POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

postępy biochemii

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 39, NR 3, 1993

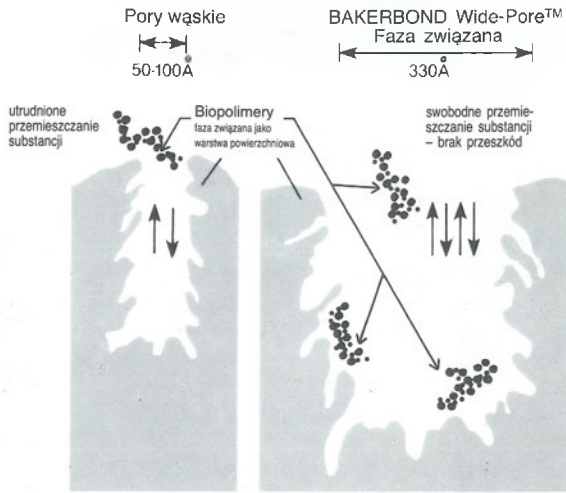
Eugeniusz Gąsior — Wspomnienia 150
Drożdże modelowy organizm w biologii molekularnej 152
Sekwencjonowanie drożdży 156
Biogeneza peroksysomów w drożdżach 165
Biosynteza hemu w *S. cerevisiae* . 173
Drożdże, dolichole, sterole 185
Glikozylacja, drożdże, mutanty . . 192

http://rcin.org.pl

Rozdzielić biopolimery – żaden problem mając

J.T.Baker

kolumny BAKERBOND Wide-Pore™ HPLC

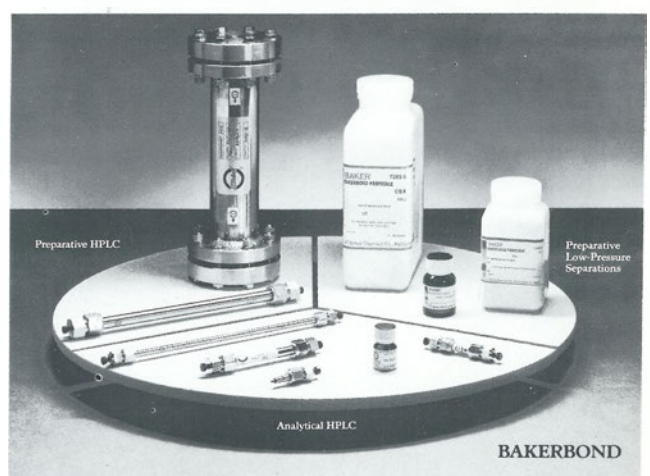


Kolumny do HPLC BAKERBOND Wide-Pore nadają się do chromatografii jonowej i w układzie faz odwróconych. Duże pory wypełnienia (330 Å) gwarantują szybki i dokładny rozdział złożonych mieszanin zawierających peptydy, białka i oligonukleotydy. Wartości odzysku wynoszą ponad 95% dla białek o strukturze kulistej i masie do 150.000 daltonów, a dla białek włóknistych o masie do 300.000. Biologiczna aktywność jest w pełni zachowana. Czas użytkowania kolumn jonowymiennych przekracza 1000 godzin bez obniżenia jakości rozdziałów.

Szczegółowe dane: EUROCOLOR, skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, tel. 813140

Dzięki SCOUT – od analityki do preparatyki. Biopolimery od μg do kg

J.T.Baker



BAKERBOND umożliwia stopniowanie

Fazy BAKERBOND Wide-Pore pozwalają na chromatograficznie czystą izolację biopolimerów. Metody opracowane przy użyciu kolumn BAKERBOND SCOUT (4,6 × 50 mm, 5 μ) mogą być bez problemu wykorzystane w skali produkcyjnej (40 μ). Nośnikiem dla faz BAKERBOND jest żel krzemionkowy. Niezależnie od wielkości ziarna chemiczne pokrycie jest takie samo. Istotnymi cechami tych faz są: specyficzność wiązania, wysoki odzysk obliczany na podstawie masy i aktywności (>95%) i wysoka zdolność wiązania (150 mg/g).

Szczegóły w bezpłatnej broszurze: EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, skr. poczt. 46, * 90-980 Łódź-7 * tel. (042) 813140, 844614 * fax 844609

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

http://rcin.org.pl

postępy biochemii

WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 31-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 200-381 w. 488
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 10-50-71 w. 155

Prace do zeszytu rekomendowały:
Papers for this issue are recommended by:

Grażyna Palamarczyk (Warszawa)
Joanna Rytka (Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI
CONTENTS

Profesor Eugeniusz Gąsior — Wspomnienia
Professor Eugeniusz Gąsior — Obituary
UCZNIOWIE I PRZYJACIELE 150

Drożdże modelowym organizmem eukariotycznym w biologii molekularnej
Yeast-model of eucaryotic organism in molecular biology
JOANNA RYTKA, GRAŻYNA PALAMARCZYK 152

Sekwencjonowanie genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Cele, strategie, rezultaty
Sequencing of the genome of yeast *Saccharomyces cerevisiae* Aims, strategies, results
EWA ANNA GRZYBOWSKA, ANDRZEJ MIGDALSKI, MAREK ZAGULSKI 156

Funkcja i biogeneza peroksysomów w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*
Function and biogenesis of peroxisomes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*
IWONA SMACZYŃSKA, MAREK SKONECZNY 165

Biosynteza hemu w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*
Heme biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae*
ANNA CHEŁSTOWSKA, JOANNA RYTKA 173

Wykorzystanie mutantów drożdży do badań wspólnego szlaku biosyntezy dolicholi, steroli i ubichinonów
Yeast mutants as a tool in the investigations of common biosynthetic pathway of dolichols, sterols and ubiquinones
ANNA SZKOPIŃSKA 185

Genetyczne regulacje N-glikozylacji białek drożdży
Genetic regulation of N-glycosylation in yeast
GRAŻYNA PALAMARCZYK, JOANNA KRUSZEWSKA 192

http://rcin.org.pl

Profesor Eugeniusz Gąsior — Wspomnienia

Profesor Eugeniusz Gąsior
1929—1993

Dnia 14 lipca 1993 roku zmarł nagle, w pełni sił twórczych, profesor doktor habilitowany Eugeniusz Gąsior. Odszedł od nas wybitny biochemik, specjalista w zakresie fosforylacyjnej modyfikacji białek, twórca i kierownik Zakładu Biologii Molekularnej, Rektor Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Profesor Eugeniusz Gąsior urodził się 25 listopada 1929 roku w Podlasiu na Zamojszczyźnie. Studia wyższe ukończył w 1952 roku na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym UMCS w Lublinie uzyskując tytuł magistra chemii. Pracę w szkolnictwie wyższym rozpoczął jeszcze przed ukończeniem studiów, w Katedrze Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie pod kierunkiem prof. Janiny Blauth-Opieńskiej.

Pierwsze prace badawcze Profesora dotyczyły charakterystyki enzymów biorących udział w procesie biosyntezy białka. Badania nad aktywacją aminokwasów u *Mycobacterium phlei* były przedmiotem pracy doktorskiej, zakończonej uzyskaniem stopnia doktora nauk przyrodniczych w 1960 r. Późniejsze badania dotyczyły izolacji i charakterystyki aminoacylo-tRNA transferaz z wątroby szczura i *Escherichia coli*. Po uzyskaniu stopnia doktora habilitowanego w 1966 roku rozpoczął pracę na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Katedrze Mikrobiologii Ogólnej kierowanej przez prof. Zbigniewa Lorkiewicza. W 1970 r. doprowadził do utworzenia Zakładu Biologii Molekularnej zostając jego kierownikiem. W okresie działalności naukowej na UMCS uzyskuje kolejno stopnie naukowe profesora nadzwyczajnego w 1973 roku i profesora zwyczajnego w 1980 r. Brał czynny udział w organizacji życia naukowego ośrodka lubelskiego i kraju. W latach 1970—1977 był dyrektorem Instytutu Mikrobiologii i Biochemii. Na przełomie lat 1980/81 pełnił funkcję prorektora UMCS. Od 1984 do 1987 roku był dziekanem Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi. W roku 1990 został wybrany Rektorem UMCS, a w kwietniu bieżącego roku społeczność akademicka powierzyła Profesorowi Gąsiorowi obowiązki rektora na kolejną kadencję.

Jednocześnie działał Profesor jako członek rady redakcyjnej kwartalnika „Postępy Biochemii" i „Acta Biochimica Polonica". Uczestniczył w pracach Centralnej Komisji Kwalifikacyjnej i Rady Głównej Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Był członkiem Komitetu Biochemii i Biofizyki oraz Komitetu Biotechnologii PAN. W grudniu 1991 roku został członkiem — korespondentem PAN (Wydział Nauk Biologicznych). Ponadto pełnił funkcję przewodniczącego Lubelskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz II Wydziału Nauk Biologicznych Lubelskiego Towarzystwa Naukowego.

Pomimo tak licznych i pracochłonnych funkcji Profesor znajdował wiele czasu na prowadzenie działalności naukowej. Prowadząc osobiście doświadczenia i kierując pracą uczniów stworzył silny ośrodek biologii molekularnej. Z Jego inicjatywy nawiązana została szeroka współpraca z wieloma laboratoriami polskimi i zagranicznymi.

Odbył szereg krótko i długoterminowych staży zagranicznych. Między innymi w 1964 roku przebywał na rocznym stażu podoktorskim na Uniwersytecie w Bostonie. W późniejszym okresie jako „*visiting scientist*" na Uniwersytecie w Pittsburgu (1969/70), a na przełomie lat 1977—78 na Uniwersytecie Kalifornijskim w Irvine.

Problematyka badań naukowych prowadzonych przez Profesora zarówno w kraju jak i za granicą dotyczyła kilku powiązanych ze sobą wątków tematycznych. Na uwagę zasługują przede wszystkim prace nad biosyntezą białka u organizmów eukariotycznych. Dotyczyły on zarówno charakterystyki czynników białkowych zaangażowanych w tym procesie jak również poznania mechanizmu inicjacji i elongacji łańcucha polipeptydowego. Wyniki badań nad czynnikami elongacyjnymi EF-1 i EF-2, uzyskane jeszcze w latach 70-tych, trwale zapisały się w piśmiennictwie naukowym. Opracowany po raz pierwszy przez Profesora Gąsiora bezkomórkowy układ translacji z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* stosowany jest obecnie jako system modelowy w wielu laboratoriach na świecie. Jest on również często wykorzystywany w programach kształcenia studentów nauk biologicznych.

W swoich badaniach Profesor poświęcił wiele uwagi fosforylacyjnej modyfikacji białek aparatu translacyjnego drożdży ze szczególnym uwzględnieniem fosforylacji białek rybosomowych. Skupiały się one głów-

http://rcin.org.pl

nie nad charakterystyką kinaz białkowych drożdży, takich jak: kinazy kazeinowe 1 i 2, swoista kinaza modyfikująca kwaśne białka rybosomowe podjednostki 60S, kinaza zależna od cAMP i inne.

Opublikował ponad 70 prac eksperymentalnych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W uznaniu Jego zasług naukowych zespół kierowany przez Profesora Gąsiora otrzymał trzykrotnie nagrodę Sekretarza Naukowego PAN.

Profesor Eugeniusz Gąsior wiele uwagi poświęcał działalności dydaktyczno-wychowawczej. Troszczył się o rozwój i doskonalenie programów nauczania w zakresie biochemii i biologii molekularnej. Stale unowocześniał wykłady wprowadzając do nich najnowsze odkrycia. Miał szerokie zainteresowania i dużą wiedzę, którą chętnie się dzielił. Kierował bezpośrednio wieloma pracami magisterskimi. Wypromował 7 doktorów. Był opiekunem naukowym 3 habilitacji, z których jedna osoba uzyskała tytuł profesora. Wielu Jego uczniów cieszy się już dużym dorobkiem naukowym i uznaniem w krajowych i zagranicznych ośrodkach naukowych.

Za swoją działalność naukową, dydaktyczną, wychowawczą i organizacyjną został odznaczony Medalem Komisji Edukacji Narodowej, Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski oraz innymi odznaczeniami państwowymi i regionalnymi.

Profesor Gąsior był człowiekiem wymagającym a jednocześnie bezpośrednim i skromnym. Starał się wszystkich zrozumieć i zawsze chętnie służył radą i pomocą.

Pozostanie w naszej pamięci nie tylko jako wybitny biochemik, ale również jako serdeczny opiekun i przyjaciel.

Uczniowie i przyjaciele

XXX ZJAZD P.T.BIOCH W 1994 ROKU

ZAWIADOMIENIE WSTĘPNE

We wrześniu (14-16 IX) 1994 roku odbędzie się w Szczecinie Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Jednym z zasadniczych tematów Zjazdu będzie tematyka związana z molekularno-biochemicznymi aspektami białaczek bydła i chorób zwierząt hodowlanych wywoływanych przez wirusy oraz wewnątrzkomórkowe fakultatywne patogeny bakteryjne (*Listeria* spp., *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp., i inne).

w imieniu Komitetu Organizacyjnego

Prof. zw. dr hab. A. Furowicz

http://rcin.org.pl

Drożdże modelowym organizmem eukariotycznym w biologii molekularnej

Yeast-model eucaryotic organism in molecular biology

JOANNA RYTKA[1]
GRAŻYNA PALAMARCZYK[2]

Spis treści:

I. **Wstęp**
II. **Cykl życiowy *Saccharomyces cerevisiae***
III. **Genom *Saccharomyces cerevisiae***
III-1. Genom jądrowy
III-2. Genom mitochondrialny
IV. **Ekspresja genów**
V. **Podsumowanie**

Contents:

I. **Introduction**
II. ***Saccharomyces cerevisiae* life cycle**
III. ***Saccharomyces cerevisiae* genome**
III-1. Nuclear genome
III-2. Mitochondrial genome
IV. **Gene expression**
V. **Summary**

I. Wstęp

Po blisko trzydziestu latach od czasu opisania przez Ö. W i n g e pierwszych mutantów *S. cerevisiae* w 1961 roku w Carbondale (USA) spotkało się jedenastu badaczy, z siedmiu laboratoriów z USA, Kanady i Włoch, aby ustalić zasady nazewnictwa mutantów drożdży. Żaden z uczestników tego spotkania nie przypuszczał, że po latach zostanie ono uznane za pierwszą międzynarodową konferencję poświęconą genetyce drożdży. W następnym spotkaniu, które odbyło się po dwóch latach, w Gif sur Yvette (Francja), uczestniczyły już 53 osoby. Przedstawione tam prace wykazały, że drożdże są dogodnym obiektem w badaniu mechanizmów genetycznej kontroli metabolizmu eukariontów. Od tego czasu konferencje (*International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology*) organizowane są co dwa lata. W ostatniej, która odbyła się w Wiedniu w 1992 r., wzięło udział ponad 1000 osób. Ta niezwykła kariera drożdży, zwanych niekiedy „*E. coli* eukariontów", wynika z faktu, że wiedza o biologii komórkowej i molekularnej tego mikroorganizmu umożliwia wyjaśnienie wielu procesów zachodzących w komórkach wyższych eukariontów. Pozwala na to znaczny konserwatyzm ewolucyjny struktur i funkcji komórkowych.

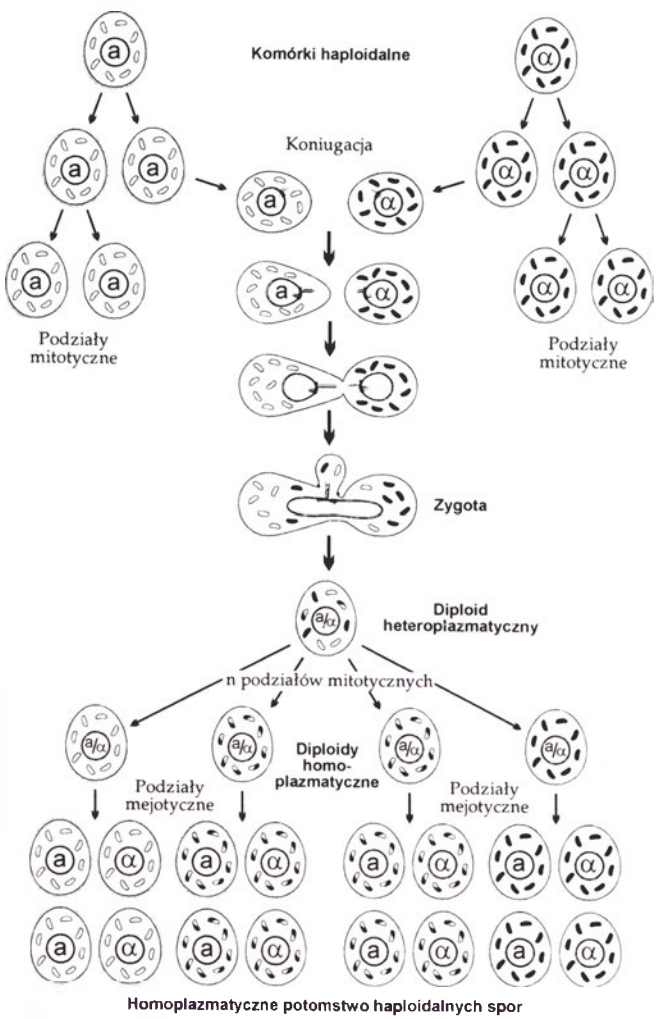
Drożdże, *Saccharomyces cerevisiae*, są organizmami jednokomórkowymi, ale pod względem złożoności budowy ich komórki nie różnią się od komórek wyższych organizmów. Natomiast tak jak bakterie charakteryzuje je krótki czas generacji. Drożdże hoduje się na podłożach płynnych i stałych o ściśle zdefiniowanym składzie. Zmieniając ich skład można badać wpływ środowiska na metabolizm, co jest nieosiągalne w przypadku komórek wyższych eukariontów przystosowanych do życia w warunkach homeostazy. *S. cerevisiae* są względnymi tlenowcami i hodowane w warunkach beztlenowych czerpią energię wyłącznie z procesów fermentacji. W tych warunkach następuje zahamowanie funkcji mitochondriów, nie powoduje to śmierci komórki, a jedynie niezdolność do wzrostu na nie ulegających fermentacji źródłach węgla, jak np. glicerol, etanol, mleczan. Jednakże główną zaletą drożdży jest wyjątkowa łatwość stosowania metod klasycznej i molekularnej genetyki. *S. cerevisiae* są najlepiej scharakteryzowanym pod względem genetycznym mikroorganizmem eukariotycznym.

