnej pojawiają się dopiero w późniejszych stadiach rozwoju osobniczego [98].

Sugeruje się też [99] możliwość istnienia enzymów reperacyjnych charakteryzujących się wysoką specyficznością w stosunku do uszkodzeń indukowanych przez cis-DDP.

V-1 Enzymy wycinające addukty platyny z DNA

Kinetyka usuwania uszkodzeń DNA spowodowanych działaniem cis-DDP jest podobna do kinetyki usuwania adduktów wprowadzonych w wyniku działania różnych czynników alkilujących i promieniowania UV [87]. Szereg badań wskazuje jednak na udział swoistych enzymów naprawczych w obu procesach. I tak endonukleaza zawarta w wyciągu z *Micrococcus luteus* rozpoznaje uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem UV, nie rozpoznaje natomiast adduktów cis-DDP z DNA [100]. Sugeruje to udział w procesie wycinania adduktów Pt-DNA innego typu endonukleazy potrzebnej do zainicjowania procesu usuwania uszkodzeń. W ekstrakcie z *Micrococcus luteus* wykryto również aktywność enzymu usuwającego z DNA metylowaną adeninę [100]. Wycięcie alkilowanej adeniny prowadziło do wytworzenia w DNA labilnych w środowisku alkalicznym miejsc apurynowych. Brak takich miejsc w platynowanym DNA po inkubacji z wyciągiem enzymatycznym *M. luteus*, pozwoliło na wyciągnięcie wniosku, że platynowane zasady azotowe nie są usuwane z DNA przez obecną w tym wyciągu glikozylazę metyloadeniny [101].

Ostatnio wykazano, że zróżnicowana oporność komórek ludzkich kilku linii na pochodne nitrozomocznika zależy od obecności w tych komórkach genów warunkujących fenotyp Mer (*Methylation repair*), programującego syntezę układu enzymatycznego wycinającego O⁶ alkilguaninę [102, 103, 104]. Jednocześnie stwierdzono, że fenotypowi Mer nie towarzyszy oporność na cis-DDP, co raczej wyklucza udział enzymów usuwających O⁶ alkilguaninę w reperacji adduktów Pt-DNA [105].

VI. Mechanizmy oporności komórek na działanie cis-DDP

Z problemami chemioterapii przeciwnowotworowej ściśle związany jest proces nabywania przez komórki nowotworowe oporności na stosowane leki. Badania oporności na cis-DDP poprzedzone były wieloletnimi badaniami mechanizmów działania przeciwnowotworowego DDP, w wyniku których, jak już wspomniano, ustalono, że za aktywność tę odpowiedzialna jest przede wszystkim interakcja leku z DNA. [3, 4, 6, 7, 8].

VI-1 Hamowanie transportu cis-DDP przez błonę komórkową

Jednym z mechanizmów prowadzących do rozwoju oporności komórek na działanie leków może być ograniczenie transportu leku przez błonę komórkową. Niektóre z doniesień sugerują, że ograniczenie transportu cis-DDP do wnętrza komórki może tylko częściowo odpowiadać za oporność [106, 107, 108]. Co do problemu transportu DDP do wnętrza komórki panują rozbieżne opinie. Wcześniejsze doniesienia jako sposób przenikania, przyjmują bierny transport DDP przez błony [3, 4]. Przenikanie DDP przez błony do wnętrza komórki może mieć charakter aktywnego transportu nośnikowego [107], za czym przemawia swoistość zmniejszenia przepuszczalności błony komórkowej dla cis-DDP w przypadku komórek opornych. Nie jest to jednak mechanizm powszechnie akceptowany.

Oporność na cis-DDP jest w niektórych wypadkach połączona z opornością na melfalan i w nieznacznym stopniu na inne czynniki alkilujące jak np. bisulfan [107]. Otrzymano linię komórek SCC25/CP(1) o 12-krotnie wyższej oporności na działanie cis-DDP od linii macierzystej [107]. Komórki te były również odporne na działanie metatreksatu. Uważa się, że rozwój wielolekowej oporności komórek SCC25/CP(1) jest następstwem obniżenia się poziomu absorpcji leku, wzrostu poziomu białek zawierających grupy sulfhydrylowe, jak również wzrostu aktywności S-transferazy glutationowej [107]*.

VI-2. Rola glutationu

Glutation jest jednym z podstawowych związków niebiałkowych zawierających grupy sulfhydrylowe, jaki bierze udział w procesach detoksykacji. Ostatnio podkreśla się rolę glutationu jako ważnego czynnika inaktywującego leki reagujące z DNA. Wykazano istotną rolę tego związku w rozwoju oporności komórek na różne leki i czynniki cytotoksyczne. Podwyższenie poziomu glutationu, można uzyskać po eksponowaniu komórek na działanie leków elektrofilo-

wych, takich jak DDP, cyklofosfamid czy melfalan [108]. Analiza DNA po inkubacji z cis-DDP w obecności glutationu, wykazała obecność nowych adduktów hydrofilowych. Addukty te z reguły stanowią połączenia pomiędzy deoksyguanozyną, Pt i glutationem. Takie addukty mogą powstawać zarówno w wyniku przyłączenia kompleksu glutation-Pt do DNA, jak i po reakcji monoadduktów DNA-Pt z glutationem. Występowanie drugiego z tych mechanizmów wykazano, izolując monoaddukty nie zawierające glutationu po platynacji DNA i późniejszej inkubacji z glutationem [108]. Mechanizm obniżania cytotoksyczności cis-DDP przez glutation nie został jeszcze ustalony. Prawdopodobnie funkcjonują przynajmniej dwa mechanizmy komórkowe regulujące ten proces:

1) cis-DDP wnikając do komórki ulega inaktywacji wiążąc się z grupą sulfhydrylową glutationu i tworząc tioester. Wykazano, że ok. 52% cis-DDP zawartej w cytosolu komórek nerek i wątroby jest zasocjowane w wielkocząsteczkowe frakcje ($m_{cz} < 1000$) połączone z glutationem [109]. Wiązanie DDP zachodzi prawdopodobnie w cytoplazmie [106],

2) glutation redukuje toksyczność DDP przez inaktywację monoadduktów DNA-Pt. Taki mechanizm wyjaśnia potencjalną cytotoksyczność trans-DDP w przypadku drastycznego obniżenia poziomu glutationu w komórce. Addukty trans-DDP z DNA są głównie monofunkcyjne i przegrupowanie w połączenia bifunkcyjne zachodzi znacznie wolniej niż w przypadku cis-DDP. W niektórych układach blisko dwukrotnemu podwyższeniu poziomu glutationu w komórkach towarzyszy znaczny wzrost oporności komórek na cis-DDP [106], długotrwałemu obniżeniu poziomu glutationu wewnątrz komórki może towarzyszyć wzrost wrażliwości [110]. Istotne jest również spostrzeżenie, że wzrost oporności komórek na DDP wywołany podniesieniem poziomu glutationu, uodparnia je także na melfalan [106]. Stąd wniosek, iż glutation w pewnym stopniu może być odpowiedzialny za oporność wielolekową.

VI-3. Tolerowanie nienaprawionych uszkodzeń DNA

Istotnym czynnikiem w rozwoju oporności może być również zdolność do tolerowania uszkodzeń wywołanych działaniem DDP. Wpływ wzrostu poziomu glutationu, jak i obniżenie przepuszczalności błon jest w niektórych wypadkach nieproporcjonalnie niższe od poziomu oporności linii komórkowej. Wydaje się, że może to być związane ze zdolnością do tolerancji uszkodzeń DNA-Pt [106]. Tę hipotezę potwierdzać może obserwacja, że w przypadku równotoksycznych dawek cis-DDP, ilość międzyciniowych wiązań krzyżowych jest w komórkach opornych na lek 15-krotnie wyższa niż w komórkach wrażliwych [108]. Jak dotąd brak jest jednakże wyjaśnienia mechanizmów takiej oporności.

*— Dokładny opis mechanizmów oporności na leki znajdzie czytelnik w artykułach B. Grzelakowskiej-Sztabert (*Post. Biochem.*, (1983), 29, 167-190, oraz *Post. Biochem.*, (1989), 35, zeszyt 4.).

VII. Uwagi końcowe

Mimo długiego czasu jaki upłynął od chwili odkrycia przeciwnowotworowych właściwości cis-DDP i dużej liczby prac poświęconych temu związkowi, mechanizm działania leku nadal nie został dokładnie poznany.

Wydaje się, że istotne znaczenie w zrozumieniu molekularnych podstaw aktywności biologicznej cis-DDP mają różnice występujące w strukturze produktów reakcji cis-DDP i nieaktywnej przeciwnowotworowo trans-DDP z DNA, oraz rola mechanizmów naprawy DNA, usuwających takie uszkodzenia. Wyniki wielu doświadczeń wskazują na bezpośredni związek między cytotoksycznością cis-DDP i skutecznością mechanizmów naprawiających uszkodzenia DNA indukowane tym lekiem [97, 99]. Nie bez znaczenia jest również różna szybkość usuwania adduktów cis i trans-DDP z DNA [46, 111]. Niektórzy zakładają, że addukty z zasadami azotowymi trans-DDP, które znacznie zakłócają uporządkowaną strukturę DNA, są łatwo rozpoznawane i usuwane przez enzymy biorące udział w naprawie DNA [111]. Natomiast niewielkie zmiany strukturalne wprowadzone do DNA przez izomer cis są słabym sygnałem do rozpoczęcia naprawy, jednakże efektywnie hamują replikację DNA, a więc mają silne działanie cytostatyczne. Interesujący ze względu na zastosowanie kompleksów Pt w terapii jest również udział glutationu w detoksykacji komórek normalnych i nowotworowych [106, 107, 110]. Pomyślnie rozwiązanie zasygnalizowanych powyżej zagadnień powinno umożliwić znalezienie odpowiedzi na bardziej podstawowe pytanie: jakie uszkodzenia DNA indukowane przez cis-DDP decydują o aktywności biologicznej leku i w jaki sposób cis-DDP wybiórczo zabija niektóre komórki nowotworowe?

Artykuł otrzymano 24 października 1989r.
Zaakceptowano do druku 31 stycznia 1990r.

Piśmiennictwo

- Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T., (1965). *Nature, (Lond.)*, **205**, 698-699.
- Rosenberg B.L., VanCamp L., Trosko I.E., Mansour V.H., (1969). *Nature, (Lond.)*, **222**, 385-386.
- Rosenberg B., (1977). *Cancer*, **55**, 2303-2316.
- Pinto A.L., Lippard S.J., (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **780**, 167-180.
- Reedijk J., Lohman P.H.M., (1985). *Pharm. Weekbl. (Sci.)*, **7**, 173-180.
- Kleinwachter V., (1978). *Studia Biophys.*, **73**, 1-17.
- Marcelius A.T.M., Reedijk J., (1983). *Recl. Trav. Chim Pays-Bas.*, **102**, 121-129.
- Roberts J.J., Thomson A.J., (1979). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **22**, 71-133.
- Rosenberg B., Renshaw E., Van Camp L., Hartwig J., Drobnik J., (1967). *J. Bacteriol.*, **93**, 716-721.
- Harder H.C., Rosenberg B., (1970). *Int. J. Cancer*, **6**, 207-216.
- Harder H.C., Smith R.G., Leroy A.F., (1976). *Cancer Res.*, **36**, 3821-3829.
- Reslova S., (1971). *Chem.-Biol. Interact.*, **4**, 66-70.
- Beck D.J., Fish J.E., (1980). *Mutation Res.*, **77**, 45-51.
- Zwelling L.A., Kohn K.W., Anderson T.A., (1978). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **19**, 233-244.
- Beck D.J., Popoff S., Sancer A., Rupp W.W., (1985). *Nucleic Acids Res.*, **13**, 7395-7412.
- Monti-Bragadin C., Tamaro M., Banfi E., (1975). *Chem. Biol. Interact.*, **11**, 469-472.
- Makita T., Itagaki S., Ohokawa T., (1985). *Japan J. Cancer Res.*, **76**, 895-901.
- Sumner A.T., (1982). *Histochem J.*, **14**, 293-299.
- Bau R., Gellert R.W., Lehores S.M., Lonie S., (1977). *J. Clin. Hemat. Oncol.*, **7**, 51-60.
- Harder H.C., (1975). *Chem. -Biol. Interact.*, **10**, 27-39.
- Horacek P., Drobnik J., (1971). *Biochim. Biophys. Acta*, **254**, 341-347.
- Pascode J.M., Roberts J.J., (1974). *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1345-1357.
- Eastman A., (1987). *Pharmac. Ther.*, **34**, 155-166.
- Kelman A.D., Buchbinder M., (1978). *Biochimie*, **60**, 893-899.
- Lippard S.J., (1980). *Inorg. Biol. Med.*, **140**, 147-156.
- Mansy S., Rosenberg B., Thompson A.J., (1973). *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1633-1640.
- Shooter K.V., House R., Marrisfield R.K., Robins A.B., (1972). *Chem. -Biol. Interact.*, **5**, 289-307.
- Goodgame D.M.L., Jeeves I., Philips F.L., Skapski A.C., (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, **378**, 153-157.
- Macquet J.P., Theopanides T., (1976). *Inorg. Chim Acta*, **18**, 189-194.
- Rosenberg B., (1977). *J. Clin. Hemat. Oncol.*, **7**, 817-827.
- Baniar Z.M., Hnilica L.S., Briggs R.C., Stein J., Stein G., (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 767-773.
- Baniar Z.M., Hnilica L.S., Briggs R.C., Stein J., Stein G., (1984). *Biochemistry*, **23**, 1921-1926.
- Simpkins H., Pearlman L.F., (1984). *FEBS Lett.*, **169**, 30-34.
- Zwelling L.A., Kohn K.W., Ross W.E., Ewig R.A.G., Anderson T., (1978). *Cancer Res.*, **38**, 1762-1768.
- Zwelling L.A., Anderson T., Kohn K.W., (1979). *Cancer Res.*, **39**, 365-369.
- Butour J.L., Macquet J.P., (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, **653**, 305-315.
- Eastman A., (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 869-875.
- Roberts J.J., Fridlos F., (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, **655**, 146-151.
- Roberts J.J., Fridlos F., (1982). *Chem. -Biol. Interact.*, **39**, 181-189.
- Eastman A., (1985). *Biochemistry*, **24**, 5027-5032.
- Ganguli P.K., Theopanides T., (1979). *Eur. J. Biochem.*, **101**, 377-383.
- Harder H.C., Lee Ch.C., (1983). *Cancer Res.*, **43**, 4799-4804.
- Fichtinger-Schepman A.M.J., Lohman P.H.M., Reedijk J., (1982). *Nucleic Acids Res.*, **10**, 5345-5356.
- Freval H.N., Roberts J.J., (1979). *Cancer Res.*, **39**, 1793-1797.
- Zwelling L.A., Michaels S., Schwartz H., Dobron P.P., Kohn K.W., (1981). *Cancer Res.*, **41**, 640-649.
- Plooy A.C.M., van Dijk M., Lohman P.H.M., (1984). *Cancer Res.*, **44**, 2043-2051.
- Strandberg M.C., Bresnick E., Eastman A., (1982). *Chem. -Biol. Interact.*, **39**, 169-180.
- Strandberg M.C., Bresnick E., Eastman A., (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **698**, 128-133.
- Munchansen L., (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4519-4522.
- Stone P.J., Kelman A.D., Sinex F.M., (1974). *Nature (Lond.)*, **251**, 736-737.
- Stone P.J., Kelman A.D., Sinex F.M., Bhargawa M.M., Halwarson H.O., (1976). *J. Mol. Biol.*, **104**, 793-801.
- Macquet J.P., Butour J.L., Johnson N.P., Razaka H., Sallers B., Vieusseus C., Wrig M., (1983). w Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy, (red.