[1,2] prof. dr hab., Zakład Genetyki[1] i Zakład Biochemii Lipidów[2] Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

http://rcin.org.pl

II. Cykl życiowy *S. cerevisiae*

Rycina 1 przedstawia schemat cyklu życiowego *S. cerevisiae*. Haploidalne komórki rozmnażają się przez pączkowanie na drodze podziałów mitotycznych. Przez połączenie dwóch komórek haploidalnych o różnych znakach koniugacyjnych (MATa i MATα) powstaje heterozygota, która daje początek diploidalnemu potomstwu. Komórki diploidalne, tak jak haploidalne rozmnażają się przez podziały mitotyczne. W warunkach głodu azotowego i w obecności źródła węgla nieulegającego fermentacji, diploidalne komórki



Ryc. 1. Schemat cyklu życiowego *S. cerewisiae*
a i α — geny jądrowe determinujące typy koniugacyjne MATa i MATα
— różne genomy mitochondrialne typu rodzicielskiego
— genomy mitochondrialne zrekombinowane
Komórki haploidalne rozmnażają się przez podziały mitotyczne. Połączenie dwóch komórek o przeciwnych typach koniugacyjnych *a* i α i różnych genomach mitochondrialnych prowadzi do powstania heteroplazmatycznej zygoty (koniugacja). Po kilku lub kilkunastu mitotycznych podziałach komórek diploidalnych *a*/α następuje segregacja cech mitochondrialnych i powstają homoplazmatyczne diploidy, o genotypach mitochondrialnych rodzicielskich i zrekombinowanych. W wyniku podziałów mejotycznych komórki diploidalnej powstają cztery haploidalne spory (sporulacja) o identycznym genotypie mitochondrialnym. Typ koniugacyjny i pozostałe markery jądrowe segregują w stosunku 2:2

ulegają podziałom mejotycznym (sporulacja). W wyniku mejozy powstają cztery haploidalne spory, dwie o typie koniugacyjnym MATa i dwie-MATα. Dają one początek pokoleniu haploidalnemu. Obecność w cyklu życiowym drożdży fazy rozmnażania płciowego i możliwość kontroli tego procesu, jak również stabilność haploidalnych i diploidalnych szczepów pozwala na łatwe otrzymywanie czystych linii komórkowych oraz stosowanie klasycznych metod genetycznych takich jak: testy komplementacji, dominacji i analizę segregacji mutacji w tetradach. Izolacja i analiza mutantów zaburzonych w poszczególnych etapach cyklu życiowego komórki stanowi nieocenione źródło informacji w badaniu genetycznych, biochemicznych i morfologicznych wydarzeń procesu kariokinezy i cytokinezy, różnicowania typu koniugacyjnego czy też gametogenezy. Przykładem tego są termowrażliwe mutanty zaburzone w cyklu podziałowym komórki (ang. *cdc-cell division cycle*). Zidentyfikowano ponad 50 genów kontrolujących poszczególne etapy tego procesu [1]. Zsekwencjonowanie genów *CDC* umożliwiło ustalenie pierwszorzędowej struktury białek cytoszkieletu. Sekwencja aminokwasowa takich białek jak tubulina i aktyna wykazuje 75% i 89% identyczności z sekwencją odpowiednich białek w komórkach ludzkich [2]. Identyfikacja genów homologicznych do onkogenów *ras* jest kolejnym dowodem, że badanie cyklu podziałowego komórki drożdży może ułatwić zrozumienie natury proliferacji komórek eukariotycznych [3].

III. Genom *S. cerevisiae*

W komórkach drożdży występują dwa systemy genetyczne, jądrowy i mitochondrialny.

III-1. Genom jądrowy

W jądrze komórki drożdżowej znajduje się 16 liniowych chromosomów o różnej długości od 200 do 2200 par zasad. Całkowitą wielkość genomu jądrowego szacuje się na około $1{,}4 \times 10^7$ par zasad. Przy założeniu, że przeciętna wielkość genu wynosi 2000 par zasad ilość genów oszacowano na około 6000. Każdy z chromosomów zawiera wiele miejsc inicjacji replikacji, centromer i dwa telomery. Ustalono sekwencje najwyższej zgodności dla miejsc inicjacji replikacji i centromerów oraz poznano charakterystyczne sekwencje telomerów, inne od sekwencji pozostałej części DNA [4-7]. Chromosomy zawierają również ruchome elementy DNA — transpozony *Ty*. Ich liczba i pozycja w genomie jest różna i zależy od szczepu (przeciętnie 30 w genomie diploidalnym) [8, 9].

Badania nad skonstruowaniem mapy genetycznej chromosomów drożdży zapoczątkowane w 1949 r. przez Lindegrena [10] są prowadzone po dzień dzisiejszy przez Mortimera i wsp. [11]. Dotychczas zmapowano około 1000 genów i opisano przynaj-

http://rcin.org.pl

mniej drugie tyle mutacji, których pozycja na mapie genetycznej nie została ustalona. Mapa ta stanowi nieocenioną pomoc w sekwencjonowaniu genomu [por. artykuł E. Grzybowskiej i wsp. w tym numerze]. Funkcjonalnie pokrewne geny, poza nielicznymi wyjątkami, są rozmieszczone w różnych miejscach genomu, pomimo że ich ekspresja podlega wspólnej regulacji. Poszczególne geny tworzą odrębne jednostki transkrypcyjne.

III-2. Genom mitochondrialny

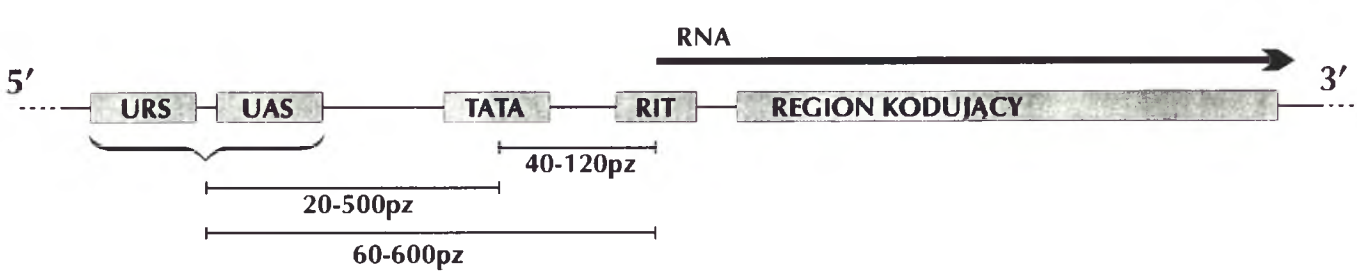
Badania nad dziedziczeniem mitochondrialnym zapoczątkowało odkrycie przez Ephrussiego i wsp. [12] mutantów drożdży niezdolnych do wzrostu na niefermentowalnych źródłach węgla. Mutanty, które w krzyżówkach wykazywały niemendlowską segregację tej cechy nazwano *rho-*. Czynnik *rho* zidentyfikowano z DNA mitochondrialnym dopiero po kilkunastu latach. Mitochondrialny DNA jest kolistą cząsteczką zbudowaną z około 75000 par zasad (wielkość cząsteczek jest różna i zależy od tła genetycznego). Ilość mtDNA w komórkach jest zmienna. Przyjmuje się, że haploidalna komórka drożdży zawiera 30-50 identycznych cząsteczek mtDNA. Na rycinie 1 przedstawiono schemat dziedziczenia cech mitochondrialnych. Genetyce i strukturze mitochondrialnego DNA drożdży poświęcono cykl artykułów przeglądowych w *Postępach Mikrobiologii* [1978 r. tom 17, zeszyt 3/4). Omawiając znaczenie drożdży jako modelowego organizmu eukariotycznego należy podkreślić, że uzyskanie licznych punktowych i delecyjnych mutacji mitochondrialnych umożliwiło badanie zjawisk rekombinacji, transmisji i segregacji mtDNA, a także pozwoliło na skonstruowanie genetycznej i fizycznej mapy genomu mitochondrialnego *S. cerevisiae*. Mutacje w DNA jądrowym prowadzące do zaburzenia funkcjonowania mitochondriów pozwalają na badanie współdziałania obu systemów genetycznych w procesie biogenezy mitochondriów [13].

III-3. Inne elementy dziedziczenia pozachromosomalnego

W jądrze komórek drożdży znajduje się 2 μm kolisty dwuniciowy DNA o wielkości 6.3 kb. Jest to plazmid występujący w liczbie 50-100 kopii i stanowi 1-2% całkowitego DNA. Nie udało się dotychczas ustalić żadnego fenotypu związanego z obecnością tego plazmidu w komórce. Replikacja plazmidu znajduje się pod kontrolą niektórych przynajmniej genów *CDC*. 2 μm plazmid stanowi modelowy system w badaniu replikacji DNA, a ponadto został wykorzystany do konstrukcji wielu wektorów drożdżowych [14]. Inny przykład dziedziczenia pozachromosomalnego stanowi dsRNA wirus tzw. *killer*. Komórki szczepów przenoszących tego wirusa wydzielają do podłoża toksynę, zabijającą komórki szczepów wrażliwych. Badania nad mechanizmem dziedziczenia cechy *killer* wykazały, że utrzymywanie i namnażanie wirusa wymaga współudziału co najmniej 32 genów jądrowych nazwanych *MAK* (ang. *maintenance of killer*). Oporność oraz wrażliwość szczepów na działanie toksyny również zależy od genów jdrowych. Dziedziczenie cechy *killer* stanowi doskonały system w badaniu mechanizmów genetycznej kontroli procesów potranslacyjnej obróbki białek i ich sekrecji [15].

IV. Ekspresja genów

Ekspresja większości genów drożdżowych kodujących białka (transkrybowanych przy udziale polimerazy II RNA) jest konstytutywna i na stosunkowo niskim poziomie (1-2 cząsteczek mRNA/komórkę). mRNA stanowi zaledwie 1% ilości całkowitego RNA, rycina 2 przedstawia schemat obszaru promotorowego genu drożdżowego. 5′ niekodujące fragmenty DNA są bogate w pary AT w związku z tym w promotorach wielu genów występują liczne sekwencje typu TATA-box. Tylko niektóre z tych sekwencji biorą udział w procesie inicjacji transkrypcji. Odległość między sekwencją TATA a miejscem inicjacji transkrypcji wynosi 40-120 par zasad [16]. Nie znaleziono stałej sekwencji w obszarze inicjacji transkrypcji odpowiadającej sekwencji *inr* w promotorach genów ssaków. Wiele genów *S. cerevisiae* posiada liczne miejsca inicjacji transkrypcji [17, 18]. Dla większości genów drożdżowych długość sekwencji liderowej transkryptu wynosi 20-60 nukleotydów, ale np. w transkrypcie genu *GCN4* wynosi 591 nukleotydów [19]. Transkrypty o długiej sekwencji liderowej ulegają translacji ze zmniejszoną wydajnością [20]. W obszarze promotorowym genów znajdują



Ryc. 2. Schemat struktury obszaru promtorowego genów drożdżowych URS (ang. *Upstream Repressor Sequences*), UAS (ang. *Upstream Activator Sequences*) — sekwencje regulacyjne oddziaływujące z białkami regulatorowymi. RIT — miejsce inicjacji transkrypcji. Pozycja, liczba i rodzaj sekwencji regulacyjnych jest zmienna i charakterystyczna dla każdego genu.

http://rcin.org.pl

się również sekwencje regulacyjne (ang. *upstream regulatory sequences*) oddziaływujące z białkami regulatorowymi: UAS (ang. *upstream activator sequences*) — z aktywatorami i URS (ang. *upstream repressor sequences*) — z represorami. Są to na ogół krótkie sekwencje, a cechą charakterystyczną promotorów drożdżowych jest to, że sekwencje regulacyjne często znajdują się w znacznej odległości (do 600 par zasad) od miejsca inicjacji transkrypcji. Wykazano obecność sekwencji regulacyjnych o najwyższej zgodności (ang. *consensus sequences*) w obszarach promotorowych genów podlegających skoordynowanej ekspresji w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska [21]. Wprawdzie synteza białek regulowana jest głównie na poziomie transkrypcji, ale regulacja może zachodzić również na poziomie translacji [22, 23].

V. Podsumowanie

Przedstawione w ogromnym skrócie właściwości fizjologiczne, genetyczne i biochemiczne drożdży stanowią wstęp do artykułów publikowanych w bieżącym numerze *Postępów Biochemii*. Prezentują one kierunki badań związanych z tymi tematami prac w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN, w których drożdże *Saccharomyces cerevisiae* stanowią modelowy organizm w badaniu niektórych szlaków metabolicznych i biogenezy organelli.

Ponadto w jednym z artykułów omówiono międzynarodowy projekt badawczy sekwencjonowania genomu drożdży, w którym bierze udział nasz Instytut.

Artykuł otrzymano 1 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 7 czerwca 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Pringle R J, Hartwell L H (1981) W: Strathern J N, Jones E W, Broach J R (red.) The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, CSH, t. 1 str 97-142
2. Botstein D, Fink G R (1988) *Science* **240**: 1439-1443
3. Broach J R (1991) *Trends in Genetics* **7**: 28-33
4. Petes T D (1980) *Ann Rev Biochem* **49**: 845-876
5. Kearsey S (1984) *Cell* **37**: 299-307
6. Yeh E, Carbon J, Bloom K (1986) *Molec Cell Biol* **6**: 158-167
7. Shampay J, Szostak J W, Blackburn E H (1984) *Nature* (Lond) **310**: 154-157
8. Cameron J R, Loh E Y, Davis R W (1979) *Cell* **16**: 739-751
9. Boeke J D (1988) W: Berg D, Howe M (red.) Mobile DNA, ASM Public. Washington D.C. str 335-374
10. Lindegren C C (1949) *Hereditas*, Suppl. 338-335
11. Mortimer R K, Schild D, Contopoulu C R, Kans J A (1989) *Yeast* **5**: 321-403
12. Ephrussi B, Hottinguer H (1951) *Cold Spr Harb Symp Quant Biol* **16**: 75
13. Tzagoloff A, Dieckman C L (1990) *Microbiol Rev* **54**: 211-225
14. Meacock P A, Brieden K W, Cashmore A M (1989) W: Walton E F, Yarranton G T (red.) Molecular and Cell Biology of Yeasts, Blackie and Son Ltd, USA. Canada str 330-359
15. Sturley S L, Bostian K A, *ibid*, str 246-279
16. Struhl K (1989) *Ann Rev Biochem* **58**: 1051-1077
17. Li W-Z, Sherman F (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 666-676
18. Oechsner U, Hermann H, Zollner A, Haid A, Bandlow W (1992) *Mol Gen Genet* **232**: 447-459
19. Cigan M A, Donahue T F (1987) *Gene* **59**: 1-18
20. Cigan M A, Pabich E K, Donahue T F (1988) *Molec Cell Biol* **8**: 2964-2975
21. Verdier J-M (1990) *Yeast* **6**: 271-297
22. Werner M, Feller A, Messenguy F, Pierard A (1987) *Cell* **49**: 805-813
23. Linder P (1992) *Antonie van Leeuwenhoek* **62**: 47-62

Zarząd Główny
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
w dniach 2-3 grudnia 1993 roku organizuje **SZKOŁĘ ZIMOWĄ** dla młodych pracowników nauki na temat „PRZEKAZYWANIE SYGNAŁÓW W KOMÓRCE". Odbędą się następujące wykłady:

— Budowa i funkcja błon
— Molekularne mechanizmy transportu
— Receptory, ich klasyfikacje i funkcje
— Receptory czynników wzrostu, budowa i funkcja
— Molekularne podstawy mechanizmu działania insuliny
— Budowa i funkcja białek G
— cAMP i cGMP jako wtórne przekaźniki informacji
— Wapń jako wtórny przekaźnik informacji
— Biosynteza i fizjologiczna funkcja tlenku azotu

Zajęcia odbędą się w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Organizatorzy nie zapewniają noclegów. Zainteresowani proszeni są o zgłaszanie swego udziału do dnia 15 października 1993 roku na sdres:
Prof. Liliana Konarska, Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, Akademia Medyczna, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, lub
Doc. Jolanta Barańska, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa. Program i szczegółowe informacje zostaną przesłane osobom zainteresowanym w listopadzie.

 http://rcin.org.pl

Sekwencjonowanie genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Cele, strategie, rezultaty

Sequencing of the genome of yeast *Saccharomyes cerevisiae* Aims, strategies and results

EWA GRZYBOWSKA[1],
ANDRZEJ MIGDALSKI[1],
MAREK ZAGULSKI[1]

Spis treści:

I. Postępy w sekwencjonowaniu genomów
II. Sekwencjonowanie genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
II-1. Drożdże — organizm modelowy
II-2. Projekty sekwencjonowania genomu drożdży — założenia i organizacja pracy
II-3. Metody sekwencjonowania genomu drożdży
3-1. Przygotowanie banku chromosomalnego drożdży
3-2. Przygotowanie klonów do sekwencjonowania
3-2.1. Uporządkowane skracanie wstawki
3-2.2. Metoda "shotgun"
3-3. Techniki sekwencjonowania DNA
III. Analiza funkcjonalna nowo odkrytych genów
III-1. Analiza komputerowa
III-2. Analiza fizjologiczna
III-3. Badanie poziomu ekspresji nowo odkrytych genów
III-4. Analiza produktów białkowych nowo odkrytych genów
IV. Chromosom III
V. Udział polskich laboratoriów w sekwencjonowaniu genomu drożdży

Contents:

I. Progress in genomic sequencing
II. Sequencing of the genome of yeast *Saccharomyces cerevisiae*
II-1. Yeast — a model organism
II-2. Yeast genom sequencing projects — principles and organization
II-3. Methods for yeast genome sequencing
3-1. Construction of the yeast chromosomal library
3-2. Construction of the clones suitable for sequencing
3-2.1. Ordered shortening of the insert
3-2.2. "Shotgun" method
3-3. DNA sequencing technics
III. Functional analysis of the newly discovered genes
III-1. Computer analysis
III-2. Physiological analysis
III-3. Expression level of the newly discovered genes
III-4. Analysis of the protein products of the newly discovered genes
IV. Chromosome III
V. Contribution of the Polish laboratories in the yeast sequencing project

I. Postępy w sekwencjonowaniu genomów

Systematyczne sekwencjonowanie całości materiału genetycznego dowolnego organizmu dostarcza wielkiej ilości danych dotyczących nie tylko samej struktury pierwszorzędowej genów i kodowanych przez nie białek, ale także informacji o regulacji ekspresji genów i organizacji całego genomu. Uzyskane dotychczas rezultaty pozwalają nam uświadomić sobie ogrom naszej ignorancji w zakresie funkcji biologicznych większości genów, nawet u tak znanego i dobrze scharakteryzowanego genetycznie gatunku jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Tradycyjne metody genetyczne pozwalają na wykrycie jedynie części genów — tych których ekspresja daje wyraźny efekt fenotypowy. Systematyczne sekwencjonowanie genomu daje możliwość wykrycia wielu nowych otwartych ramek odczytu (ORF — ang. *open reading frame*) o nieznanej dotąd funkcji. Takich ORF-ów jest zaskakująco wiele. Sekwencja aminokwasowa wydedukowana na podstawie sekwencji nukleotydowej dużej części spośród tych genów często nie wykazuje żadnej znaczącej homologii do znanych dotychczas białek. Także wyłączenie potencjalnej funkcji wielu spośród nich poprzez dysrupcję nie powoduje takiej zmiany czynności życiowych, którą moglibyśmy wykryć. W analizie genomu wyższych eukariontów istotne będzie także zbadanie

[1] mgr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5A

http://rcin.org.pl

struktury i pozycji elementów regulujących transkrypcję i składanie genów, zbadanie rozmieszczenia i ilości elementów powtarzających się i nietranskrybowanych przerywników, roli fizycznego oddzielenia w regulacji ekspresji genów, a także rozmieszczenia transpozonów i retropozonów. Analiza sekwencji pseudogenów, elementów przemieszczających się i rodzin genowych może być także istotna dla śledzenia ewolucji badanych sekwencji. Osiągnięcie tych rezultatów nie jest jednak łatwe ze względu na rozmiary większości genomów. Do tej pory udało się uzyskać pełną sekwencję jedynie niektórych genomów chloroplastowych i mitochondrialnych, kilku wirusów (cytomegalowirus, wirus Epsteina-Barra, *Herpes simplex* i innych), większości genomu *E. coli* i kilku innych bakterii. Pierwszym organizmem eukariotycznym, którego jądrowe DNA zaczęto systematycznie sekwencjonować były drożdże *S. cerevisiae*, ale istnieją już zaawansowane projekty sekwencjonowania nicienia *Caenorhabditis elegans*, muchy *Drosophila melanogaster*, rośliny *Arabidopsis thaliana* i genomu ludzkiego. Ze względu na wielkie różnice między tymi genomami (genom drożdżowy ma 15×10^3 Kb, *Arabidopsis* — 1×10^5 Kb, zaś ludzki — 3×10^6 Kb, [1]) w każdym projekcie stosuje się inne metody uzyskania sekwencji. Praca na taką skalę nie jest oczywiście możliwa w tylko jednym laboratorium, dlatego projekty sekwencjonowania grupują dużą liczbę różnych pracowni, co nie tylko umożliwia realizację projektu, ale przyczynia się do ścisłej współpracy i wymiany informacji w świecie nauki.