- Hacker M.P., Donysle E.B., Kraakoff H.I., str. 27-38, Boston, Martinus Nijhoff Publishing.
53. Girault J.P., Chottand G., Lallemand J.Y., Chottand J.C., (1982), *Biochemistry*, **21**, 1352-1356.
 54. Roos I.A.G., Thompson A.J., Mansy S., (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 6484-6485.
 55. Chottard J.C., Girault J.P., Chottand G., Lallemand J.Y., Mansuy D., (1985), *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5565-5572.
 56. Cardona J.P., Lippard S.J., Gait M.J., Singh M., (1982), *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5793-5795.
 57. Girault J.P., Chottand G., Guittet E.R., Lallemand J.Y., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 1157-1163.
 58. Marcellis A.T.M., Canters G.W., Reedijk J., (1981), *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **100**, 391-392.
 59. Marcellis A.T.M., den Hartog J.H.J., Reedijk J., (1982), *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2664-2665.
 60. Inagaki K., Kasuya K., Kidani Y., (1983), *Chem. Lett.*, **14**, 1345-1348.
 61. Inagaki K., Kidani Y., Kasuya K., (1984), *Inorg. Chim. Acta*, **91**, L13-L15.
 62. Inagaki K., Kidani Y., (1985), *Inorg. Chim. Acta*, **106**, 187-191.
 63. Johnson N.P., Mazard A.M., Escalier J., Macquet J.P., (1985), *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6376-6380.
 64. Eastman A., (1982), *Biochemistry*, **21**, 6732-6736.
 65. Plooy A.C.M., Fitchinger-Schepman A.M.J., Schutte H.H., Van Dijk M., Lohman P.H.M., *Carcinogenesis*, **6**, 561-566.
 66. Poirier M.C., Lippard S.J., Zwelling L.A., Ushay H.M., Kerrigen D., Thill C.C., Santella R.M., Grunberger D., Yuspa S.H., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6443-6447.
 67. Poirier M.C., Reed E., Zwelling L.A., Ozols R.F., Litterst C.L., Yuspa S.H., (1985), *Env. Health Perspect.*, **62**, 89-94.
 68. Poirier M.C., Reed E., Ozols R.F., Yuspa S.H., (1986), w *Biochemical and Molecular Epidemiology of Cancer*, (red. Harris C.C.), str. 303-311, New York, Alan R. Liss.
 69. Wing R.M., Pjura P., Drew H.R., Dickerson R.E., (1984), *EMBO J.*, **3**, 1201-1206.
 70. Lippard S.J., Hoeschele J.D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6091-6095.
 71. Nazimiec M., Crooke S.T., Presteyko A.W., (1982), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **9**, 36-40.
 72. Filipski J., Kohn K.W., Bonner W.M., (1983), *FEBS Lett.*, **152**, 105-108.
 73. Fornace A.J., Kohn K.W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **435**, 95-103.
 74. Kohn K.W., Erickson L.C., Ewig R.A.G., Fredman C.A., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4629-4637.
 75. Zwelling L.A., Kohn K.W., (1981), w *Cisplatin. Current Status and New Developments*, (red. Prostayko A.W., Crooke S.T., Carter S.K.), str. 21-37, New York, Academic Press, Inc.
 76. Murthy M.S., Trawis J.D., Erickson L.C., Khandekar J.D., Scalton E.F., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 6232-6237.
 77. Oliński R., Wedrychowski A., Schmidt W.N., Briggs R.C., Hnilica L.S., (1987), *Cancer Res.*, **47**, 201-205.
 78. Beck D.J., Brubaker R.R., (1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 1247-1252.
 79. Brouwer J., van de Putte P., Fichtinger-Schepman A.M.J., Reedijk J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7010-7014.
 80. Salles B., Lasca C., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 202-208.



**MECHANIKA
PRECYZYJNA**

04-347 Warszawa, ul. Boremlowska 46
Tel. 610-56-67, Tlx 825767, Fax 610-55-36

Produkuje i oferuje do sprzedaży
NIEZBĘDNE w każdym laboratorium:

- Wirówki szybko i wolnoobrotowe na próbki szklane i plastikowe o pojemności od 2 do 100 ml,
- Wirówki hematokrytowe,
- Homogenizatory i roboty laboratoryjne

Zapewniamy:

- krótki termin realizacji
- serwis oraz zapasowe części zamienne

Warunki płatności do uzgodnienia

ZAPRASZAMY!

81. Alazard R.J., Germanier M., (1982), *Biochimie*, **64**, 619-622.
82. Brandel M., Ruhland A., (1984), *Mutat. Res.*, **133**, 51-85.
83. Popoff S.C., Beck D.J., Rump D.W., (1987), *Mutat. Res.*, **183**, 129-137.
84. Montesano R., Becker R., Hall J., Lickhachev A., Lu S.H., Umbenhauer D., Wild C.P., (1985), *Biochimie*, **67**, 919-928.
85. Germanier M., Defais M., Johnson N.P., Villami G., (1984), *Mutat. Res.*, **145**, 35-41.
86. Polle H.A., Abrahms P.J., Arwert F., Eriksson A.W., (1984), *Mutat. Res.*, **132**, 181-187.
87. Roberts J.J., Fraval H.N.A., (1980), w *Cisplatin Current Status and New Developments*, (red. Prostayko A.W., Crooke S.T., Carter S.K.), str. 57-77, New York, Academic Press.
88. Fraval H.N., Roberts J.J., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 1793-1797.
89. Meyn R.E., Jenkins S.F., Thompson L.H., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 3106-3110.
90. Friedberg E.C., Ehmann U.K., Williams J.L., (1979), *Adv. Radiat. Biol.*, **8**, 85-174.
91. Lehman A.R., Karran P., (1981), *Int. Rev. Cytol.*, **72**, 101-146.
92. Lehman A.R., (1982), *Cancer Surv.*, **1**, 93-118.
93. Fujiwara Y., Tatsumi M., Sasaki M.S., (1977), *J. Mol. Biol.*, **113**, 635-650.
94. Ishida R., Buchwald M., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 4000-4006.
95. Sognier M.A., Hittelman W.N., (1983), *Mutat. Res.*, **108**, 383-393.
96. Rubin S.J., (1988), *Int. J. Radiat. Biol.*, **54**, 309-365.
97. Plooy A.C.M., van Dijk M., Berends F., Lohman P.H.M., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 4178-4184.
98. Pera M.F., Friedlos F., Mills J., Roberts J.J., (1987), *Cancer Res.*, **47**, 6810-6813.
99. Eastman A., Schulte N., (1988), *Biochemistry* **27**, 4730-4734.
100. Fraval H.N.A., Rawlings C.J., Roberts J.J., (1978), *Mutat. Res.*, **51**, 121-132.
101. Graeff A., Stebos R.J.C., Rodenhuis S., (1988), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **22**, 325-332.
102. Day R.S., III, Ziolkowski C.H.J., Scudiero D.A., Meyer S.A., Lubiniecki A.S., Girardi A.J., Gallovej S.M., Byunum G.D., (1980), *Nature (Lond.)*, **288**, 724-727.
103. Day R.S., III, Ziolkowski C.H.J., Scudiero D.A., Meyer S.A., (1980), *Carcinogenesis*, **1**, 21-32.
104. Erickson L.C., Laurent G., Sharkey N.A., Kohn K., (1980), *Nature (Lond.)*, **288**, 727-729.
105. Laurent G., Erickson L.C., Sharkey N.A., Kohn K.W., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 3347-3351.
106. Richon V.M., Schulte N., Eastman A., (1987), *Cancer Res.*, **47**, 2056-2061.
107. Andrews P.A., Velury S., Mann S.C., Howel S.B., (1988), *Cancer Res.*, **48**, 68-73.
108. Kraker A.J., Steinkampf R.W., More C.W., (1986), *Proc. Assoc. Cancer Res.*, **27**, 286.
109. Sharma R.P., Edwards I.R., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 202-208.
110. Andrews P.A., Kim R.W., Murphy M.P., Howel S.B., (1986), *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **27**, 270.
111. Ciccarelli R.B., Solmon M.J., Varshavsky A., Lippard S.J., (1985), *Biochemistry*, **24**, 5533-5540.



ORDER
FORM

ISSN 0032-5422

Please enter my subscription for 1991 at:
institutional rate US \$ 60 or personal rate US
\$ 30 (including postage and handling)

I enclose my cheque (bank draft) for US \$.....

I am interested in receiving further information
(a free sample) copy of „Postępy Biochemii”

NAME

ADDRESS

POSTAL CODE DATE

Cheques should be made payable or remittance
transferred to:

Polish Biochemical Society
16 Freta Street, 00-227 Warszawa
Bank Handlowy, PBK XIII/O Warszawa
37 00 44-1225-139-11

Send orders to: **Polish Biochemical Society**
16 Freta Street
00-227 Warszawa, Poland

INFORMACJA O PRENUMERACIE „POSTĘPÓW BIOCHEMII”

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1991 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na podane poniżej konto bankowe wydawcy:

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
00-227 Warszawa, ul. Freta 16
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
370044-1225-139-11

Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu razem z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszystkich trzech odcinkach przekazu.

Prenumerata krajowa dla instytucji: 180 000 zł
Prenumerata krajowa indywidualna: 80 000 zł; (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

Instytucje, które dokonały przelewu prosimy o przesłanie na adres redakcji zamówienia (Na niektórych przekazach bankowych brak jest dokładnego adresu zamawiającego!).

Molekularne podłoże latencji wirusa *Herpes simplex-1*

Molecular basis of latency of *Herpes simplex virus type 1*

BOGUSŁAW BOROWICZ¹

JAN DOMANIEWSKI²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Ekspresja genów herpeswirusów w okresie infekcji litycznej
- III. Latencja
- IV. Stan fizyczny genomu herpeswirusa w okresie latencji
- V. Ekspresja genomu herpeswirusa w stanie latencji
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Herpesviruses gene expression during lytic infection
- III. Latency
- IV. Physical state of the herpesvirus genome during latency
- V. Herpesvirus genome expression during the state of latency
- VI. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów:

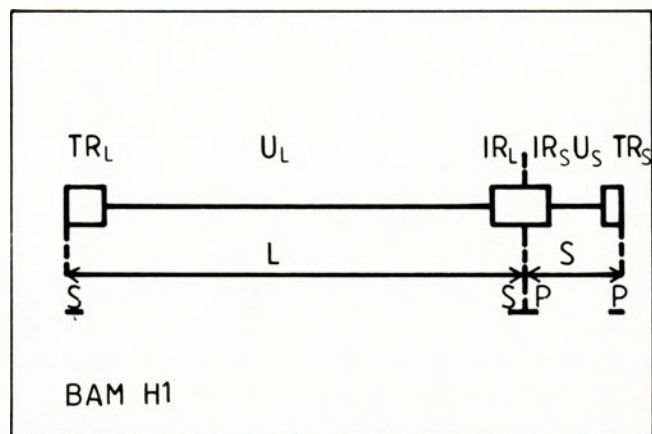
HSV-1 — wirus *Herpes simplex-1*, ICP0 i ICP4 — polipeptydy wirusowe HSV-1 (ang. ICP — *infected cell polypeptides*) kodowane przez geny grupy α , tj. odpowiednio geny oznaczone jako 0 i 4, TK — tymidynowa kinaza.