Najbardziej kontrowersyjnym a zarazem pociągającym przedsięwzięciem jest oczywiście sekwencjonowanie genomu ludzkiego. Pomysł ten narodził się w latach osiemdziesiątych jako jedna z dróg prowadzących do zwalczania raka przez poznanie wszystkich genów, które mogą mieć znaczenie przy jego powstawaniu.

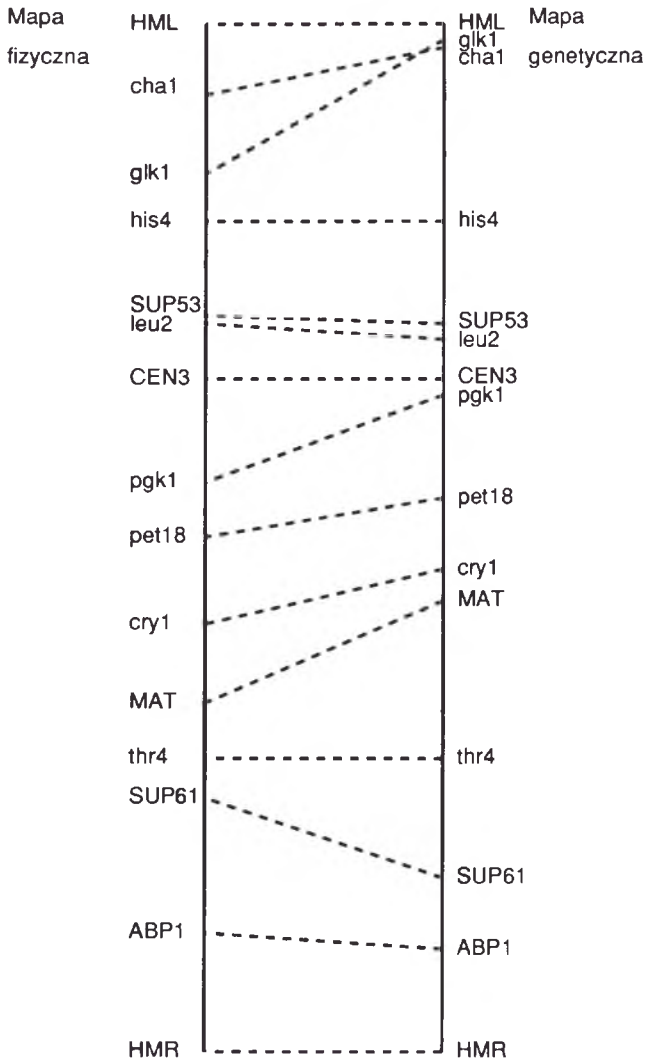
1 października 1990 roku jest oficjalną datą powstania w Stanach Zjednoczonych projektu sekwencjonowania genomu ludzkiego (ang. *Human Genom Project*, *HGP*). Do koordynacji prac nad HGP na skalę międzynarodową powołano specjalną organizację (Human Genom Organization, HUGO, [2]). Dotychczasowe wyniki wykazały, że genom ludzki jest w dużej mierze złożony z sekwencji niekodujących i nie mających żadnej funkcji — „samolubnego" DNA. Składają się na nie głównie sekwencje repetytywne i pseudogeny. Sekwencjonowanie całości tego materiału jest długotrwałe i uciążliwe, priorytet ma więc sekwencjonowanie fragmentów kodujących. Osiąga się to przez wykorzystanie sekwencji uzyskanych z biblioteki cDNA — a więc ulegających ekspresji, tzw. EST (ang. *expression sequence tags*, [1]). Analiza cDNA i sekwencjonowanie całego genomu nie są jednak alternatywnymi metodami dla osiągnięcia tego samego celu, ale raczej wzajemnie się uzupełniają. Analiza cDNA może przynieść zlokalizowanie genów ulegających ekspresji, ale z definicji nie może rzucić wiele światła na procesy regulacji tej ekspresji. Projekt zakłada ukończenie prac nad sekwencjonowaniem kodującej części genomu w 2005 roku.

II. Sekwencjonowanie genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

II-1. Drożdże — organizm modelowy

Użyteczność i uniwersalna wartość organizmu modelowego polega na możliwości ekstrapolowania otrzymanych danych na inne gatunki. Dotyczy to zarówno szukania homologii w sekwencji genów, jak i wyciągania wniosków dotyczących funkcji produktów tych genów. Organizmem modelowym jest na przykład *E. coli* dla bakterii, *Drosophila melanogaster* dla owadów czy mysz w przypadku ssaków. Badacze roślin byli przez długi czas upośledzeni ze względu na brak podobnego modelu. Wybór padł ostatecznie na *Arabidopsis thaliana*, roślinę o niewielkim genomie (zaledwie 100 Mb, a więc tylko sześć razy więcej niż genom drożdżowy, a o wiele mniej niż u większości roślin), szybko się rozmnażającą i produkującą wiele nasion [3]. W przypadku niższych eukariontów wybór padł na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* — są one idealnym obiektem badań prowadzących do zrozumienia podstawowych cech komórki eukariotycznej. Cenną z punktu widzenia sekwencjonowania zaletą ich genomu jest skondensowanie informacji — w odróżnieniu od genomu ludzkiego w DNA drożdży niewiele jest intronów i sekwencji repetytywnych [41]. Genom drożdżowy jest niewielki — stanowi go około 15 000 kb w których znajduje się — jak się ocenia — 5000-6000 genów, co daje średnio 1 gen na każde 2 kb sekwencji. Pozwala to na szybkie zsekwencjonowanie dużej ilości genów [5]. Chromosomy drożdży, pomimo niewielkich rozmiarów, przypominają strukturą, mechanizmem replikacji, rekombinacji i segregacji swoje odpowiedniki z organizów wyższych. Jest ich 16, są różnej długości i dają się łatwo rozdzielić przy pomocy elektroforezy pulsowej. Opracowano mapy genetyczne wszystkich chromosomów. Porównanie mapy genetycznej z fizyczną, otrzymaną na podstawie sekwencji (wykonane dla chromosomu III — jedynego zsekwencjonowanego w całości) wykazuje rozbieżności w odległościach między genami. Rozbieżności te można wytłumaczyć faktem, iż częstotliwość rekombinacji wewnątrz chromosomu jest zmienna i zaburzana obecnością miejsc „zimnych" i „gorących" (o wyjątkowo niskiej i wysokiej częstości rekombinacji). Przeciętny stosunek odległości między genami na mapie genetycznej do odległości na mapie fizycznej (dla drożdży) wynosi 0.34 centimorgana na 1 kb [6]. Mimo rozbieżności, dostępność map genetycznych jest cenną pomocą przy identyfikacji nowo odkrytych otwartych ramek odczytu. Zależności między mapą genetyczną i fizyczną w chromosomie III ilustruje rycina 1.

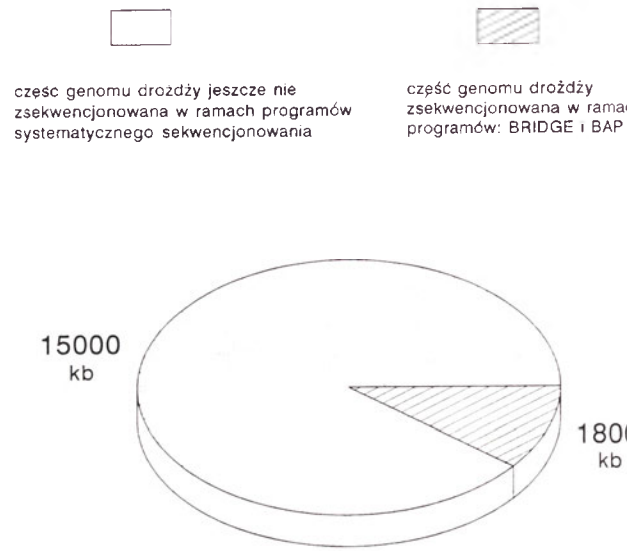
http://rcin.org.pl



Ryc. 1. Porównanie mapy genetycznej i fizycznej chromosomu III. Mapa fizyczna została opracowana na podstawie sekwencji, zaś genetyczna na podstawie analizy częstości zachodzenia rekombinacji mejotycznej [6].

II-2. Projekty sekwencjonowania genomu drożdży — założenia i organizacja pracy

Rozważano dwa możliwe podejścia metodyczne do sekwencjonowania DNA na wielką skalę: rozdzielenie pracy pomiędzy wiele laboratoriów lub skupienie jej w kilku ściśle wyspecjalizowanych centrach. Ta druga możliwość byłaby prawdopodobnie tańsza, efektywniejsza i dawałaby wyniki porównywalnej jakości — ale istnieje tu problem psychologiczny: skąd wziąć tak wielu naukowców chętnych do zajmowania się wyłącznie sekwencjonowaniem? „...sekwencje są pasjonujące ale sekwencjonowanie jest nudne" (J. F r i s e n, Sick Children's Hospital, Toronto). Dlatego też ostatecznie przyjęto pierwsze rozwiązanie. Założono, że sekwencjonowanie będzie się odbywało w kilku fazach. Pierwsza obejmująca sekwencjonowanie chromosomów: III, II i XI została ukończona w kwietniu 1993 roku i przyniosła ustalenie sekwencji około 1800 kb DNA. Następna faza rozpoczęła się w 1993 roku i dotyczy sekwencjonowania chromosomów: IV, VIII, IX, X, XII, XIII, XIV, XV i — być może — VII. Jej koniec planuje się w końcu roku 1997. Sekwencjonowanie odbywa się w ramach programów: BAP (chromosom III), BRIDGE (Biotechnology Research for Innovation, Development and Growth in Europe) i ostatnio — BIOTECH [7]. Rycina 2 ukazuje jaka część genomu drożdżowego została już zsekwencjonowana.



Ryc. 2. Stopień zsekwencjonowania genomu *S. cerevisiae*

Wszystkie te programy są sponsorowane przez Wspólnotę Europejską (ang. *European Community* — EC) i koordynowane przez jej przedstawicieli. Poza Europą sekwencjonowane są chromosomy: I (najmniejszy) w Kanadzie, VI w Japonii i V w USA. Sekwencjonowanie genomu drożdży jest więc przedsięwzięciem na skalę światową. Istotne z finansowego punktu widzenia jest zainteresowanie jakie budzą projekty sekwencjonowania genomu drożdży u firm zajmujących się biotechnologią. W 1991 roku powołano organizację zrzeszającą kompanie europejskie reprezentujące rolnictwo, przemysł chemiczny i farmaceutyczny, której celem jest wspieranie badań nad drożdżami (ang. *Yeast Industry Platform*, [7]).

II-3. Metody sekwencjonowania genomu drożdży

Warunkiem zgodności danych pochodzących z różnych projektów musi być uzgodnienie szczepu *S. cerevisiae*, który ma być sekwencjonowany. Jest to istotne ze względu na polimorfizm sekwencji u różnych szczepów, występujący zwłaszcza w sekwencjach niekodujących. Ostatecznie przyjęto, że szczepem sekwencjonowanym będzie S288C [7].

3-1. Przygotowanie banku chromosomalnego drożdży

Pracę nad sekwencjonowaniem chromosomu rozpoczyna przygotowanie banku zachodzących na siebie klonów pokrywających kilkukrotnie cały chromosom. Klony te są najczęściej wielkości 25-30 kb i są przygo-

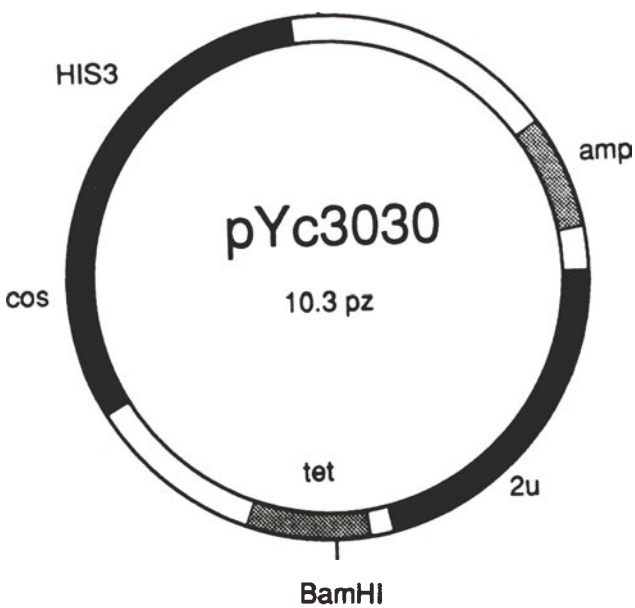
http://rcin.org.pl

towane na kosmidach — czyli wektorach posiadających cechy zarówno wektorów plazmidowych jak i fagowych. Kosmidy zawierają sekwencje bakteryjnego plazmidu *colE1* do których dodano sekwencje *cos*, pochodzące z faga i niezbędne do upakowania DNA faga w otoczkę białkową. Do otrzymanego w ten sposób wektora można włączyć dowolny odcinek DNA o długości zbliżonej do DNA faga (ok. 30 kb), który, dzięki sekwencjom *cos* będzie wydajnie pakowany w otoczki białkowe i może być wprowadzony do komórek bakterii. Zwykłe plazmidy bakteryjne nie są w stanie przyjąć i utrzymać tak dużego fragmentu obcego DNA. Kosmid jest więc doskonałym wektorem do stworzenia banku dużych fragmentów powstałych po trawieniu całego chromosomu [8]. Przygotowanie banku odbywa się w dwóch etapach. Pierwszym jest częściowe trawienie totalnego drożdżowego DNA i ligacja powstałych fragmentów z odpowiednim wektorem. Drugi etap polega na wybraniu klonów zawierających DNA badanego chromosomu poprzez hybrydyzację z sondą, którą stanowi wyznakowane DNA tego chromosomu. Wektor wykorzystany w pracach nad sekwencjonowaniem chromosomu III jest przedstawiony na rycinie 3.

Za przygotowanie fragmentów do sekwencjonowania odpowiedzialny jest koordynator prac nad danym chromosomem. Przygotowuje on wstępną mapę restrykcyjną odpowiednich kosmidów, która jest potem weryfikowana w toku sekwencjonowania.

3-2. Przygotowanie klonów do sekwencjonowania

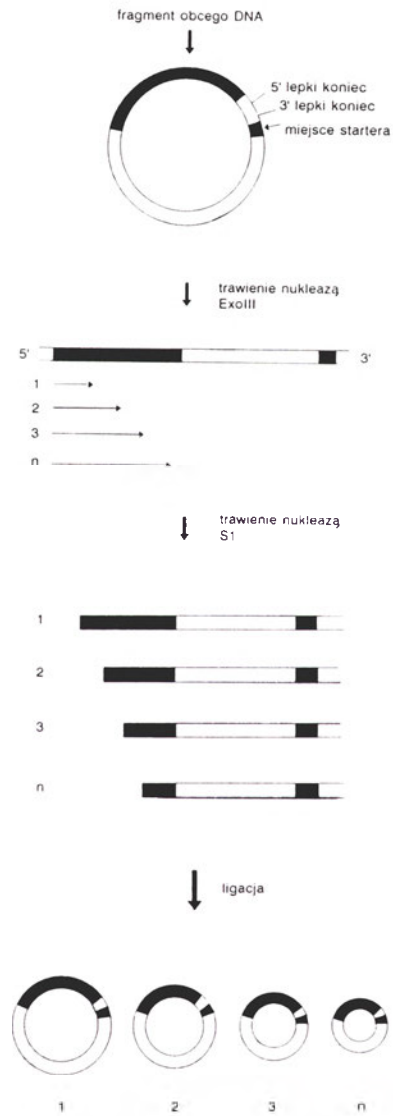
Projekt wchodzi następnie w fazę decentralizacji — kosmidy są rozsyłane do wielu laboratoriów, w których są sekwencjonowane. Sekwencjonowanie tak dużego fragmentu wymaga jego skrócenia lub fragmentacji, aby powstałe mniejsze fragmenty można było w całości zsekwencjonować. Techniki stosowane w tym celu można podzielić na dwie grupy: skracanie „uporządkowane" — generujące fragmenty o dającej się przewidzieć długości oraz przypadkowe.



Ryc. 3. Kosmid pYC3030 użyty do konstrukcji banku przy sekwencjonowaniu chromosomu II. Miejsce BamHI posłużyło do wklonowania fragmentów chromosomalnego DNA częściowo strawionego enzymem Sau3A, który daje takie same lepkie końce jak BamHI. Poza sekwencją *cos* wektor ten zawiera geny markerowe (HIS, tet, amp) oraz sekwencję 2μ DNA pochodzącą z naturalnego plazmidu drożdżowego.

3-2.1. Uporządkowane skracanie wstawki

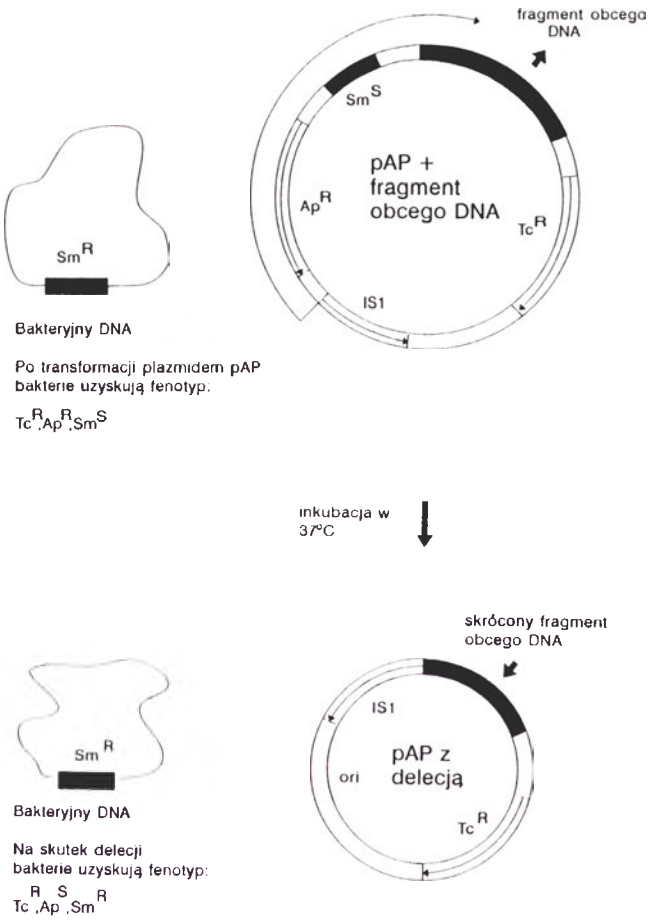
Do otrzymania skróconych klonów stosuje się głównie ograniczone trawienie egzonukleazami (ExoIII, BalI) — tworzy się w ten sposób zespół klonów z których każdy jest skrócony o około 300 nukleotydów w stosunku do poprzedniego [9] (Ryc. 4).



Ryc. 4. Metoda tworzenia jednokierunkowych delecji z wykorzystaniem ExoIII. DNA plazmidu zawierającego fragment chromosomu drożdżowego jest trawione tak dobranymi enzymami restrykcyjnymi, że od strony miejsca startera (które znajduje się na plazmidzie) tworzy się 3' lepki koniec, zaś od strony insertu — 5' lepki koniec. ExoIII jest w stanie trawić jedną nić DNA tylko od strony 5' końca. Pobieranie części materiału z tej reakcji w różnych punktach czasowych pozwala na uzyskanie klonów w różnym stopniu skróconych. Nukleaza S1 trawi jednoniciowe fragmenty DNA pozostawiając tępe końce, które są następnie ligowane. Powstaje w ten sposób komplet skróconych klonów.

http://rcin.org.pl

Stosuje się także skracanie z wykorzystaniem efektu transpozycji — skonstuowano wektor [10] zawierający sekwencję insercyjną IS1 wywołującą powstawanie delecji o różnej wielkości w następującej po niej sekwencji. Zaraz za sekwencją insercyjną znajduje się gen oporności na ampicylinę i gen warunkujący wrażliwość na streptomycynę — dzięki temu można odróżnić skrócone klony na odpowiedniej pożywce selekcyjnej. Skracanie fragmentów DNA z zastosowaniem elementów transpozycyjnych przedstawiono na rycinie 5.