I. Wprowadzenie

U ludzi herpeswirusy wywołują różne choroby. W przypadku niektórych chorób stwierdza się obecność herpeswirusów, chociaż ich rola w procesie chorobowym nie jest dokładnie znana [1].

Herpeswirusy charakteryzują się właściwościami onkogennymi [2], tj. mają zdolność wywoływania zmian transformacyjnych w hodowli komórek. Również herpeswirusom przypisuje się udział w procesach nowotworowych *in vivo*.

Do rodziny Herpesviridae [3] zalicza się wirusy zawierające dwuniciowy, liniowy DNA, w formie rdzenia wirionu oraz ikozaedralny kapsyd składający się z 162 kapsomerów. Masa cząsteczkowa DNA genomowego wynosi 97×10^6 w przypadku wirusa *Herpes simplex-1* oraz 80×10^6 w przypadku wirusa *Epstein-Barr*. Zawartość G+C w DNA HSV-1 wynosi 67%, w DNA HSV-2 69%, a w DNA komórkowym 41-42% [3].



Ryc. 1 Schemat genomu HSV-1

Genom HSV-1 obejmuje dwa odcinki tj. odcinek długi (oznaczony jako L) oraz odcinek krótki (oznaczony jako S), które stanowią odpowiednio 82% i 18% wirusowego DNA. Odcinek długi sekwencji unikalnych (oznaczony jako U_L) jest otoczony przez powtarzalny odcinek końcowy (TR_L) z jednej strony oraz wewnętrzny odcinek powtarzalny (IR_L) z drugiej strony. Odcinek krótki sekwencji unikalnych (U_S) jest otoczony przez powtarzalny odcinek końcowy (TR_S) z jednej strony oraz przez powtarzalny odcinek wewnętrzny (IR_S) z drugiej strony. Na rycinie przedstawiono umiejscowienie wybranych fragmentów restrykcyjnych (S, P oraz PS) po trawieniu Bam H1, które zostały sklonowane i użyte jako sondy w omawianych w pracy doświadczeniach hybrydacyjnych. Opracowano na podstawie danych literaturowych [3-9].

Genom HSV-1 jest cząsteczką DNA zawierającą około 150 kbp i mającą zdolność do kodowania 50-100 genów [4-9].

II. Ekspresja genów herpeswirusów w okresie infekcji litycznej

Geny HSV są transkrybowane w jądrze zakażonych komórek przez enzym gospodarza tj. polimerazę RNA klasy II. Po zakażeniu ulegają kolejno ekspresji poszczególne zestawy genów HSV. Występują przypuszczalnie 3 główne zestawy genów wirusowych, które są również nazywane grupami kinetycznymi tj. α , β , γ [5, 10]. Geny zaliczane do różnych grup kinetycznych przeplatają się wzajemnie wzdłuż wirusowego DNA [11]. W przeciwieństwie do większości wirusowych i eukariotycznych mRNA, transkrypty HSV nie są na ogół nadzwinięte (and. *spliced*) [10, 11].

¹ Dr, ² Prof. dr hab. med., Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Akademia Medyczna, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz.

Natychmiast po wnikięciu wirusa do komórki gospodarza następuje transkrypcja 5 genów grupy α [12]. Geny te są jedynymi genami wirusowymi transkrybowanymi przy braku syntezy białek wirusa. Grupa α (ang. *immediate early - IE*) obejmuje geny IE oznaczone jako 0, 4, 22, 27 i 47. Aktywacja transkrypcji tych genów następuje przez polipeptyd Vm65, który jest połączony z wirionem [13].

Produkt genu grupy α - IE4, tj. białko ICP4 jest stale potrzebne podczas cyklu infekcyjnego dla utrzymania transkrypcji genów grup innych niż geny grupy α [14]. Przypuszczalnie białko ICP4 wpływa aktywująco na ekspresję genów grup β i γ oraz pełni funkcję autoregulacyjną w przypadku genów grupy α [14].

Ostatnio, duże znaczenie w regulacji ekspresji genów wirusowych przypisuje się oprócz ICP4 również białku ICP0 [13]. Stosując transfekcję [13] z użyciem plazmidów zawierających sekwencje genów wirusowych HSV, wykazano, że białka ICP4 i ICP0 mogą pełnić funkcję zarówno pozytywnego jak i negatywnego czynnika regulacyjnego transkrypcji, w zależności od stężenia i stanu funkcjonalnego cząsteczek tych białek. Przy użyciu immunofluorescencji z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych wobec ICP0 i ICP4 wykazano, że białka te występują w przeważającej ilości w jądrze zakażonych komórek. Funkcjonalna interakcja co najmniej dwóch produktów genów grupy α tj. białek ICP0 i ICP4 stanowi podstawę skoordynowanej regulacji ekspresji genów wirusowych w cyklu infekcyjnym HSV [13].

Przykładem genu grupy β jest wirusowy gen tymidynowej kinazy /TK/ [15, 16]. Tymidynowa kinaza kodowana wirusowo (tzn. gen TK wchodzi w skład genomu wirusa) ma bardzo duże znaczenie dla cyklu replikacyjnego HSV, a poziom jej ekspresji określa neurowirulencję i możliwość zapoczątkowania stanu latencji HSV-1 [17].

III. Latencja

Niektóre wirusy, m.in. herpeswirusy, mają zdolność przebywania w komórce gospodarza w stanie latencji, czyli utajenia, bez namnażania cząstek wirusa [18].

Na ogół zakażenie latentne [6, 19] rozpatruje się w trzech etapach: - zapoczątkowania stanu latencji (ang. *establishment*), - dalszego trwania latencji (ang. *maintenance*), - oraz reaktywacji (ang. *reactivation*), w wyniku której następuje przejście wirusa *Herpes simplex-1* ze stanu latencji do infekcji litycznej, w której ma miejsce replikacja genomu HSV-1. W czasie infekcji litycznej genom HSV-1 występuje w formie liniowej.

Przejście HSV-1 w stan latencji odbywa się w komórkach nie dzielących się tzn. neuronach *in vivo* [20]. Stąd bardziej przydatne do badań niż linie komórkowe okazały się układy doświadczalne *in vivo*, stosujące zwierzęta laboratoryjne.

W warunkach eksperymentalnych, infekcyjne czas-

tki wirusowe można izolować ze zwojów trójdzielnych myszy aż do 7-10 dnia po infekcji [6, 21, 22]. Po okresie infekcji litycznej wirus przechodzi w stan latencji [18]. W stanie latencji nie można wykryć infekcyjnego wirusa w homogenacie tkankowym, natomiast można wykryć wirusowy DNA w pniu mózgu i w zwojach trójdzielnych przez okres życia zwierzęcia [7, 23].

Niski poziom zawartości wirusowego DNA w stanie latencji u myszy i innych zwierząt laboratoryjnych [7, 8] przy zakażeniu w warunkach doświadczalnych jest głównym utrudnieniem w postępie badań nad latencją HSV-1.

Dotychczas stwierdzono, że latencja nie zachodzi, w przypadku herpeswirusów, które nie wytwarzają białek ICP4 i tymidynowej kinazy [24, 25].

Rola układu immunologicznego w zapoczątkowaniu latencji oraz w dalszym jej trwaniu wymaga jeszcze badań [26].

Poznano wiele czynników fizyczno-chemicznych, które indukują proces przejścia ze stanu latencji do aktywnej infekcji litycznej, w procesie reaktywacji. Wśród czynników fizyczno-chemicznych stosowano m.in. napromieniowanie nadfioletem, podrażnienie taśmą celofanową oraz traktowanie ksylenem, kwasem retinowym, DMSO itp.

Oprócz czynników fizyczno-chemicznych, wywołano reaktywację w warunkach laboratoryjnych poprzez uszkodzenie nerwu oraz traktowanie immunosupresyjne [27, 28].

IV. Stan fizyczny genomu herpeswirusa w okresie latencji

Do analizy stanu fizycznego genomu HSV-1 w okresie latencji zastosowano metody hybrydyzacji kwasów nukleinowych [7, 8]. W badaniach tych [7, 8] izolowano DNA z mózgow myszy w okresie fazy ostrej infekcji (cykl lityczny) oraz w stanie latencji. Następnie próbki DNA trawiono enzymem restrykcyjnym Bam HI, rozdzielano elektroforetycznie i przenoszono na nitrocelulozę, po czym poddawano hybrydyzacji z sondą reprezentującą cały genom HSV-1. Stwierdzono duże podobieństwo w zakresie składu fragmentów restrykcyjnych poszczególnych próbek DNA z fazy ostrej i latentnej oraz w przypadku DNA wirionowego. Na tej podstawie stwierdzono, że większość sekwencji DNA genomu HSV-1 występuje w mózgu latentnie zakażonych myszy. Wyniki te wykluczyły możliwość, że nagromadzenie się defektywnych cząstek wirusowych stanowi przyczynę latencji.

Do badań stanu fizycznego genomu HSV-1 użyto specyficznych sond hybrydyzacyjnych, które odpowiadały określonym fragmentom genomu wirusowego (Ryc. 1). Badania te [7-9] wykazały utratę fragmentów końcowych P i S (Ryc. 1) latentnego genomu HSV-1, przy zachowaniu regionu łączącego PS, w po-

równaniu do DNA wirionu oraz DNA z fazy infekcji ostrej. Utrata końcowych fragmentów w wirusowym, latentnym DNA HSV-1 jest związana [9] z ich połączeniem i utworzeniem fragmentu, który odpowiada łączącemu fragmentowi PS DNA wirionu. A zatem występują dwie kopie regionu łączącego PS w latentnym genomie HSV-1.

Badania stanu fizycznego latentnego genomu HSV-1 przy użyciu chromatografii w fazie odwróconej (RPC-5) wykazały zróżnicowanie w wielkości końcowych fragmentów restrykcyjnych latentnego DNA HSV-1 (uzyskanych w wyniku trawienia DNA enzymem restrykcyjnym Eco RI) w stosunku do wirionowego DNA [29]. Wykryte zróżnicowanie w wielkości fragmentów restrykcyjnych latentnego DNA HSV-1 mogło wynikać z powstania w wirusowym latentnym DNA miejsc przyłączenia do DNA gospodarza. Badania te jednak nie rozstrzygają ostatecznie tej kwestii, ponieważ istnieje możliwość, że przy użyciu chromatografii w fazie odwróconej uzyskano wzbogacenie w nie tylko wirusowe, lecz także komórkowe homologiczne sekwencje DNA, które mogły hybrydyzować niespecyficycznie z sondą wykrywającą sekwencje wirusowe [30, 31].

Na podstawie badań stanu fizycznego latentnego genomu HSV-1, wykonanych techniką wirowania w gradiencie chlorku cezu w połączeniu z hybrydyzacją punktową kwasów nukleinowych [8, 32], przypuszcza się że HSV-1 występuje w stanie latencji w większości w formie pozachromosomalnej tzn. nie łączy się z sekwencjami komórkowymi gospodarza. Przypuszczalnie latentny HSV-1 występuje w formie episomalnej.

Niektóre sekwencje DNA ssaków (mysi, ludzki) i DNA ludzkich herpeswirusów (HSV-1, HSV-2) są homologiczne. Obszary homologii [30, 31] (Ryc. 1) z sekwencjami DNA gospodarza występowały głównie w obrębie obszaru L i S typu "inverted repeat" oraz w pobliżu centrum obszaru L sekwencji unikalnych wirusowego genomu. Homologię sekwencji wirusowych i sekwencji gospodarza stwierdzono także w przypadku wirusa Epstein-Barr oraz wirusa cytomegalii [31]. Obecnie nie wiadomo czy obszary homologiczne reprezentują specyficzne funkcjonalnie geny czy też sekwencje niekodujące. Nie wiadomo także czy obszary homologii genomu herpeswirusów i genomu komórki gospodarza powstały przez rekombinację czy też w drodze konwergencji mechanizmów ewolucyjnych.

V. Ekspresja genomu herpeswirusa w stanie latencji

Badania przeprowadzone przy użyciu techniki hybrydyzacji kwasów nukleinowych, w tym techniki hybrydyzacji *in situ* [33, 34], wykazały obecność RNA specyficznego dla HSV-1 w stanie latencji w zwojach trójdzielnych człowieka. W badaniach przeprowadzo-

nych na myszach również wykazano obecność wirusowych mRNA w stanie latencji HSV-1, w tym transkryptów RNA genów wirusowych kodujących ICP0 i ICP4 oraz ograniczenie ilości transkryptów genu wirusowego kodującego tymidynową kinazę (TK) (choć wyniki badań w przypadku genu TK często nie są zbieżne - [33, 35, 36]).