Ryc. 5. Układ do selekcji *in vivo* delecji indukowanych przez sekwencję IS1. Plazmidem z wklonowanym fragmentem obcego DNA transformuje się bakterie oporne na streptomycynę, wskutek czego uzyskują one fenotyp Tc^R,Ap^R,Sm^S. Bakterie są najpierw wysiewane na pożywkę zawierającą ampicylinę i tetracyklinę. Kolonie, które wyrosną są przenoszone do hodowli płynnej z dodatkiem tetracykliny. Hodowla taka jest wysiewana na płytki zawierające tetracyklinę i streptomycynę. Bakterie, które wyrosną powinny być wrażliwe na ampicylinę. Oznacza to, iż zaszła delecja genów oporności na ampicylinę i wrażliwości na tetracyklinę, oraz — zapewne — delecja części insertu.

3-2.2 Metoda "shotgun"

Techniki za pomocą których uzyskuje się zespół przypadkowych klonów (techniki "shotgun") polegają na fragmentowaniu drożdżowego DNA (enzymatycznie — przy użyciu DNAzy I lub mechanicznie — poprzez sonifikację) i klonowaniu powstałych fragmentów w odpowiednim wektorze. Taka procedura prowadzi wprawdzie do kilkukrotnego sekwencjonowania tego samego fragmentu, ale jest mimo to szybsza i tańsza od technik „uporządkowanego skracania". Poza tym kilkukrotne powtórzenie tej samej sekwencji nie jest niekorzystne — daje bowiem dużą pewność, że uzyskana sekwencja jest prawdziwa. Prawdopodobieństwo otrzymania prawidłowej sekwencji zwiększa fakt, że zawsze sekwencjonowane są obie nici DNA. Porównanie technik sekwencjonowania DNA genomowego przedstawia tabela 1.

Tabela 1.
Porównanie technik wykorzystywanych w projekcie sekwencjonowania genomu drożdżowego

Metoda	Wady	Zalety	Uwagi
"Shotgun"	przypadkowość, preferencyjne włączanie pewnych fragmentów, po uzyskaniu części sekwencji reszta jest uzupełniana przy pomocy specyficznych starterów	tania, łatwa, szybka	intensywne komputerowe opracowanie danych, wymaga oprogramowania o wysokim standardzie, ta sama sekwencja jest powielana kilka razy
uporządkowane skracanie	droga, duży nakład pracy	łatwo uzyskać zachodzące na siebie klony w ustalonej kolejności, można uniknąć syntezy starterów	

3-3 Techniki sekwencjonowania DNA

Sekwencjonować można metodami tradycyjnymi lub używając aparatu do sekwencjonowania automatycznego — obie metody opierają się na technice Sangera [11]. Tradacyjnie sekwencjonuje się stosując znakowanie radioaktywnymi izotopami siarki lub fosforu, obecnie jednak możliwe jest już zautomatyzowanie tej metody przy zastosowaniu startera znakowanego fluorescencyjnie i odczytu laserowego. Automatyczne urządzenia do sekwencjonowania są już w powszechnym użyciu. Po uzyskaniu sekwencji każde laboratorium przesyła ją do informatycznego centrum koordynacji prac nad projektem — funkcję tą pełni baza danych MIPS (Martinsried Institute for Protein Sequences). [7] Przesłane sekwencje są porównywane z innymi sekwencjami białkowymi w poszukiwaniu homologii. Nie wszystkie informacje zawarte w bazie danych MIPS są ogólnodostępne — część z nich jest jeszcze nieopublikowana i traktowana jako dane „poufne" (tzw. *confidential data set*). Dostęp do nich mają tylko upoważnione osoby uczestniczące w projekcie. Dane te są jednak brane pod uwagę przy szukaniu homologii z sekwencjami nowo złożonymi w bazie

http://rcin.org.pl

danych, a rezultaty poszukiwań przesyłane są do autorów sekwencji pocztą elektroniczną [12].

III. Analiza funkcjonalna nowo odkrytych genów

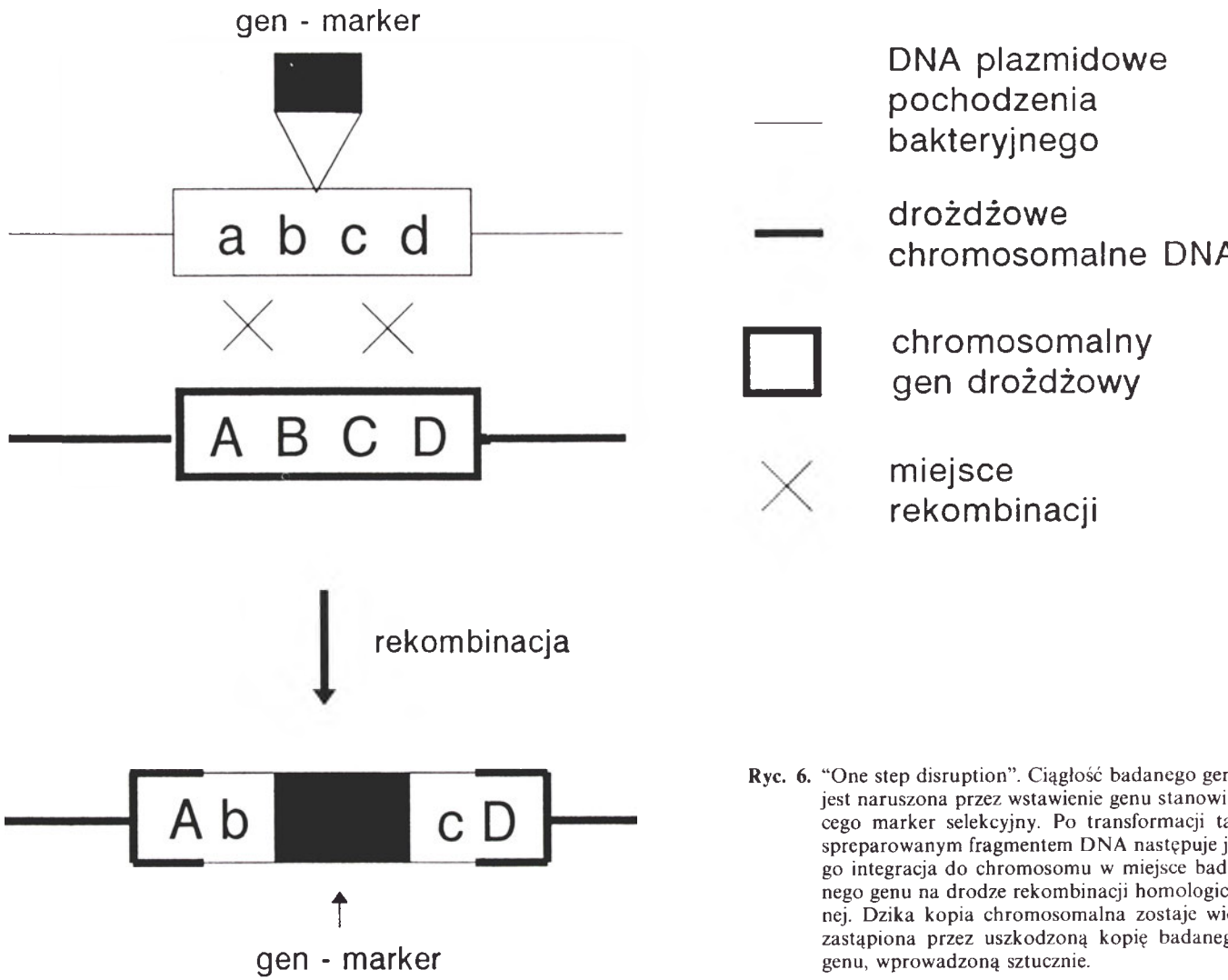
III-1. Analiza komputerowa

Uzyskana sekwencja poddawana jest szczegółowej analizie komputerowej, która natychmiast przynosi następujące informacje: ile jest otwartych ramek odczytu, czy sekwencja kodowanych przez nie białek jest homologiczna do sekwencji białkowych zgromadzonych w bazach danych i jak znaczna jest ta homologia, czy w badanych ORF-ach pojawiają się jakieś charakterystyczne motywy np. wiążące DNA, czy przewidywana struktura II-rzędowa takiego białka wskazuje na jego lokalizację w błonie, jaki jest współczynnik użycia kodonów i wiele wiele innych. Większość tych informacji uzyskuje się drogą porównania uzyskanej sekwencji z bazą danych — przy takich porównaniach należy jednak uważać. Sekwencje zgromadzone w wielkich bankach danych (GeneBank, EMBL) nie są wcale niepodważalnie wiarygodne. Przede wszystkim sekwencji, którą ktoś zechce zdeponować w banku, nie sposób sprawdzić, natomiast trzeba ją przyjąć. A zatem do bazy danych łatwo może wkraść się błąd — od pomyłki po wyrachowane oszustwo (to ostatnie nie powinno się jednak zdarzać — przynajmniej teoretycznie) [13]. Przewidywanie struktury drugorzędowej hipotetycznego białka to wchodzenie na jeszcze bardziej grząski grunt. Służy do tego kilka algorytmów (np. Chou-Fasman, Gilbert, metoda HCA), ale żaden z nich nie daje 100% pewności. Przewidywanie struktury III rzędowej jest w powijakach — brak zarówno modelu, który opisywałby prawidłowo proces fałdowania się białka (ang. *folding*), ale także odpowiednio dużej bazy danych na której można by oprzeć porównania (tzn. zbiorów PDB (Protein Data Bank) zawierających koordynaty atomów uzyskane poprzez analizę rentgenowską kryształów białkowych). Mimo tych trudności analiza komputerowa z pewnością będzie odgrywała coraz ważniejszą rolę w przewidywaniu funkcji nieznanych białek.

III-2. Analiza fizjologiczna

Otwarte ramki odczytu ujawnione w nowej sekwencji można podzielić na trzy grupy: znane wcześniej geny, geny nieznane, wykazujące dużą homologię do znanych, oraz geny nieznane i nie wykazujące homologii. Tych ostatnich jest kilkakrotnie więcej niż początkowo sądzono. Aby ustalić funkcję tych genów zaczyna się od wykonania dysrupcji — czyli unieczynnienia interesującego nas genu najczęściej poprzez wstawienie genu markerowego w miejsce restrykcyjne w środku badanego genu (one-step disruption, [14]). Plazmidem zawierającym inaktywowany gen transformuje się następnie odpowiedni szczep biorcy. Stosowane przy tego typu manipulacjach plazmidy należą do rodziny plazmidów drożdżowo-bakteryjnych (ang. *shuttle vectors*, [15]). Należące tu plazmidy są wielo- lub jednokopijne, posiadają komplet miejsc restrykcyjnych oraz gen umożliwiający selekcję w odpowiednim szczepie drożdży (tzw. marker). Gen taki koduje najczęściej jeden z enzymów szlaku biosyntezy któregoś z aminokwasów, lub innego związku niezbędnego do normalnego funkcjonowania komórki (np. URA3, LEU2, TRP1). Transformowany szczep drożdży musi mieć mutację w genie markerowym — układ ten zapewnia właściwą selekcję, bowiem dziki gen markerowy niesiony na plazmidzie znosi auksotrofię szczepu biorcy. Plazmidy drożdżowo-bakteryjne można podzielić na posiadające zarówno drożdżową jak i bakteryjną sekwencję startu replikacji (plazmidy episomalne — zdolne do autonomicznej replikacji w komórkach drożdży) i posiadające jedynie bakteryjną sekwencję startową (plazmidy integracyjne — DNA plazmidowe zostaje wprowadzone do chromosomu drożdżowego na drodze rekombinacji homologicznej). Plazmidy stosowane do wprowadzenia inaktywowanego genu do komórek drożdży powinny być integracyjne. Po transformacji i włączeniu do chromosomu badany gen zostaje unieczynniony, ale komórka nabywa zdolność do wzrostu na pożywce selekcyjnej, dzięki obecności dzikiego allelu genu markera. Jeżeli dysrupcja daje efekt letalny świadczy to o wykryciu genu niezbędnego dla życia komórek drożdży. Jest to pierwszy i najprostszy test. Bardziej wyrafinowaną metodą jest tzw. "two-step disruption" [14] — jest to rodzaj sztucznej selekji pozytywnej. Genem markerowym jest URA3 — znajduje się on na plazmidzie razem ze zmutowanym genem badanym. Plazmid ten wprowadza się do drożdży, a następnie przeprowadza się selekcję na podłożu zawierającym kwas 5-fluoroorotowy (5-FOA), który pod wpływem produktu genu URA3 przekształca się w związek toksyczny. Pozwala to na wyizolowanie komórek, które straciły plazmid (nie mają ulegającego ekspresji genu URA3), a więc mogą rosnąć na pożywce z 5-FOA. Po utracie plazmidu w komórce pozostaje tylko jedna kopia (dzika lub zmutowana) badanego genu. Układy takie wykorzystuje się między innymi do izolowania supresorów. Schematy obu typów dysrupcji przedstawiają ryciny 6 i 7. Innym testem stosounkowo łatwym do przeprowadzenia jest zbadanie jaki wpływ na wzrost komórek drożdży będzie miała nadmierna ekspresja badanego genu — gen taki jest wówczas wprowadzany do komórek drożdży na episomalnym plazmidzie wielokopijnym. Zbyt duża liczba kopii (jak np. w przypadku plazmidu pMA3A — 200 kopii na jedną komórkę haploidalną) może być w przypadku niektórych genów toksyczna dla komórki i należy wtedy użyć innego plazmidu (np. YEp24 — tylko 40 kopii na komórkę). Efekt fenotypowy wszastkich tych manipulacji może być bardziej subtelny niż prosty wzrost lub

http://rcin.org.pl



Ryc. 6. "One step disruption". Ciągłość badanego genu jest naruszona przez wstawienie genu stanowiącego marker selekcyjny. Po transformacji tak spreparowanym fragmentem DNA następuje jego integracja do chromosomu w miejsce badanego genu na drodze rekombinacji homologicznej. Dzika kopia chromosomalna zostaje więc zastąpiona przez uszkodzoną kopię badanego genu, wprowadzoną sztucznie.

brak wzrostu komórek, dlatego jest on badany przy użyciu standardowego zestawu pożywek zawierających różne czynniki mające wpływ na warunki wzrostu (np. różne źródło węgla, azotu, temperatura, stopień natlenienia itp). Taki zestaw do badania funkcji nieznanych genów został opracowany w laboratorium prof. Piotra Słonimskiego w Gif-sur-Yvette.

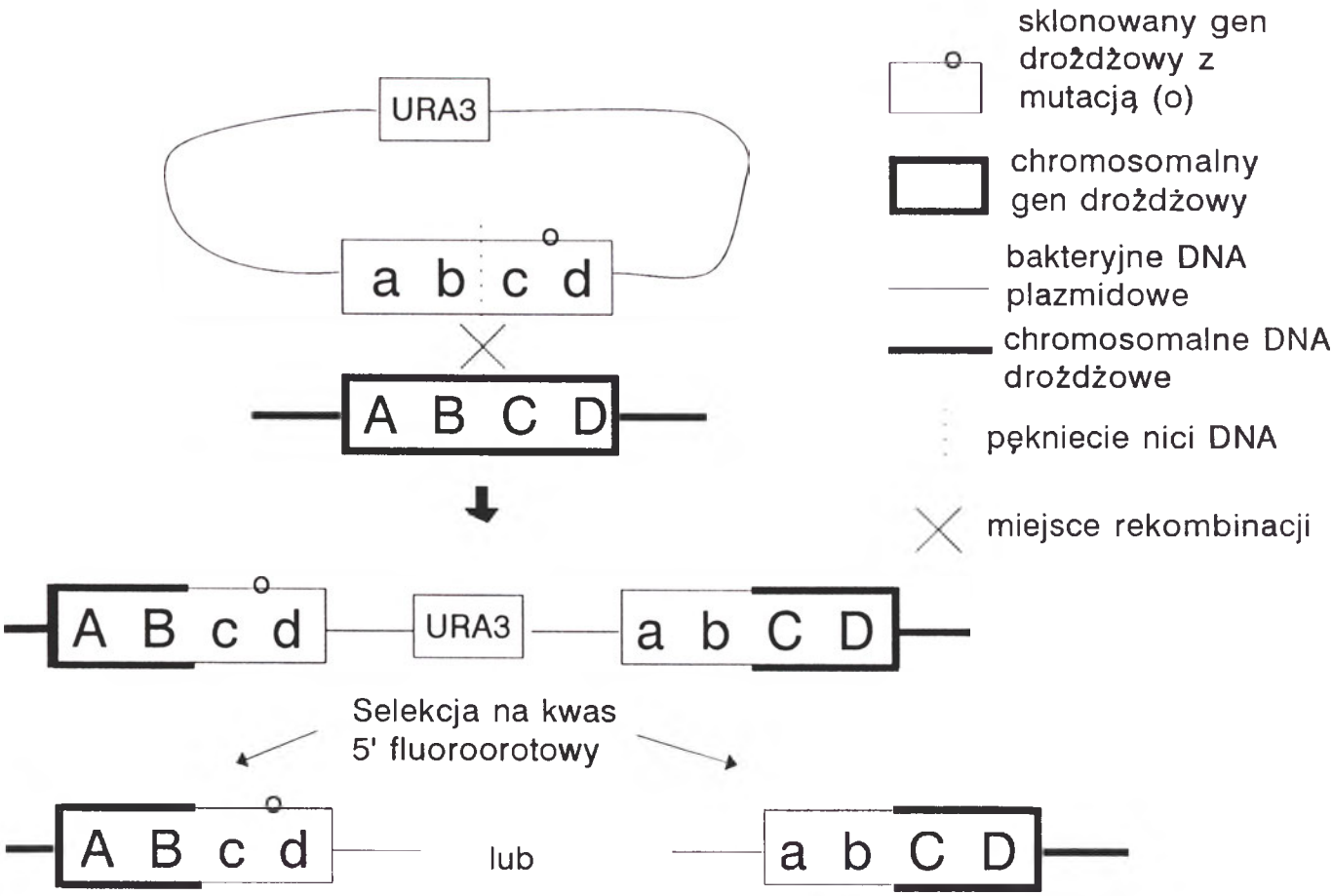
III-3. Badanie poziomu ekspresji nowo odkrytych genów

Następnym krokiem w ustalaniu funkcji nowo odkrytych genów jest analiza biochemiczna — analiza powstających transkryptów i białek. Jedna z metod polega na izolacji całkowitego RNA z komórek typu dzikiego rosnących w różnych warunkach, a także całkowitego RNA z komórek niosących inaktywowany lub występujący w wielu kopiach gen, a następnie porównuje się je poprzez hybrydyzację ze standardowymi sondami molekularnymi (technika Northern, [11]). Można w ten sposób wykryć czy ekspresja badanego genu jest indukowana i co jest czynnikiem indukującym — analogiczne wyniki można uzyskać poprzez analizę obrazów rozdziału białek po elektroforezie dwukierunkowej, ale praca z mRNA daje szybsze wyniki i jest mniej pracochłonna.

III-4. Analiza produktów białkowych nowo odkrytych genów

Badania białek to przede wszystkim wykorzystanie techniki dwukierunkowej elektroforezy (rozdział ze względu na masę i ładunek w żelu o gradiencie pH, (ang. *electrofocusing*) [16]). Jest to potężne narzędzie dla badań nad nieznanymi białkami. Porównując wzorzec elektroforezy białek szczepu dzikiego z wynikami elektroforezy białek mutantów — dysruptantów i o nadmiernej ekspresji, można wykryć które białko jest kodowane przez badany gen. Hodowle analizowanych szczepów przeprowadza się na różnych pożywkach — można w ten sposób wykryć czy badane białko jest indukowane i co jest czynnikiem indukującym. Dostarcza to natychmiast szeregu informacji o cechach fizycznych nowo odkrytego białka ale także o związkach tego białka z innymi. Brak białka u mutanta może być skojarzony z brakiem innych białek które normalnie występują we wzorcu (wzorzec stanowi elektroforeza białek szczepu dzikiego). Białko takie może okazać się białkiem regulatorowym. Wykrycie tych związków jest wielkim krokiem na drodze do

http://rcin.org.pl



Ryc. 7. "Two-step disruption". Badany gen (niosący mutację) i gen markerowy znajdują się na tym samym plazmidzie integracyjnym. Po transformacji przeprowadza się pierwszą selekcję — z wykorzystaniem genu markerowego (URA3). Po wintegrowaniu do chromosomu plazmid może się wyciąć unosząc ze sobą jedną kopię (dziką lub zmutowaną) badanego genu oraz gen URA3. Druga kopia genu pozostaje na chromosomie. Komórki nie posiadające plazmidu można odszukać poprzez selekcję z użyciem 5-FOA związek ten powoduje śmierć komórek niosących gen URA3.

ustalenia funkcji badanego białka. Ponadto, z preparatywnej elektroforezy dwukierunkowej daje się uzyskać nieznane białko w ilościach pozwalających na przygotowanie przeciwciał, które posłużą do badania jego funkcji.

IV. Chromosom III

Chromosom III jest jednym z najmniejszych spośród 16 chromosomów drożdżowych. Od dawna był on przedmiotem intensywnych badań ze względu na obecność trzech loci zaangażowanych w kontrolę typu koniugacyjnego: MAT, HML i HMR. MAT jest ulegającą ekspresji kopią genu decydującego o typie koniugacyjnym; HML i HMR stanowią nie ulegające ekspresji „ciche" kopie tego genu. „Przełączenie" typu koniugacyjnego następuje kiedy informacja zawarta w „cichej" kopii (czy też „kasecie") jest podstawiana w locus MAT i ulega ekspresji. Obecność tych trzech homologicznych loci powoduje, że na skutek rekombinacji wewnątrzchromosomalnej mogą powstać koliste cząsteczki zawierające znaczną część chromosomu III. Rekombinacja HML × MAT powoduje powstanie kolistej cząsteczki o średnicy 65-μm, którą wyizolowano do konstrukcji banku chromosomu III na plazmidzie drożdżowo-bakteryjnym YIp5. Drugi bank, zawierający część prawego ramienia chromosomu III, skonstruowano na kosmidach i w fagu lambda. Banki te wykorzystano następnie do uzyskania sekwencji chromosomu III [6]. 35 europejskich laboratoriów podjęło wysiłek uzyskania kompletnej sekwencji DNA chromosomu III *Saccharomyces cerevisiae* w ramach programu BAP (Biotechnology Action Programme). Cel ten został osiągnięty w maju 1991 roku. Zsekwencjonowano 315 kb zawierających 182 otwarte ramki odczytu, kodujące białka dłuższe niż 100 aminokwasów. 37 spośród nich odpowiada znanym genom, zaś aż 145 (!) to geny nowo odkryte. Sekwencja 29 spośród nich wykazuje znaczną homologię do sekwencji zgromadzonych w bazach danych, zaś pozostałe takiej homologii nie wykazują. Spośród tych tajemniczych nowych genów 55 zinaktywowano. Dla trzech z nich dysrupcja dała efekt letalny. Pozostałe były sprawdzane przy pomocy standardowego zestawu testów w celu uzyskania jakiegokolwiek efektu fenotypowego, co udało się dla 14 spośród nich. Zmiany fenotypowe dotyczyły termowrażliwości, niewydolności oddechowej, wzmożonej wrażliwości na środki chemiczne, upośledzonej zdolności do koniugacji, pączkowania, sporulacji lub rekombinacji mejoty-

http://rcin.org.pl

cznej. Jednak 28 z badanych genów nie wykazuje żadnej funkcji którą potrafilibyśmy wykryć przy pomocy standardowych testów (tzw. „sierotki", ang. "*orphan*") — jest wysoce nieprawdopodobne, żeby tak znaczna część genomu drożdży pozostawała bez żadnej funkcji — świadczy to raczej o naszym braku pełnego zrozumienia procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach drożdży. Zdziwienie badaczy obudziła nie tylko obcność w chromosomie III tak wielu genów o nieznanej funkcji, ale także zaskakujące podobieństwa niektórych genów drożdżowych do znanych genów innych organizmów — np. do genu *nifS* bakterii wiążących azot [17]. Dlaczego drożdże mają w swoim genomie ten, pozornie nieprzydatny, gen? Prawdopodobnie produkt genu *nifS* bierze udział w procesach metabolicznych zachodzących w mitochondriach — podobne procesy muszą zachodzić także w komórkach bakterii. Rozwiązywanie zagadek stwarzanych przez takie podobieństwa jest jednym z bardziej pasjonujących zadań w pracy nad analizą genomu.

V. Udział polskich laboratoriów w sekwencjonowaniu genomu drożdży

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN współpracuje od dawna z Centre de Genetique Moleculaire du C.N.R.S. w Gif-sur-Yvette pod Payżem, kierowanym do niedawna przez profesora Piotra S ł o n i m s k i e g o. Dzięki tej współpracy pracownicy IBB mogli uczestniczyć w ramach programu BRIDGE w sekwencjonowaniu kosmidu α61 zawierającego fragment chromosomu II *S. cerevisiae*. Kosmid α61 zawiera sekwencję znajdującą się na chromosomie pomiędzy loci IRA1 i TEF2. Polskim wkładem było zsekwencjonowanie ok. 9.3 kb z końcowej części kosmidu i wykonanie dysrupcji jednego z genów ujawnionych przez sekwencjonowanie — YBR1014. Białko kodowane przez ten gen nie wykazało homologii do żadnego ze znanych białek, zaś dysrupcja nie wykazała efektu fenotypowego [12, 18]. Białko kodowane przez inny nowo odkryty gen — YBR1015 wykazuje znaczną homologię do wakuolarnej proteazy serynowej [19, 20]. W sekwencjonowaniu chromosomów III i II drożdży uczestniczył także zespół z Zakładu Genetyki Uniwersytetu Wrocławskiego — we współpracy z Dr. Andre G o f f e a u.

Artykuł otrzymano 1 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 7 czerwca 1993 r.

Piśmiennictwo

1. V e n t e r J C, A d a m s M D, M a r t i n - G a l l a r d o A, M c C o m b i e W R, F i e l d s C (1992) *Trends in Biotechnology* **10**: 8-11
2. R o b i n s o n C (1992) *Trends in Biotechology* **10**: 1-5
3. M a g n i e n E, B e v a n M, P l a n q u e K, (1992) *Trends in Biotechnology* **10**: 12-15
4. V a s s a r o t t i A, G o f f e a u A (1992) *Trends in Biotechnology* **10**: 15-18
5. Yeast Genome Project: 300,000 and Counting (1992) *Science*
6. The Complete DNA Sequence of Yeast Chromosome III (1992) *Nature* (Lond) **357**: 38-46
7. Ist BRIDGE Meeting on Sequencing the Yeast Chromosomes II IX Brugge 22-24 Sep 1991
8. G a j e w s k i W, W ę g l e ń s k i P (1980) W: Inżynieriia genetyczna PWN
9. Pharmacia LKB Double Stranded Nested Deletions Kit Bollet (1989)
10. P r e n t k i P, B i n d a A, E p s t e i n A (1991) *Gene* **103**: 17-23
11. S a m b r o o k, F r i t s h, M a n i a t i s; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989)
12. H e r b e r t C J, B e c a m A - M, C u l l i n C, G r z y b o w s k a E, L a c r o u t e F, O z i e r - K a l o g e r o p o u l o s O, P a ł u c h a A, Z a g u l s k i M, N a s r F, S ł o n i m s k i P; Analisis of the cosmid α61 from chromosome 2, II Bridge Meeting on Sequencing the yeast genome Late Abstracts Münich October 1992
13. F u c h s R, R i c e P, C a m e r o n G N (1992) *Trends in Biotechnology* **10**: 61-66
14. R o t h s t e i n R (1991) *Metods in Enzymology* **194**: 281-301
15. B o n n e a u d N, O z i e r - K a l o g e r o p o u l o s O, L i G, L a b o u e s s e M, M i n v i e l l e - S e b a s t i a L, L a c r o u t e F (1991) *Yeast* 7: 609-615
16. Two dimentional gel electrophoresis and the yeast genome project BRIDGE Meeting Aarhus and Bordeaux Feb 1992
17. M q d d o x J (1992) *Nature* (Lond) **357**: 13
18. H e r b e r t C J, B e c a m A - M, J i a Y, P a ł u c h a A, G r z y b o w s k a E, C u l l i n C, O z i e r - K a l o g e r o p o u l o s O, S ł o n i m s k i P P Cold Spring Harbour, Genom Mapping and Sequencing May 1993
19. B e c a m A - M, C u l l i n C, G r z y b o w s k a E, O z i e r - K a l o g e r o p o u l o s O, L a c r o u t e F, N a s r F, P a ł u c h a A, S ł o n i m s k i P, Z a g u l s k i M, H e r b e r t C J; Sequencing Small Genomes Paris, March 1993
20. H e r b e r t C J, B e c a m A - M, C u l l i n C, G r z y b o w s k a E, N a s r F, O z i e r - K a l o g e r o p o u l o s O, L a c r o u t e F, P a ł u c h a A, Z a g u l s k i M EEC Bridge/Biotech Sequencing Meeting, Louvian, April 1993

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

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

http://rcin.org.pl

Funkcja i biogeneza peroksysmów w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*

Function and biogenesis of peroxisomes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

IWONA SMACZYŃSKA[1],
MAREK SKONECZNY[2]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Charakterystyka morfologiczna i biochemiczna mikrociałek
II-1. Funkcje metaboliczne mikrociałek
II-2. Wykorzystywanie przez drożdże nietypowych źródeł węgla i azotu
III. Biogeneza peroksysomów i transport białek peroksysomalnych
III-1. Domeny sygnałowe decydujące o kierowaniu białek do peroksysomów
III-2. Mutanty drożdżowe w badaniach biogenezy peroksysomów
IV. Regulacja ekspresji genów, kodujących białka peroksysomalne

Contents:

I. Introduction
II. Morphological and biochemical characteristics of microbodies
II-1. Metabolic functions of microbodies
II-2. Assimilation of unusual carbon sources by various yeasts
III. Biogenesis of peroxisomes and import of peroxisomal proteins
III-1. Signal domains for targeting of proteins to peroxisomes
III-2. Yeast mutants in studying biogenesis of peroxisomes
IV. Regulation of the expression of genes coding for peroxisomal proteins

Wykaz stosowanych skrótów: AKI — alanina, lizyna, izoleucyna; SKF — seryna, lizyna, fenyloalanina; SKL — seryna, lizyna, leucyna; ORE — oleate response element

[1,2] mgr, Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

I. Wstęp

W 1954 roku R h o d i n, w swojej pracy doktorskiej poświęconej ultrastrukturze kanalika proksymalnego nerki, opisał pęcherzykowate twory, które nazwał mikrociałkami i wysunął hipotezę, że może to być nowy rodzaj, nie znanego do tej pory organellum komórkowego [1]. Dwa lata później zaobserwowano mikrociałka w komórkach wątroby [2]. Po raz pierwszy pod względem biochemicznym mikrociałka zostały scharakteryzowane na początku lat sześćdziesiątych. Wykazano, że zawierają one oksydazy utleniające różne substraty, a jednym z produktów reakcji jest nadtlenek wodoru, rozkładany przez katalazę [3]. Struktury te nazwano peroksysomami. Nieco później znaleziono mikrociałka w komórkach roślinnych [4] i wyróżniono dwie ich formy: peroksysomy w komórkach części zielonych roślin i glioksysomy — występujące w kiełkujących nasionach oleistych np. rącznika *Ricinus communis* [5, 6]. Pierwsza wzmianka na temat peroksysomów w komórkach grzybów pochodzi z roku 1968 [17], jednak systematyczne badania podjęto dopiero w połowie lat siedemdziesiątych [8].

Rozpowszechnienie mikrociałek w świecie żywym wskazuje wyraźnie na ich istotną rolę w procesach metabolicznych i wewnętrznej organizacji komórki. Jednak ich podatność na uszkodzenie w czasie preparatyki organelli i w porównaniu do mitochondriów czy chloroplastów, mniej wyróżniająca się morfologia sprawiły, iż są obiektem badań dopiero od niedawna. Dlatego pod względem biogenezy i roli w procesach życiowych komórki, poznane są znacznie słabiej niż inne struktury subkomórkowe.

II. Charakterystyka morfologiczna i biochemiczna mikrociałek

W mikroskopie elektronowym mikrociałka widoczne są jako okrągłe lub owalne twory o średnicy od

http://rcin.org.pl

0.1μm do 1.0μm, których wnętrze jest bardziej elektronowo-gęste niż otaczająca je cytoplazma. Bardzo często obserwowany jest cylindryczny rdzeń, o parakrystalicznej strukturze [9]. Otoczone są pojedynczą błoną białkowo-lipidową, której głównymi składnikami fosfolipidowymi są fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina [9].

Enzymami znacznikowymi mikrociałek są oksydazy wytwarzające H_2O_2 i katalaza [3]. Oksydazy te są flawoproteidami, które przenoszą elektrony i protony bezpośrednio z utlenianego substratu na tlen cząsteczkowy. Substratami mogą być: L- i D-aminokwasy, kwasy tłuszczowe, alkohole, α-hydroksykwasy, kwas moczowy, ksantyny i aminy [10]. Nadtlenek wodoru, który powstaje w reakcjach katalizowanych przez oksydazy, jest rozkładany przez katalazę.

II-1. Funkcje metaboliczne mikrociałek

Mikrociałka występujące w organizmach należących do różnych grup systematycznych, w przeciwieństwie do innych organelli, wykazują dużą rozmaitość pod względem zawartości enzymów, a tym samym i funkcji [11].

Znajduje to swoje odbicie w terminologii. Nazwa mikrociałka obejmuje peroksysomy, glioksysomy, a także glikosomy z komórek pierwotniaków pasożytniczych, które jednak nie będą tu omawiane. W niniejszej pracy termin mikrociałka używany jest przy opisie wspólnych dla wszystkich grup systematycznych cech tego organellum. W pozostałych przypadkach stosowano nazwę peroksysomy lub glioksysomy.

Do tej pory stwierdzono, że mikrociałka zawierają ponad czterdzieści różnych enzymów [10], choć mikrociałka pochodzące z jednej tkanki, czy jednego organizmu, nigdy nie zawierają ich wszystkich. Niektóre z nich mają izoenzymy, zlokalizowane w innych przedziałach komórki (mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, cytozol) i kodowane przez odrębne geny. Najpowszechniej, bo u wszystkich grup systematycznych, występują enzymy szlaku β-oksydacji.

U zwierząt szlak ten współistnieje obok szlaku mitochondrialnego. Jego enzymy wykazują największą specyficzność wobec kwasów o długim i bardzo długim łańcuchu alifatycznym. Jest on odpowiedzialny za utrzymywanie ich stężenia na właściwym dla organizmu poziomie [12]. W wątrobie enzymy szlaku współuczestniczą w detoksykacji związków ksenobiotycznych [13], a w brunatnej tkance tłuszczowej — w termogenezie [13]. W peroksysomach komórek zwierzęcych ma miejsce również metabolizm steroli, poliprenoli i synteza plazmalogenów [13].

U roślin, w glioksysomach kiełkujących nasion, znajduje się szlak β-oksydacji i szlak glioksalowy (stąd nazwa tych organelli), które służą uruchamianiu tłuszczu zapasowego. W peroksysomach liści zaś obecny jest szlak glikolanowy biorący udział w fotooddychaniu [10].

W peroksysomach grzybów spotyka się największą rozmaitość enzymów i szlaków metabolicznych. Umożliwiają one różnym gatunkom tej grupy systematycznej przyswajanie nietypowych źródeł węgla lub azotu, takich jak metanol, węglowodory alifatyczne, aminy, D-aminokwasy, czy kwas moczowy [8].

Drugą charakterystyczną cechą mikrociałek jest zmienność składu enzymatycznego i objętości jaką zajmują w komórce, w zależności od typu tkanki, stadium rozwojowego komórki, dostępności substratów oraz w odpowiedzi na szeroko rozumiane czynniki środowiskowe.

U ssaków takimi czynnikami są tzw. proliferatory peroksysmów. Należą do nich różne związki ksenobiotyczne: plastyfikatory, herbicydy itp., a także leki hypolipidemiczne [13].

U roślin oleistych zmienność tę obserwuje się w czasie kiełkowania nasion, w których organem zapasowym są liścienie — np. dynia, arbuz czy słonecznik. W komórkach liścieni w momencie wyczerpywania się tłuszczu zapasowego i pojawienia chloroplastów następuje degradacja enzymów szlaku glioksalowego i β-oksydacji, a na to miejsce pojawiają się w mikrociałkach enzymy szlaku glikolanowego. Glioksysomy ulegają więc przekształceniu w peroksysomy [15].

Zmienność składu i struktury mikrociałek w zależności od czynników środowiskowych najlepiej uwidacznia się u drożdży. Objętość tych organelli oraz ilość zawartych w nich enzymów znacznie wzrasta jeśli jedynym, dostępnym komórce źródłem węgla lub azotu jest odpowiedni substrat dla peroksysomalnych szlaków metabolicznych [8]. Natomiast w komórkach drożdży hodowanych w standardowej, bogatej pożywce peroksysomy są prawie niewykrywalne [8].

Stopień indukcji proliferacji peroksysomów u drożdży bywa wprost niezwykły. Komórki *Hansenula polymorpha* hodowane w obecności metanolu jako jedynego źródła węgla mogą być nawet w 80% wypełnione peroksysomami, zawierającymi krystaliczną oksydazę alkoholową. [16].