W badaniach dotyczących translacji genów HSV-1 w stanie latencji [37] wykazano obecność polipeptydów wirusowych w zwojach trójdzielnych, które należały do grupy kinetycznej α , czyli tzw. polipeptydów bardzo wczesnych (o m.c. 175 kD, 136 kD, 110 kD, 87 kD, 63 kD) oraz grupy β , czyli tzw. polipeptydów wczesnych (o m.c. 146 kD, 44 kD, 32 kD). Wykazano także obecność polipeptydu kapsydu o m.c. 155 kD. Wśród polipeptydów bardzo wczesnych stwierdzono obecność białka ICP4 (o m.c. 175 kD) [38] w zwojach trójdzielnych w stanie latencji.

Ważnym elementem dotyczącym ekspresji genomu HSV-1 w stanie latencji jest zjawisko metylacji określonych sekwencji wirusowego DNA. Zaobserwowano bowiem związek między metylacją DNA a brakiem aktywności transkrypcyjnej wielu komórkowych i wirusowych genów [39].

W badaniach latencji *in vitro* [39], wykonanych przy zastosowaniu limfoidalnej linii komórkowej, stwierdzono, że latentny wirusowy DNA jest zmetylowany. W przypadku infekcji litycznej nie stwierdzono w badaniach *in vitro* metylacji wirusowego DNA.

Badania latencji *in vivo* [40], przeprowadzone na myszach wykazały, w przeciwieństwie do badań w układzie *in vitro*, brak metylacji przeważającej części latentnego DNA HSV-1. W przypadku badań *in vivo*, metylacja dużej części latentnego genomu HSV-1 nie jest niezbędnym warunkiem stanu latencji.

VI. Uwagi końcowe

Badania stanu latencji HSV-1 wykonane na zwierzętach laboratoryjnych mają odniesienie do stanu latencji HSV-1 u człowieka. Wyniki tych badań muszą być jednak zweryfikowane na materiale ludzkim. Zakażenie HSV-1 u człowieka różni się bowiem od zakażenia HSV-1 w przypadku zwierząt laboratoryjnych. U myszy HSV-1 wykazuje w zakażeniu pierwotnym większą neurowirulencję niż u człowieka [6]. Reaktywacja jest u latentnie zakażonych myszy rzadka, w przeciwieństwie do reaktywacji występującej u człowieka [6]. W badaniach na materiale ludzkim potwierdzono utratę fragmentów końcowych wirusowego DNA, którą wykazano w badaniach latencji na myszach [41].

Zasadniczo w przypadku latentnego genomu HSV replikacja wirusowego DNA nie zachodzi [42]. Początkowo wykazano [43] obecność specyficznego transkryptu - LAT (ang. *latency-associated transcript*) w latentnie zakażonych neuronach mysich. Wykazano

ograniczoną transkrypcję latentnego genomu HSV-1 na materiale zwierzęcym [4, 44] oraz na materiale ludzkim [45-47]. Wykryte transkrypty pochodziły przede wszystkim z sekwencji powtarzalnych (IRL, IRS), zwłaszcza odcinka długiego (L) genomu HSV-1 [48].

Ustalono, że wirusowe RNA w stanie latencji podlegają transkrypcji z nici DNA przeciwej do nici DNA, w której występuje gen kodujący transkrypt polipeptydu ICP0. Transkrypcja w stanie latencji dotyczy części sekwencji tego genu. Brak jest danych odnośnie możliwości kodowania białka przez tę sekwencję (LAT) [49].

Można przypuszczać, że prowadzone obecnie kompleksowe badania pozwolą wyjaśnić szereg zagadnień ekspresji latentnego genomu HSV-1.

Artykuł otrzymano 13 lipca 1989 r.

Zaakceptowano do druku 26 września 1990 r.

Piśmiennictwo

1. Blaškovič D., Kaňtoch M., (1984), *Wirusologia lekarska*, str. 236-253, PZWL, Warszawa.
2. Green M., (1985) w *Virology*, (red. Fields B.N.), str. 183-234, Raven Press, New York.
3. Chroboczek J., Zagórski W., (1983), *Wirusologia molekularna*, str. 249-259, PWN, Warszawa.
4. Spivack J.G., Fraser N.W., (1987), *J. Virol.*, **61**, 3841-3847.
5. Roizman B., Batterson W., (1985), w *Virology*, (red. Fields B.N.), str. 497-526, Raven Press, New York.
6. Fraser N.W., Deatly A.M., Mellerick D.M., Muggerridge M.I., Spivack J., (1986) w *Human Herpesvirus Infections*, (red. Lopez C., Roizman B.), Raven Press, New York.
7. Rock D.L., Fraser N.W., (1983), *Nature (Lond.)*, **302**, 523-525.
8. Fraser N.W., Muggerridge M.I., Mellerick D.M., Rock D.L., (1984), *Herpesvirus*, 159-173, Alan R. Liss, Inc.
9. Rock D.L., Fraser N.W., (1985), *J. Virol.*, **55**, 849-852.
10. Wagner E.K., Costa R.H., Gayathri Devi B., Draper K.G., Frink R.J., Hall L.M., Rice M.K., Steinhart W., (1985) w *Viral Messenger RNA*, (red. Becker Y.), str. 79-99, Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
11. Smiley J.R., (1985) w *Viral Messenger RNA*, (red. Becker Y.), str. 101-125, Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
12. Mackem S., Roizman B., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7122-7126.
13. Gelman I.H., Silverstein S., (1986), *J. Mol. Biol.*, **191**, 395-409.
14. Watson R., Clements J., (1980), *Nature (Lond.)*, **285**, 329-330.
15. Becker Y., Shtram Y., Hadar J., Ben-Hur T., Barasofsky A., Asher Y., Tabor E., Scemama A., Gilden D.M., (1984) w *Mechanisms of Viral Pathogenesis*, (red. Kohn A., Fuchs P.), str. 293-306, Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
16. Pasick J.M.M., Smiley J.R., (1988), *Virology*, **162**, 490-493.
17. Gordon Y., Gilden D.H., Shtram Y., Asher Y., Tabor E., Wellish M., Devlin M., Snipper D., Hadar J., Becker J., (1983), *Arch. Virol.*, **76**, 39-49.
18. Knotts F.B., Cook M.L., Stevens J.G., (1973), *J. Exp. Med.*, **138**, 740-744.
19. Deatly A.M., Spivack J.G., Lavi E., Fraser N., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3204-3208.
20. Cook M.L., Bastone V.B., Stevens J.G., (1974), *Infect. Immun.*, **9**, 946-951.

21. Cook M.L., Stevens J.G., (1973), *Infect. Immun.*, **7**, 272-288.
22. Stevens J.G., Cook M.L., (1971), *Science*, **173**, 843-845.
23. Cabrera C.V., Wohlenberg C., Oppenshaw H., Rey-Mandez M., Puga A., Notkins A.L., (1980), *Nature (Lond.)*, **288**, 288-290.
24. Tenser R.B., Dunstan M.E., (1979), *Virology*, **99**, 417-422.
25. Watson K., Stevens J.G., Cook M.L., Subak-Sharpe J.H., (1980), *J. Gen. Virol.*, **49**, 149-159.
26. Rheinbaben F.V., Schneeweis K.E., (1986), *Arch. Virol.*, **87**, 315-419.
27. Blyth W.A., Hill T.J., Field H.J., Harbour D.A., (1976), *J. Gen. Virol.*, **33**, 547-550.
28. Walz M.A., Price R.W., Notkins A.L., (1974), *Science*, **184**, 1185-1187.
29. Puga A., Cantin E.M., Wohlenberg C., Openshaw H., Notkins A.L., (1984), *J. Gen. Virol.*, **65**, 437-444.
30. Puga A., Cantin E.M., Notkins A.L., (1982), *Cell*, **31**, 81-87.
31. Peden K., Mounts P., Hayward G.S., (1982), *Cell*, **31**, 71-80.
32. Mellerick D.M., Fraser N.W., (1987), *Virology*, **158**, 265-275.
33. Galloway D.A., Fenoglio C.M., McDougall J.K., (1982), *J. Virol.*, **41**, 686-691.
34. Galloway D.A., Fenoglio C., Shevchuk M., McDougall J.K., (1979), *Virology*, **95**, 265-268.
35. Yamamoto H., Walz M.A., Notkins A.L., (1977), *Virology*, **76**, 866-869.
36. Cantin E.M., Puga A., Notkins A.L., (1984), w *Concepts in Viral Pathogenesis*, (red. Notkins A.L., Oldstone M.B.A.), str. 172-177, Springer-Verlag, New York.
37. Rajcani J., Matis J., (1981), *Acta Virol.*, **25**, 371-375.
38. Green M.T., Courtney R.J., Dunkel E., (1981), *Infect. Immun.*, **34**, 987-992.
39. Youssoufian H., Hammer S.M., Hirsch M., Mulder C., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2207-2210.
40. Dressler G.R., Rock D.L., Fraser N.W., (1987), *J. Gen. Virol.*, **68**, 1761-1765.
41. Efsthathiou S., Minson A.C., Field H.J., Anderson J.R., Wildy P., (1986), *J. Virol.*, **57**, 446-455.
42. Rawls W.E., (1985) w *Virology*, (red. Fields B.N.), str. 527-561, Raven Press, New York.
43. Stevens J.G., Wagner E.K., Devi-Rao G.B., Cook M.L., Feldman L., (1987), *Science*, **235**, 1056-1059.
44. Puga A., Notkins A.L., (1987), *J. Virol.*, **61**, 1700-1703.
45. Croen K.D., Ostrove J.M., Dragovic L.J., Smialek J.E., Straus S.E., (1987), *N. Engl. J. Med.*, **317**, 1427-1432.
46. Steiner I., Spivack J.G., O'Boyle H.D.R., Lavi E., Fraser N.W., (1988), *J. Virol.*, **62**, 3493-3496.
47. Stevens J.G., Haar L., Porter D.D., Cook M.L., Wagner E.K., (1988), *J. Infect. Dis.*, **158**, 117-122.
48. Wagner E.K., Devi-Rao G., Feldman L.T., Dobson A.T., Zhang Y.-F., Flanagan W.M., Stevens J.G., (1988), *J. Virol.*, **62**, 1194-1202.
49. Stevens J.G., (1989), *Microbiol. Reviews*, **53**, 318-332.



UWAGA!

Redakcja „Postępów Biochemii”
zamierza wydać w 1992 r.

„Leksykon nowych terminów biochemicznych”. Ponieważ leksykon umieszczony w tomie 36(3-4) i tomie 37(1) ma charakter roboczy, prosimy o uwagi i ewentualne poprawki, a jednocześnie zachęcamy do uzupełniania go hasłami z własnej dziedziny badań.

A-1080 WIEN, LAUDONGASSE 40
PH.: 43 59 08 0, 43 45 00 0
TLX 114415 CHWIE A
FAX NR. 43 44 83 26

KONTAKT WARSZAWA
TEL. 13 92 19

oferuje:

PCR-MATE EP

Wszechstronny i poręczny syntezator DNA

PCR-MATE EP to poręczne urządzenie laboratoryjne firmy Applied Biosystem, w którym połączono chemię, precyzyjny system odmierzenia i szerokie oprogramowanie.

Dzięki tym właściwościom urządzenie PCR-MATE EP zapewnia różnorodne możliwości w zakresie syntezy kwasów nukleinowych jak np. uzyskanie:

- prawidłowego DNA
- tiofosforanowych pochodnych (np. anti-sense oligonukleotydów)
- ³⁵S — tiofosforanowych sond o wysokiej specyficzności
- a nawet syntetyczne RNA

Wraz z rozszerzaniem zakresu Twoich badań PCR-MATE EP łatwo dostosowuje się do Twoich potrzeb!

 **Applied
Biosystems**



Programowany Blok Termiczny

Pomyśl o nim jako o fotokopiarce biologicznej, której użyjesz gdy potrzebujesz wysokiej jakości kopie — przy amplifikacji DNA (np. reakcji łańcuchowej polimerazy) i hybrydacji. Taką samą maksymalną odtwarzalność uzyskasz stosując Programowany Blok Termiczny w badaniach z użyciem enzymów restrykcyjnych i hodowli komórkowych

 **LAB-LINE® INSTRUMENTS, INC.**





BIO-TELEFONY

(dzwoniąc do firmy nie zapomnij pochwalić się, że numer telefonu znalazłeś w „Postęпах Biochemii”)

AMICON I BIBBY STERILIN- POLTRADE LIMITED jest wyłącznym dystrybutorem na Polskę

Warszawa

tel. (022) 23-58-52

fax: (022) 23-53-06

BIO-RAD -Wiedeń, tel. (222) 82-89-010

fax: (222) 82-85-629

CALBIOCHEM (Pharm Supply AG) — odczynniki chemiczne, reagenty biochemiczne i immunologiczne

Warszawa

tel./fax: 642-87-77

CHEMINST — przedstawiciel APPLIED BIOSYSTEMS, SORVALL, GILSON, HAMILTON i in.

Warszawa, tel. 13-92-19

Wiedeń

tel. 43-59-080, 43-45-000

fax: 43-44-83-26

GIBCO-BRL — Life Technologies

Warszawa, tel. 25-34-56

RIVER — biuro handlu zagranicznego

Kraków, tel. (12) 33-66-76 fax (12) 33-66-76

SIGMA chem. comp., USA E. Merck,

Niemcy - wyspecjalizowany importer odczynników

„Aurum” Sp. z o.o., 01-833, Warszawa, Daniłowskiego 1/25

**PAMIĘTAJ! Reklama w „Postęпах Biochemii”
to reklama skuteczna!**