II-2. Wykorzystywanie przez drożdże nietypowych źródeł węgla i azotu

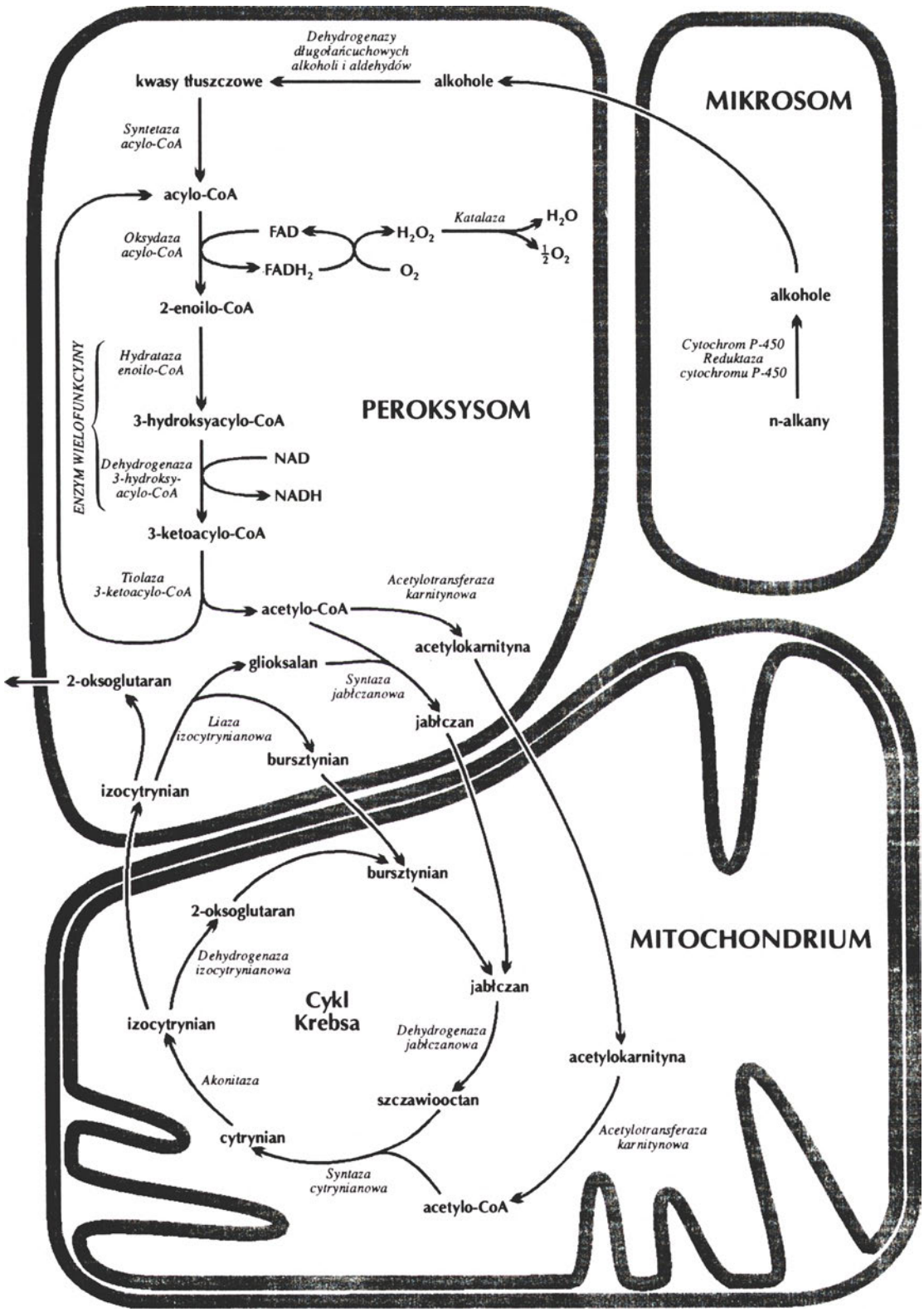
Szlak β-oksydacji, występujący w peroksysomach drożdży i mikrociałkach innych grup systematycznych, różni się od szlaku pochodzącego z mitochondriów zwierząt dwiema zasadniczymi cechami. Pierwszy etap przeprowadzany jest przez oksydazę acylo-CoA (E.C. 1.3.99.3). Przenosi ona elektrony bezpośrednio z substratu na tlen molekularny z wytworzeniem H_2O_2. Drugą i trzecią reakcję katalizuje jeden enzym, zwany dwufunkcyjnym, a u drożdży — trójfunkcyjnym lub wielofunkcyjnym. Oprócz aktywności hydratazy 2-trans-enoilo-CoA i dehydrogenazy L-3-hydroksyacylo-CoA posiada on bowiem jeszcze aktywność epimerazy D-3-hydroksyacylo-CoA (E.C. 5.1.2.3.).

Szlak β-oksydacji umożliwia wielu gatunkom droż-

http://rcin.org.pl

dży asymilację kwasów tłuszczowych i węglowodorów alifatycznych. Na Ryc. 1 przedstawiono schematycznie rolę peroksysomów komórek *Candida tropicalis* i *Yarrowia lipolytica* w metabolizmie *n*-alkanów oraz udział w tym procesie mikrosomów i mitochondriów.

Pierwszym etapem utleniania alkanów jest ich hydroksylacja przeprowadzana przez system cytochromu P_{450} zlokalizowany w mikrosomach. Produkt hydroksylacji — długołańcuchowe alkohole ulegają dalszej redukcji do aldehydów i kwasów, które po zaktywowaniu do acylowych pochodnych zostają utlenione przy udziale enzymów szlaku peroksysomalnej β-oksydacji. Końcowy produkt szlaku — acetylo-CoA — albo zostaje przetransportowany do mitochondriów przy udziale karnityny i tam utleniony poprzez reakcje cyklu Krebsa, albo przy udziale syntazy jabłczanowej



Ryc. 1. Udział enzymów i szlaków metabolicznych zlokalizowanych w peroksysomach, mikrosomach i mitochondriach, w asymilacji węglowodorów alifatycznych przez drożdże *Candida tropicalis*.

http://rcin.org.pl

(E.C. 4.1.3.2) zostaje przyłączony do cząsteczki glioksalanu, dając cząsteczkę jabłczanu. U drożdży zdolnych do wzrostu na węglowodorach alifatycznych kluczowe enzymy cyklu glioksalowego — liaza izocytrynianowa (E.C. 4.1.3.1) i syntaza jabłczanowa (E.C. 4.1.3.2) — są zlokalizowane w peroksysomach [8].

Wzrost komórek drożdży *Hansenula polymorpha* hodowanych na metanolu jako jedynym źródle węgla możliwy jest dzięki zlokalizowanej w peroksysomach oksydazie metanolowej (E.C. 1.1.3.13). Formaldehyd, który powstaje jako produkt utleniania metanolu, może być wykorzystany jako źródło energii lub też służy jako wyjściowy substrat w reakcjach syntezy, przeprowadzanych przez enzymy tzw. szalku dihydroksyacetonu. Kluczowy enzym tego szlaku, syntaza dihydroksyacetonu, też jest zlokalizowany w peroksysomach, a pozostałe enzymy znajdują się w cytosolu [8].

Aminy wykorzystywane jako jedyne źródło azotu, są utleniane przez oksydazę aminową (E.C. 1.4.3.6) — zlokalizowaną w peroksysomach [8].

W końcu lat 80-tych ustalono, że peroksysomy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* ulegają proliferacji pod wpływem kwasu olejowego w pożywce i, że zawierają indukowalny szlak β-oksydacji podobny jak u *C. tropicalis* [17, 18]. *S. cerevisiae* były pierwszymi drożdżami, w których wykryto mikrociałka [7]. Potem jednak w badaniach wykorzystywano inne gatunki drożdży, znane ze swych zdolności do przyswajania substratów dla oksydaz peroksysomalnych, a obecność typowych peroksysomów w *S. cerevisiae* była nawet podawana w wątpliwość [19]. Okazało się jednak, że choć nie tak sprawnie jak np. *Y. lipolytica* [20], potrafią one wykorzystywać kwas olejowy jako źródło węgla, a bogactwo metod genetyki klasycznej i molekularnej opracowanych dla tego organizmu zadecydowało o powszechnym zastosowaniu go w badaniach biogenezy peroksysomów. Atrakcyjność *S. cerevisiae* i innych drożdży jako modelu badawczego polega również na tym, że (w przeciwieństwie roślin i zwierząt [9, 21, 22, 23]) zaburzenia w funkcjonowaniu peroksysomów drożdży nie mają wpływu na żywotność komórki dopóki ma ona dostęp do takiego źródła węgla lub azotu, którego wykorzystanie nie wymaga sprawnego działania tych organelli [24, 25]. Na podstawie zgromadzonych dotychczas danych nie można stwierdzić, czy pozbawienie komórki drożdży wszystkich funkcji spełnianych przez peroksysomy nie jest dla niej letalne. Jednak to, że przynajmniej niektóre z nich nie są komórce niezbędne do życia, ułatwia zastosowanie do badań biogenezy peroksysomów typowego dla mikroorganizmów podejścia metodycznego tj. izolowania i analizy mutantów zaburzonych w tym procesie.

Nic więc dziwnego, że omawiane w dalszych rozdziałach ustalenia dotyczące biogenezy peroksysomów i regulacji tego procesu dokonane zostały w znacznej mierze z wykorzystaniem drożdży *S. cerevisiae*.

III. Biogeneza peroksysomów i transport białek peroksysomalnych

Rola peroksysomów w komórkach zwierząt, roślin i grzybów jest dość dobrze poznana [13], natomiast nadal mało wiadomo o regulacji ekspresji genów kodujących białka peroksysomalne oraz o biogenezie tych organelli.

Przez wiele lat uważano, iż peroksysomy powstają przez odpączkowanie od retikulum endoplazmatycznego. Obecnie zgromadzone wyniki badań cytochemicznych i biochemicznych świadczą, że:

— Peroksysomy nie wykazują żadnej morfologicznej łączności z retikulum endoplazmatycznym. W tym samym przedziale komórkowym nie współistnieją enzymy specyficzne dla retikulum endoplazmatycznego i peroksysomów [26].

— Błona peroksysomów różni się od błon retikulum endoplazmatycznego i mitochondriów zawartością białek i lipidów oraz przepuszczalnością. W błonie peroksysomów obecne są tylko białka dla niej swoiste [27].

— Nowe peroksysomy prawdopodobnie nie powstają *de novo*, ale przez podział istniejących już organelli.

— Wszystkie zbadane do tej pory białka peroksysomalne są syntetyzowane na wolnych rybosomach w cytoplazmie i zostają włączone do organelli posttranslacyjnie, z pominięciem retikulum endoplazmatycznego [11].

Choć wymienione cechy upodabniają peroksysomy do mitochondriów czy chloroplastów, to:

— Peroksysomy nie zawierają kwasów nukleinowych i rybosomów, co oznacza, że ich biogeneza i namnażanie nie są procesami autonomicznymi, ale znajdują się pod kontrolą genów jądrowych [8].

— W odróżnieniu od podobnego mechanizmu syntezy egzogennych białek mitochondrialnych, białka peroksysomów są, z nielicznymi wyjątkami, produkowane w swojej dojrzałej formie, tzn. bez odcinanego peptydu sygnałowego. Oznacza to, że inkorporacja do organelli nie pociąga za sobą proteolitycznego skrócenia cząsteczki [11, 28]. Wyjątek stanowi tiolaza 3-ketoacylo-CoA, która jest syntetyzowana w postaci dłuższego prekursora, ale proteoliza nie jest sprzężona z transportem [29].

III-1. Domeny sygnałowe decydujące o kierowaniu białek do peroksysomów

Do poznania struktury domeny decydującej o kierowaniu białka do peroksysomów przyczyniły się badania nad lucyferazą — enzymem zlokalizowanym w peroksysomach, który odpowiada za reakcję fotochemiczną w organie świecącym robaczka świętojańskiego *Photinus pyralis*.

Po wrowadzeniu na plazmidzie ekspresyjnym genu kodującego lucyferazę do komórek ssaków, roślin i drożdży, syntetyzowany enzym był kierowany do

http://rcin.org.pl

peroksysomów [30]. Wskazuje to na pokrewieństwo ewolucyjne zarówno sygnałów jak i mechanizmów transportu do peroksysomów pochodzących z odległych grup systematycznych. Wynik ten był również impulsem do poszukiwania w cząsteczce lucyferazy sekwencji aminokwasów, decydującej o jej lokalizacji subkomórkowej. Wstępna analiza delecyjna wskazała na dwa ważne dla transportu odcinki: jeden o długości ponad 200 aminokwasów w pobliżu N-końca i drugi o długości 12 aminokwasów na C-końcu łańcucha polipeptydowego [31]. Na podstawie dalszej analizy C-końcowych 12 aminokwasów ustalono, że sekwencję sygnałową, kierującą lucyferazę do peroksysomów komórek ssaków stanowią trzy ostatnie aminokwasy łańcucha polipeptydowego: seryna, lizyna i leucyna (tzw. sekwencja SKL). Funkcja peptydu była zachowana, gdy seryna była zastąpiona przez alaninę lub cysteinę, a lizyna przez argininę lub histydynę [32].

Obecnie znanych jest około stu sekwencji aminokwasowych wydedukowanych na podstawie sekwencji DNA genów kodujących białka mikrociałek [33, 34]. Prawie połowa białek, zlokalizowanych w mikrociałkach komórek pochodzących z różnych grup systematycznych, zawiera sekwencje typu SKL. Przypuszczano więc, że trójpeptyd ten jest uniwersalnym sygnałem transportu. Aby to sprawdzić zastosowano przeciwciała skierowane przeciw trójpeptydowi SKL. Użyto ich do wykrywania białek mikrociałkowych rozdzielonych na żelu poliakrylamidowym oraz do ich lokalizacji immunocytochemicznej [35]. Z przeciwciałami tymi reagowały wyłącznie białka zlokalizowane w mikrociałkach, i to tylko niektóre — w zależności od grupy systematycznej od 20 do 40% całkowitej liczby białek mikrociałek [36]. Podobny eksperyment miał na celu ustalenie pokrewieństwa sygnałów transportu do peroksysomów w obrębie grupy systematycznej drożdży. Przeprowadzono go z użyciem przeciwciał przeciw SKL oraz przeciw trójpeptydowi Ala-Lys-Ile (AKI) z C-końca enzymu wielofunkcyjnego (Ryc. 1) z *C. tropicalis*. Obydwa reagowały z białkami peroksysomalnymi różnych gatunków drożdży, ale każde z przeciwciał wiązało się do innego zestawu białek [37]. Wyniki te świadczą o tym, że w różnych grupach systematycznych systemy transportu do mikrociałek, a także ich struktura i funkcje, są spokrewnione ewolucyjnie. Fakt, że tylko część białek wiązała przeciwciała wskazuje na istnienie także innych sposobów transportu, zależnych od innych niż SKL sekwencji sygnałowych. Świadczą o tym również dane stwierdzające, że w sekwencji aminokwasów wielu białek peroksysomalnych, np.: syntazy dihydroksyacetonu z *Hansenula polymorpha* [38] nie znaleziono w ogóle struktury przypominającej trójpeptyd sygnałowy występujący w cząsteczce lucyferazy. W przypadku białek, u których nie znaleziono sygnałowego trójpeptydu ani na C-końcu, ani w środku łańcucha polipeptydowego, można wysunąć przypuszczenie, że spodziewana domena sygnałowa może być pewną strukturą przestrzenną, która ujawnia się po uformowaniu białka w dojrzałą konformację.

Problemy związane z ustaleniem struktury sygnału kierowania białek do peroksysomów ilustrują prace dotyczące poszukiwania sygnału w łańcuchu polipeptydowym katalazy A, enzymu zlokalizowanego w peroksysomach *S. cerevisiae* [39]. Białko to ma na C-końcu trójpeptyd złożony z seryny, lizyny i fenyloalaniny (SKF), a więc podobny do SKL. Przyłączenie sześciu ostatnich aminokwasów katalazy A, zawierających ten peptyd, do białek znacznikowych, takich jak reduktaza dihydrofolianowa lub podjednostka IV oksydazy cytochromowej, kieruje te białka do peroksysomów. Peptyd SKF okazuje się jednak zbędny dla transportu samej katalazy A, ponieważ zarówno jego usunięcie jak i zmodyfikowanie nie ma wpływu na kierowanie enzymu do peroksysomów. Istotna dla transportu katalazy A jest natomiast sekwencja stu kilkudziesięciu aminokwasów w pobliżu N-końca. Krótkie delecje w tym rejonie hamują import enzymu do organelli. Białko hybrydowe złożone z białka znacznikowego i N-końcowego fragmentu katalazy A jest kierowane do peroksysomów [39]. Wskazuje to jednoznacznie na istnienie dodatkowego mechanizmu, który rozpoznaje białka przeznaczone do mikrociałek.

O istnieniu więcej niż jednego systemu transportu białek do peroksysomów świadczy odmienna struktura peptydu sygnałowego tiolaz peroksysomalnych. Ponadto wśród mutantów drożdży *S. cerevisiae* o zaburzonej biogenezie peroksysomów jeden, tj. *pas7* jest zaburzony w transporcie tiolazy, a pozostałe białka peroksysomalne zlokalizowane są prawidłowo [40].

Przypuszczalnie inny jest również mechanizm transportu białek błony peroksysomów [41, 42].

Jeszcze mniej wiadomo o innych niż struktura sygnału ogniwach procesu transportu białek do mikrociałek. Przez analogię do mechanizmów działających w innych organellach należy się tu spodziewać udziału takich białek jak: receptory sekwencji sygnałowych, białka błonowe ułatwiające przechodzenie łańcuchów polipeptydowych przez błonę lipidową, białka kontrolujące konformację łańcucha (ang. *chaperones*) oraz białka o funkcji ATP-az, które dostarczałyby energii dla całego procesu.

III-2. Mutanty drożdżowe w badaniach biogenezy peroksysomów

S. cerevisiae, podobnie jak inne drożdże [43], nie zawierają mitochondrialnego szlaku β-oksydacji [17]. Pozwala to na wykorzystanie braku zdolności komórek do wzrostu na kwasie olejowym jako kryterium do rozpoznawania zaburzeń w peroksysomalnym utlenianiu kwasów tłuszczowych. Komórki zdolne do wzrostu na nie ulegającym fermentacji źródle węgla (octan lub glicerol) i niezdolne do wzrostu na kwasie olejowym, określa się jako mutanty **onu** (ang. *oleic acid non-utiliser*). Taki fenotyp może być spowodowany

http://rcin.org.pl

albo przez brak aktywności enzymów szlaku β-oksydacji — mutanty **fox** (ang. *fatty acid oxidation*), albo przez zaburzenia w formowaniu peroksysomów — mutanty **pas** (*peroxisome assembly*).

Mutanty **fox** należą do trzech grup komplementacyjnych (*FOX1*, *FOX2*, *FOX3*), co odpowiada istnieniu trzech enzymów, które biorą udział w utlenianiu kwasów tłuszczowych: oksydaza acylo-CoA — kodowana przez gen *FOX1* [44], enzym wielofunkcyjny — przez gen *FOX2*, tiolaza 3-ketoacylo-CoA — przez gen *FOX3*. Wszystkie mutanty **fox** zawierają normalne pod względem morfologicznym peroksysomy.

Dla funkcji peroksysomów, tak jak innych organelli, istotne są nie tylko zlokalizowane w nich enzymy, które przeprowadzają określone reakcje. Równie ważne jest to, że pewne powiązane funkcjonalnie grupy enzymów, czy szlaki metaboliczne skupione są na mniejszym obszarze i mogą dzięki temu działać z większą wydajnością. Doskonałym tego przykładem są wszystkie zidentyfikowane do tej pory mutanty **pas**, u których enzymy peroksysomalne są znajdywane w cytosolu. Nie wykazują one funkcji *in vivo*, jakkolwiek są aktywne *in vitro* i ich synteza nadal podlega indukcji.

Zaburzenia w lokalizacji mogą dotyczyć wszystkich białek peroksysomalnych (mutanty **pas typu I i II**) lub tylko określonych (mutanty **pas typu III**). W przypadku mutantów typu III peroksysomy są normalnych rozmiarów i występują w normalnej ilości. W przypadku mutantów typu II peroksysomy są obecne w komórce, ale nie ulegają proliferacji, zaś w mutantach typu I nie są wykrywalne morfologicznie [45]. Wyizolowanie mutantów typu I i II pozwoliło na rozdzielenie dwóch zjawisk, które w komórkach szczepów dzikich są ze sobą ściśle powiązane, tzn. indukcji syntezy enzymów peroksysomalnych i proliferacji samych organelli.

W klasie mutantów **pas** wyróżnia się co najmniej 18 grup komplementacyjnych. Siedem spośród zidentyfikowanych loci: *pas1*, *pas2*, *pas3*, *pas4*, *pas5*, *pas7* i *pas14* zostało lepiej scharakteryzowanych [46].

— Gen *PAS1* koduje białko o masie 117kDa i własnościach hydrofilowych. Posiada ono dwie domeny odpowiedzialne za wiązanie ATP. Jedna z nich to wysoce konserwowany odcinek 185 aminokwasów, który wykazuje znaczną homologię sekwencji z trzema innymi rodzinami białkowymi [47]. Są to białka **NSF** i **Sec18p** związane z transportem przy udziale pęcherzyków, białka **Cdc48p**, **VCP** i **p97-ATPaza** odpowiedzialne za kontrolę cyklu komórkowego oraz białko **TBP-1** modulujące ekspresję genów wirusa HIV, wywołującego brak odporności immunologicznej u ludzi.

Zawartość białka Pas1p w komórkach drożdży jest bardzo mała, dlatego też nie udało się jeszcze stwierdzić jego wewnątrzkomórkowej lokalizacji.

— Gen *PAS2* koduje białko o długości 183 reszt aminokwasowych. Ma ono duże podobieństwo sekwencji (45%-60%) z białkami przyłączającymi ubikwitynę (ang. ***ubi**quitin-conjugating protein* — **UBC**) [48]. Obszar homologii obejmuje ściśle konserwowany odcinek 140 reszt aminokwasowych, w których mieści się tzw. miejsce aktywne, odpowiedzialne za tworzenie wiązania tioestrowego z ubikwityną.

Ubikwitynacja białek odgrywa ważną rolę w reperacji DNA, sporulacji, kontroli cyklu komórkowego oraz degradacji uszkodzonych białek [49, 50]. Pas2p jest pierwszym przykładem białka należącego do rodziny białek typu **UBC**, które jest wymagane do tworzenia kompartmentu peroksysomalnego. Jego proponowana lokalizacja w błonie peroksysomów sugeruje, że kluczowy etap ubikwitynacji zachodzi w organellach.

Ostatnio wykryto, że wbudowanie oksydazy monoaminowej do zewnętrznej błony mitochondriów wymaga wiązania ubikwityny [51]. Stwierdzono też udział tego procesu w biogenezie wakuoli. Stąd też badania nad genem *PAS2* i jego produktem mogą mieć generalne znaczenie w wykryciu powiązania szlaku ubikwitynacji z kontrolą tworzenia przedziałów w komórkach eukariotycznych [48].

Prawdopodobna rola białka Pas2p może polegać na eliminowaniu poprzez degradację czynników hamujących biogenezę peroksysomów. Z drugiej strony może być ono odpowiedzialne za regulowanie aktywności specyficznych czynników związanych z transportem do peroksysomów lub za modyfikację samych białek peroksysomalnych, która umożliwia ich inkorporację do organelli.

— Gen *PAS3* koduje białko o masie cząsteczkowej 50.6 kDa, wyliczonej w oparciu o sekwencję aminokwasową, wydedukowaną z sekwencji nukleotydowej części kodującej. Zawiera ono N-końcową domenę hydrofobową, którą prawdopodobnie zakotwiczone jest w błonie peroksysomów oraz hydrofilową domenę C-końcową, zwróconą w stronę cytoplazmy. Taka topologia białka oraz ostatnie badania wskazują, że może ono pełnić funkcję receptora, który kieruje transportem fosfolipidów z retikulum endoplazmatycznego do peroksysomów [46, 52].

— W sekwencji aminokwasów białek Pas4p i Pas5p odnaleziono motywy przypominające palce cynkowe [40]. Sugeruje się, że pełnią one rolę czynników regulacyjnych oddziałujących z DNA.

— W przypadku mutanta *pas7* peroksysomy występują w normalnych ilościach, natomiast tiolaza 3-ketoacylo-CoA, której synteza nadal jest indukowana przez kwasy tłuszczowe, nie jest transportowana do peroksysomów, przy zachowanym transporcie katalazy A. Dzika kopia genu kodującego tiolazę nie komplementuje mutacji *pas7*, co świadczy o tym, że zaburzenia nie dotyczą samego enzymu, ale białka, które odpowiada za transport tiolazy do peroksysomów [46].

— Gen *PAS14* koduje białko, identyczne z cytoplazmatyczną białkową kinazą serynowo/treoninową, kodowaną przez gen *SNF1* [46]. Kinaza ta jest zaangażowana w aktywację genów, które podlegają represji glukozowej, np. genów związanych z metaboli-

http://rcin.org.pl

zmem sacharozy, galaktozy i glicerolu, a także genów, kodujących białka mitochondrialne, np. izo-1-cytochrom c (*CYC1*) i podjednostkę VI oksydazy cytochromowej (*COX6*) [53, 54]. Na podstawie tych danych wydaje się, że mechanizm regulacyjny, w którym główną rolę odgrywa białko Snf1p (Pas14p) może być również odpowiedzialny za regulację proliferacji peroksysomów.

Opisane powyżej mutanty **pas** dotyczą różnych stadiów formowania peroksysomów. Fenotypy komórek drożdży, w których peroksysomy występują w zmniejszonej liczbie lub są niewykrywalne morfologicznie, przypominają fenotypy komórek pobranych od pacjentów chorych na zespół Zellwegera. Fenotyp wywołany mutacją *pas 7* (obecność w peroksysomach katalazy, ale brak tiolazy) przypomina inną ludzką chorobę peroksysomalną — typ ryzomeliczny chondrodysplazji punktowej. Szczepy drożdży, niosące te mutacje mogą okazać się użyteczne jako organizmy modelowe w wyjaśnieniu genetycznego podłoża ludzkich chorób peroksysomalnych. Przyczynią się też niewątpliwie do poszerzenia wiedzy na temat różnych aspektów biogenezy peroksysomów.

IV. Regulacja ekspresji genów, kodujących białka peroksysomalne

Proliferacja peroksysomów u drożdży podlega represji glukozowej i indukcji przez różne źródła węgla i azotu [55, 56]. Nie dziwi więc fakt, iż ekspresja większości genów kodujących białka peroksysomalne jest regulowana w ten sam sposób. Najlepiej zbadane pod tym kątem są dwa geny drożdży *S. cerevisiae* — gen *CTA1*, który koduje peroksysomalną katalazę A oraz gen *FOX3*, który koduje tiolazę 3-ketoacylo-CoA. Wpływ represji glukozowej na aktywność katalazy A znany był od dawna [57, 58] i wiadomo, że regulacja zachodzi na poziomie transkrypcji [59]. Podobnie jest w przypadku genu *FOX3* [60, 61], genu *FOX2* — kodującego białko wielofunkcyjne [59, 62] oraz genów *PAS1* [47] i *PAS3* [52]. Ekspresja czterech spośród tych genów: *CTA1*, *FOX2*, *FOX3* i *PAS1* podlega derepresji w komórkach hodowanych na nie ulegających fermentacji źródłach węgla oraz indukcji przez kwas olejowy [47, 59, 60]. Regulacji przez kwas olejowy podlega również ekspresja dwóch kluczowych enzymów cyklu glioksalowego — liazy izocytrynianowej i syntazy jabłczanowej [63].

W promotorach genów *S. cerevisiae*, kodujących oksydazę acylo-CoA, enzym wielofunkcyjny, tiolazę 3-ketoacylo-CoA i katalazę A zidentyfikowano w odległości około dwustu par zasad od miejsca startu translacji regiony o dużej homologii, pośredniczące w regulacji ekspresji tych genów przez kwas olejowy, tzw. **regiony ORE** (ang. *oleate response element*) [60, 61]. Ich sekwencja przedstawiona jest na rycinie 2.

Jak dotąd nie znaleziono czynnika wiążącego się do tych obszarów. Nie wiadomo również, jak dochodzi do przekazania sygnału, pochodzącego ze środowiska, do regionu promotorowego odpowiedniego genu.

Dodatkowo dla tych genów oraz dla genu kodującego białko Pas1p zostało zidentyfikowane miejsce wiązania się czynnika **ADR1** (ang. ***a**lcohol **d**ehydrogenase **I**I synthesis **r**egulator*) [61, 64]. Jest to potwierdzeniem wcześniejszych danych, z których wynika, że czynnik ten pełniący funkcję regulatora transkrypcji genu *ADH2* kodującego dehydrogenazę alkoholową II w drożdżach *S. cerevisiae* [65], jest równocześnie pozytywnym regulatorem, który kontroluje ekspresję genów kodujących enzymy peroksysomalne.

W mutantach *adr1*, hodowanych na glicerolu jako jedynym źródle węgla, liczba peroksysomów jest obniżona w stosunku do szczepów dzikich. Po przeniesieniu komórek do pożywek zawierających kwas olejowy zachodzi proliferacja organelli zarówno w komórkach szczepów dzikich, jak i u mutantów *adr1*. Derepresja za pośrednictwem produktu genu *ADR1* oraz indukcja poprzez kwas olejowy, stanowią więc różne, niezależne drogi przekazywania sygnałów wewnątrz komórki [64].

W sekwencjach promotorów genów *CTA1*, *FOX1*, *FOX2*, *FOX3* i *PAS1* znaleziono jeszcze jedną wspólną sekwencję, nazwaną **FUF1** (ang. ***FOX3 u**pstream **f**actor*). Zawiera ona motyw podobny do sekwencji o własnościach reprymujących **URS** (ang. ***u**pstream **r**epression **s**ite*), znalezionej w promotorze genu *CAR1*, który koduje arginazę [66]. Podobne motywy znaleziono w 13 innych genach kodujących nie związane ze sobą funkcjonalnie białka [67]. Przypuszczalnie jest to region o funkcji negatywnego regulatora transkrypcji.

S. cerevisiae są klasycznym modelem w badaniach z dziedziny biologii komórki w tym biogenezy struktur subkomórkowych: mitochondriów [68], retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgi'ego czy wakuoli [69], a od kilku lat również w badaniach biogenezy peroksysomów. Ustalenia będące owocem tych badań zostały w skrócie przedstawione w niniejszej pracy. Celem jej było przybliżenie pojęcia struktury peroksysomalnej i uwypuklenie użyteczności drożdży *S. cerevisiae* do jej badania.

Mimo ustalenia struktury C-końcowego peptydu sygnałowego, wciąż nie jest jasna jego rzeczywista rola w transporcie białek do peroksysomów. Jeszcze bar-

-242 A**TTTAC**CCC**AACGGCTAT**TA -261 oksydaza acylo-CoA
-213 **TTTTAC**TCC**AACGGGGAT**CA -194 enzym wielofunkcyjny
-199 **TC**A**AA**GGGA**AACGGGGATAA** -180 tiolaza 3-ketoacylo-CoA
-220 CCG**AA**AAAGG**ACGGCTTTAA** -201 katalaza A

Ryc. 2. Porównanie sekwencji ORE znalezionych w promotorach genów kodujących oksydazę acylo-CoA, enzym wielofunkcyjny, tiolazę 3-ketoacylo-CoA i katalazę A. Nukleotydy zgodne w przynajmniej dwóch sekwencjach zaznaczono pogrubioną czcionką.

http://rcin.org.pl

dziej zagadkowa jest funkcja stukilkudziesięcioaminokwasowej domeny N-końcowej. Nie wiemy czy informacja decydująca o skierowaniu białka do peroksysomu zapisana jest w sekwencji aminokwasów czy w strukturze trzeciorzędowej. Tiolaza i niektóre inne białka dostają się do peroksysomów prawdopodobnie za pośrednictwem innego systemu transportowego. Nie wiemy ile w sumie jest tych systemów i jak dalece są one odrębne. Nie wiemy nic o innych przypuszczalnych komponentach systemów transportu do peroksysomów.

Nie zidentyfikowano jak dotąd czynnika transkrypcyjnego odpowiedzialnego za regulację syntezy białek peroksysomalnych. Współzależności regulacyjne pomiędzy różnymi sygnałami płynącymi ze środowiska są wciąż niejasne.

Choć procesy metaboliczne w peroksysomach są stosunkowo lepiej poznane, w dalszym ciągu przybywa faktów o nowych funkcjach tych organelli.

Nawet ten bardzo skrótowy przegląd luk w naszej wiedzy pozwala uzmysłowić sobie jak wiele jest do zrobienia. Zaangażowanie wielu laboratoriów w tej dziedzinie pozwala spodziewać się wkrótce wyjaśnienia wielu z wymienionych tu kwestii.

Artykuł otrzymano 1 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 7 czerwca 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Rhodin J (1954) Ph. D. thesis. *Aktiebolaget Godoil, Stockholm*, str 1-76
2. Rouiller C, Bernhard W (1956) *J Biophys Biochem Cytol Suppl* **2**: 355-359
3. de Duve C, Baudhuin P (1966) *Physiol Rev* **46**: 323-357
4. Tolbert NE (1971) *Ann Rev Plant Physiol* **22**: 45-74
5. Briedenbach RW, Beevers H (1967) *Biochem Biophys Res Commun* **27**: 462-469
6. Cooper TG, Beevers H (1969) *J Biol Chem* **244**: 3514-3520
7. Avers CJ, Federman M (1968) *J Cell Biol* **37**: 555-559
8. Veenhuis M, Harder W (1987) W: Fahimi HD, Sies H (red) *Peroxisomes in Biology and Medicine*. Springer-Verlag, Berlin str 436-458
9. Litwin JA (1989) *Post Biol Kom* **16**: 19-60
10. Tolbert NE (1981) *Ann Rev Biochem* **50**: 133-158
11. Lazarow PB, Fujiki Y (1985) *Ann Rev Cell Biol* **1**: 489-550
12. Wanders RJA, van Roermund CWT, Schutgens RBH, Barth PG, Heymans HSA, van den Bosch H, Tager JM (1990) *J Inher Metab Dis* **13**: 4-36
13. van den Bosch H, Schutgens RBH, Wanders RJA, Tager JM (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 157-197
14. Cannon B, Alexson S, Nedergaard J (1982) *Ann NY Acad Sci* **386**: 40-58
15. Kindl H (1992) *Cell Biochem Funct* **10**: 153-158
16. van der Klei IJ, Harder W, Veenhuis M (1991) *Yeast* **7**: 195-209
17. Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau W-H, Harder W (1987) *Yeast* **3**: 77-84
18. Skoneczny M, Chełstowska A, Rytka J (1988) *Eur J Biochem* **174**: 297-302
19. Susani M, Zimniak P, Fessl F, Ruis H (1976) *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **357**: 961-970
20. Dell'Angelica EC, Stella CA, Ermacora MR, Ramos EH, Santome JA (1992) *Comp Biochem Physiol* **102B**: 261-265
21. Osmundsen H, Thomassen MS, Hiltunen JK, Berge RK (1987) W: Fahimi HD, Sies H (red) *Peroxisomes in Biology and Medicine*. Springer-Verlag, Berlin str 152-165
22. Palosaari PM, Kilponen JM, Hiltunen JK (1992) *Ann Med* **24**: 163-166
23. Behrends W, Birkham R, Kindl H (1990) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **371**: 85-94
24. Cregg JM, van der Klei IJ, Sulter GJ, Veenhuis M, Harder W (1990) *Yeast* **6**: 87-97
25. Erdmann R, Veenhuis M, Mertens D, Kunau W-H (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5419-5423
26. Shio H, Lazarow PB (1981) *J Histochem* **257**: 302-314
27. Fujiki Y, Fowler S, Shio H, Hubbard AL, Lazarow PB (1982) *J Cell Biol* **93**: 103-110
28. Fujiki Y, Rachubinski RA, Lazarow PB (1984) *Proc Natl Acad Sci US* **81**: 7127-7131
29. Fujiki Y, Rachubinski RA, Mortensen RH, Lazarow PB (1985) *Biochem J* **226**: 697-704
30. Keller G-A, Gould SJ, Deluca M, Subramani S (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3264-3268
31. Gould SJ, Keller G-A, Subramani S (1987) *J Cell Biol* **105**: 2923-2931
32. Gould SJ, Keller G-A, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S (1989) *J Cell Biol* **108**: 1657-1664
33. de Hoop MJ, Ab G (1992) *Biochem J* **286**: 657-669
34. Subramani S (1992) *J Membrane Biol* **125**: 99-106
35. Gould SJ, Keller GA, Schneider M, Howell SH, Garrard LJ, Goodman JM, Distel B, Tabak HF, Subramani S (1990) *EMBO J* **9**: 85-90
36. Keller G-A, Krisans S, Gould SJ, Sommer JM, Wang CC, Schliebs W, Kunau W, Brody S, Subramani S (1991) *J Cell Biol* **114**: 893-904
37. Aitchison JD, Szilard RK, Nuttley WM, Rachubinski RA (1992) *Yeast* **8**: 721-734
38. Janowicz ZA, Eckart MR, Drewke C, Roggenkamp RO, Hollenberg CP (1985) *Nucleic Acid Res* **13**: 3043-3062
39. Kragler F, Langeder A, Raupachova J, Binder M, Hartig A (1993) *J Cell Biol* **120**: 665-673
40. Kunau W-H, Hartig A (1992) *Antonie van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* **62**: 63-78
41. Wiemer EAC, Brul S, Just WW, van Driel R, Brouwer-Kelder E, van den Berg M, Weijers PJ, Schutgens RBH, van den Bosch H, Schram A, Wanders RJA, Tager JM (1989) *Eur J Cell Biol* **50**: 407-417
42. Veenhuis M, Goodman JM (1990) *J Cell Sci* **96**: 583-590
43. Kunau W-H, Bühne S, Moreno de la Garza M, Kionka C, Mateblowski M, Schultz-Borchard U, Thieringer R (1988) *Biochem Soc Transactions* **16**: 418-420
44. Dmochowska A, Dignard D, Maleszka R, Thomas DY (1990) *Gene* **88**: 247-252
45. Höhfeld J, Martens D, Wiebel FF, Kunau W-H (1992) W: Neupert W, Lill R (red) New Comprehensive Biochemistry Series, t **22**, Membrane Biogenesis and Protein Targeting, Elsevier Science Publishing Co., New York
46. van der Leij I, van der Berg M, Boot R, Franse M, Distel B, Tabak HF (1992) *J Cell Biol* **119**: 153-162
47. Erdmann R, Wiebel FF, Flessau A, Rytka J, Beyer A, Fröhlich K-U, Kunau W-H (1991) *Cell* **64**: 499-510
48. Wiebel FF, Kunau W-H (1992) *Nature* (Lond) **359**: 73-76
49. Jentsch S, Seufert W, Sommer T, Reins H-A (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 195-198
50. Jentsch S, Seufert W, Hauser H-P (1991) *Biochem Biophys Acta* **1089**: 127-139
51. Zhuang Z, Marks B, McCauley RB (1992) *J Biol Chem* **267**: 591-596
52. Höhfeld J, Veenhuis M, Kunau W-H (1991) *J Cell Biol* **114**: 1167-1178
53. Celenza JM, Carlson M (1986) *Science* **233**: 1175-1180
54. Wright RM, Poyton RO (1990) *Mol Cel Biol* **10**: 1297-1300

http://rcin.org.pl

55. Tanaka A, Fukui S (1989) W: Rose AH & Harrison JS (red) *The Yeast*, 2nd edition, t 3. Academic Press, London, str 261-287
56. Veenhuis M, Harder W (1991) W: Rose AH & Harrison JS (red) *The Yeast*, 2nd edition, t 4. Academic Press, London, str 601-653
57. Cross HS, Ruis H (1978) *Mol Gen Genet* **166**: 37-43
58. Rytka J, Śledziewski A, Łukaszewicz J, Bilińska T (1978) *Mol Gen Genet* **160**: 51-57
59. Simon M, Binder M, Adam G, Hartig A, Ruis H (1992) *Yeast* **8**: 303-309
60. Einerhand AW, Voorn-Brouwer TM, Erdmann R, Kunau W-H, Tabak HF (1991) *Eur J Biochem* **200**: 113-122
61. Einerhand AWC, van der Leij I, Kos WT, Distel B, Tabak HF (1992) *Cell Biochem Funct* **10**: 185-191
62. Hiltunen JK, Wenzel B, Beyer A, Erdmann R, Fossa A, Kunau W-H (1992) *J Biol Chem* **267**: 6646-6653
63. McCammon MT, Veenhuis M, Trapp SB, Goodman JM (1990) *J Bacteriol* **172**: 5816-5827
64. Simon M, Adam G, Rapatz W, Spevak W, Ruis H (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 699-704
65. Denis CL, Ciriacy M, Young ET (1981) *J Mol Biol* **148**: 355-368
66. Sumrada RA, Cooper TG (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3997-4001
67. Luche RM, Sumrada RA, Cooper TG (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 3884-3895
68. Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W (1989) *Biochim Biophys Acta* **988**: 1-45
69. Schekman R (1985) *Ann Rev Cell Biol* **1**: 115-143

Biosynteza hemu w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*

Heme biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

ANNA CHEŁSTOWSKA[1]
JOANNA RYTKA[2]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Szlak biosyntezy hemu
III. Hemoproteidy w komórkach drożdży *S. cerevisiae*
IV. Regulacja biosyntezy hemu w drożdżach *S. cerevisiae*
IV-1. Wydajność szlaku syntezy hemu
IV-2. Mutanty zaburzone w biosyntezie hemu
V. Charakterystyka enzymów uczestniczących w biosyntezie hemu i kodujących je genów
V-1. Syntaza kwasu 5-aminolewulinowego/ALA-S
V-2. Syntaza porfobilinogenu, PBG-S
V-3. Deaminaza porfobilinogenu, PBG-D
V-4. Syntaza uroporfirynogenu III, URO-S
V-5. Dekarboksylaza uroporfirynogenu III, UROD
V-6. Oksydaza koproporfirynogenu III, COPROX
V-7. Oksydaza protoporfirynogenu IX, PROTOX
V-8. Ferrochelataza, FERROC

Contents:

I. Introduction
II. Heme biosynthetic pathway
III. Heme-proteins in yeast *S. cerevisiae* cells
IV. Regulation of heme biosynthesis in yeast *S. cerevisiae*
IV-1. Efficiency of heme synthesis pathway
IV-2. Mutants affected in heme biosynthesis
V. Characteristic of heme biosynthetic enzymes and their structural genes
V-1. 5-Aminolevulinic acid synthase, ALA-S
V-2. Porphobilinogen synthase, PBG-S
V-3. Porphobilinogen deaminase, PBG-D
V-4. Uroporphyrinogen III synthase, URO-S
V-5. Uroporphyrinogen III decarboxylase, UROD
V-6. Coproporphyrinogen III oxidase, COPROX
V-7. Protoporphyrinogen IX oxidase, PROTOX
V-8. Ferrochelatase, FERROC

[1] dr., [2] prof. dr hab. Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Genetyki, Warszawa, ul. Pawińskiego 5A

Wykaz stosowanych skrótów: ALA-S — syntaza kwasu 5-aminolewulinowego; PBG-S — syntaza porfobilinogenu; PBG-D — deaminaza porfobilinogenu; URO-S — syntaza uroporfirynogenu III; UROD — dekarboksylaza uroporfirynogenu; COPROX — oksydaza koproporfirynogenu III; PROTOX — oksydaza protoporfirynogenu IX; FERROC — ferrochelataza

http://rcin.org.pl

I. Wstęp

Hem, jako grupa prostetyczna wielu białek wpływa na przebieg procesów metabolicznych o zasadniczym znaczeniu dla życia komórki. Są to: wiązanie i transport tlenu (hemoglobina, mioglobina), procesy utleniania i redukcji (cytochromy mitochondrialne), ochrona komórki przed toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu (katalazy i peroksydazy), synteza steroli, desaturacja kwasów tłuszczowych (cytochromy P-450 i b_5), biosynteza aminokwasów siarkowych (sirohem), utlenianie tryptofanu (pirolaza tryptofanowa). Ponadto hem jest niezbędnym czynnikiem w regulacji syntezy wielu białek (nie tylko hemoproteidów) działając na poziomie transkrypcji, translacji, składania i degradacji. Jest on także czynnikiem regulującym aktywność licznych enzymów. Również transport niektórych białek do mitochondriów jest procesem zależnym od obecności hemu.

Hem syntetyzują wszystkie organizmy we wszystkich typach komórek. W niektórych komórkach, ze względu na ich specyficzną funkcję, synteza hemu wielokrotnie przekracza poziom podstawowy. W organizmach zwierzęcych na przykład szczególnie intensywna synteza hemu zachodzi w tkance erytropoetycznej, gdzie ze względu na produkcję hemoglobiny powstaje około 80% hemu syntetyzowanego przez dany organizm.

Szlak biosyntezy hemu został dobrze poznany, jego kolejne etapy opisano dla wielu organizmów. Obecnie główne kierunki badań zmierzają do poznania: regulacji ekspresji genów kodujących poszczególne enzymy, specyficzności tkankowej tej regulacji oraz molekularnych podstaw porfirii-chorób metabolicznych, w których na skutek zaburzeń w biosyntezie hemu dochodzi do nadmiernej produkcji i gromadzenia się prekursorów hemu.

Konserwatyzm ewolucyjny kolejnych reakcji umożliwia wykorzystanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* do badania biochemicznych i fizjologicznych następstw mutacji w genach kodujących enzymy tego szlaku i w genach, których produkty wpływają na wydajność syntezy hemu.

II. Szlak biosyntezy hemu

Podobnie jak w przypadku większości szlaków metabolicznych, poszczególne etapy biosyntezy hemu przebiegają w wyniku takich samych reakcji enzymatycznych, z wytworzeniem identycznych metabolitów pośrednich, niezależnie od badanego organizmu. Wyjątek stanowi synteza kwasu 5-aminolewulinowgo, prekursora syntezy wszystkich tetrapiroli. Kolejność reakcji ustalono już w latach czterdziestych i pięćdziesiątych naszego stulecia. Dane dotyczące biosyntezy hemu w różnych organizmach zebrano w obszernych opracowaniach [1-5]. Schemat szlaku biosyntezy hemu w drożdżach przedstawia rycina 1. Produktem pierwszego etapu jest kwas 5-amino-lewulinowy (ALA). W komórkach zwierzęcych, drożdży oraz niektórych bakterii, powstaje on w wyniku kondensacji glicyny i bursztynylo-CoA (tzw. szlak Shemina). Reakcję katalizuje syntaza kwasu 5-amino-lewulinowego (ALA-S), EC 2.3.1.37. Reakcja ta zachodzi w macierzy mitochondrialnej, a jej produkt jest przenoszony do cytoplazmy.

W komórkach wyższych roślin, glonów, niektórych bakterii fotosyntetyzujących a także w *B. subtilis* i *E. coli* funkcjonuje tzw. szlak C-5. U tych organizmów prekursorem kwasu 5-aminolewulinowego jest glutamlo-tRNA [5,6].

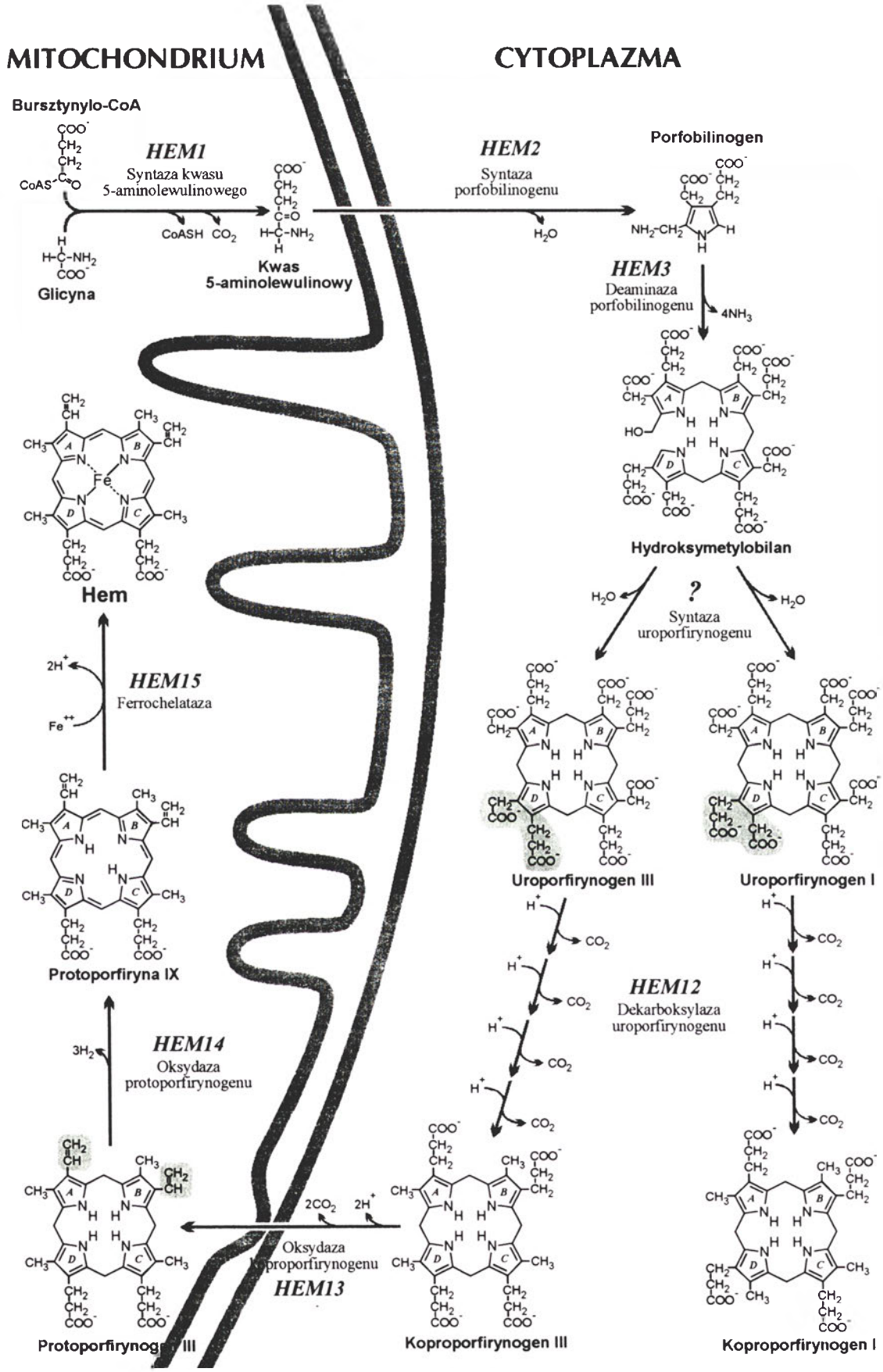
W wyniku asymetrycznej kondensacji dwóch cząsteczek kwasu 5-aminolewulinowego powstaje pierwsza struktura pirolowa — porfobilinogen, PBG. Reakcja ta zachodzi w cytoplazmie i jest katalizowana przez syntazę porfobilinogenu (PBG-S), EC 4.2.1.24, znaną również pod nazwą ALA-dehydratazy.

Cztery cząsteczki porfobilinogenu w wyniku sekwencyjnej polimeryzacji, katalizowanej przez deaminazę porfobilinogenu (PBG-D), EC 4.1.3.8, dają liniowy tetrapirol-hydroksymetylobilan. Jest to bardzo niestabilny związek, który spontanicznie tworzy cykliczny tetrapirol — uroporfirynogen I. Fizjologiczny prekursor hemu, uroporfirynogen III, powstaje w reakcji katalizowanej przez syntazę uroporfirynogenu III, EC.4.2.1.75. Enzymatyczne zamknięcie pierścienia jest połączone z równoczesnym odwróceniem pierścienia pirolu D.

Kolejnym prekursorem hemu jest koproporfirynogen III. Powstaje on w wyniku dekarboksylacji czterech reszt octanowych uroporfirynogenu III. Reakcję katalizuje dekarboksylaza uroporfirynogenu III (URO-D), EC 4.1.1.3. Z uroporfirynogenu, posiadającego 8 grup karboksylowych, powstają pochodne hepta-, heksa- i pentakarboksylowe. Dekarboksylacji ulega również uroporfirynogen I, jednak produkt tej reakcji, koproporfirynogen I, nie jest dalej metabolizowany. Uważa się, iż w komórkach kolejne dekarboksylacje uroporfirynogenu III zachodzą w sposób uporządkowany i dekarboksylowane są kolejno reszty acetylowe pierścieni D, A, B i C (Ryc. 2), natomiast w przypadku uroporfirynogenu I, lub w reakcji *in vitro*, dekarboksylacje zachodzą w sposób przypadkowy [7, 8].

Dwie grupy propionylowe pierścieni A i B koproporfirynogenu III ulegają kolejno oksydacyjnej dekarboksylacji do grup winylowych. Reakcja ta jest katalizowana przez oksydazę koproporfirynogenu III (COPROX), EC 1.3.3.3, a jej produktem jest protoporfirynogen IX. W komórkach drożdży, tak jak w komórkach wyższych eukariontów, jedynym, dotychczas wykrytym, akceptorem elektronów w tej reakcji jest tlen cząsteczkowy [9]. W bakteriach beztlenowych *Rhodopseudomonas spheroides* akceptorem elektronów może być NADP [10]. W komórkach zwierzęcych enzym ten znajduje się w przestrzeni między zewnętrzną i wewnętrzną błoną mitochondrialną, natomiast

http://rcin.org.pl

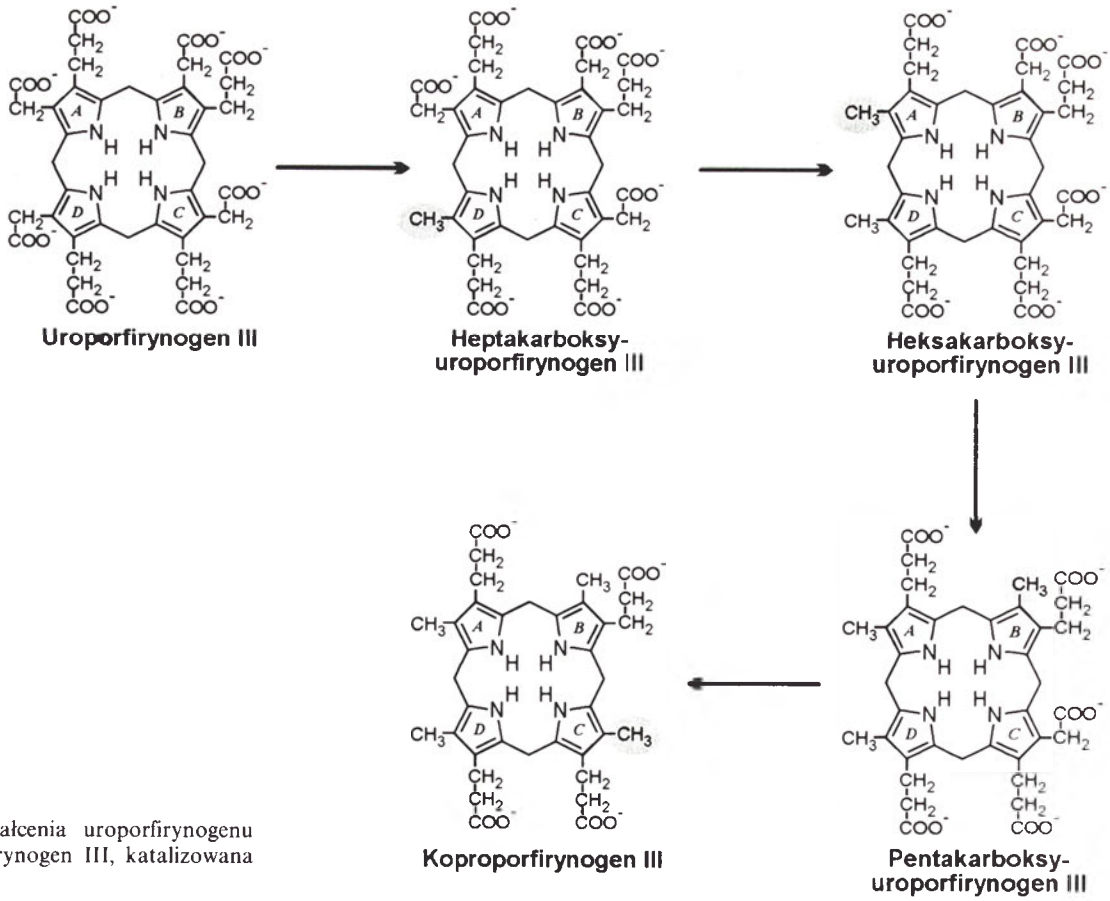


Ryc. 1. Szlak biosyntezy hemu
Na rycinie zaznaczono lokalizację enzymów w komórce *S. cerevisiae*.
HEM 1, *HEM* 2, *HEM* 3, *HEM* 12, *HEM* 13, *HEM* 14, *HEM* 15 — geny kodujące poszczególne enzymy szlaku. Oznaczenia loci wg 37, 41, 42.

w *S. cerevisiae* jest on zlokalizowany w cytoplazmie [9].

Przedostatnim etapem biosyntezy hemu jest enzymatyczne utlenienie protoporfirynogenu IX do protoporfiryny IX, katalizowane przez oksydazę proto-

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Reakcja przekształcenia uroporfirynogenu III w koproporfirynogen III, katalizowana przez UROD

porfirynogenu IX (PROTOX), EC 1.3.3.4. Uważa się, że u eukariontów, tlen jest jedynym akceptorem elektronów w tej reakcji. W komórkach *E. coli*, hodowanych w warunkach beztlenowych, elektrony mogą być przenoszone na fumaran lub azotan [11]. W komórkach wszystkich dotychczas zbadanych organizmów eukariotycznych oksydaza porfirynogenu i ostatni enzym szlaku-ferrochelataza znajdują się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Ferrochelataza (FERROC)., EC 4.99.1.1, katalizuje włączanie Fe^{++} do tetrapirolowego pierścienia protoporfiryny IX. Produktem tej reakcji jest żelazoprotoporfiryna IX nazywana także protohemem lub hemem b. Odmianami protohemu są hem a i hem c.

W komórkach hem występuje w postaci związanej z białkami.

III. Hemoproteidy w komórkach drożdży *S. cerevisiae*

W wewnętrznej błonie mitochondralnej kompetentnych oddechowo komórek drożdży, wyhodowanych w warunkach tlenowych, znajdują się cytochromy b_1, c_1, c oraz a i a_3 wchodzące w skład łańcucha oddechowego. W cytochromach c i c_1 protohem związany jest konwalencyjnie z białkiem tioetereowymi wiązaniami pomiędzy grupami winylowymi protohemu a dwiema resztami cysteinowymi apoenzymu, jest to hem c. Reakcja przekształcania protohemu w hem c zachodzi podczas transporu apocytochromów do mitochondrium i jest katalizowana odpowiednio przez liazy cytochromu c i cytochromu c_1 [12, 13]. Grupę prostetyczną cytochromów a i a_3 stanowi tzw. hem a, w którym w pozycji 8 zamiast grupy metylowej znajduje się grupa formylowa, a do reszty winylowej w pozycji 2 jest przyłączony hydroksyfarnezyl. Dotychczas nie wiadomo czy prekursorem hemu a jest protoporfiryna IX, czy też powstaje on w wyniku przekształcenia protohemu. Grupę prostetyczną pozostałych hemoproteidów stanowi hem b, który jest związany z białkami wiązaniem koordynacyjnym.

W przestrzeni między zewnętrzną i wenętrzną błoną mitochondrialną umiejscowiona jest peroksydaza cytochromu c i cytochrom b_2 — dehydrogenaza L-mleczanowa [14]. Z frakcją mikrosomalną związane są dwa cytochromy: b_5 i P_{450DM}. Cytochron b_5 bierze udział w oksydacyjnej desaturacji kwasów tłuszczowych i sterolu [15, 16] zaś cytochrom P_{450} w reakcji oksydacyjnej demetylacji i desaturacji lanosterolu [17, 18]. W peroksysomach znajduje się katalaza A, natomiast druga katalaza, katalaza T jest enzymem cytoplazmatycznym [19]. W cytoplazmie wykryto również flawohemoglobinę. Sekwencja aminokwasowa tego białka wskazuje na znaczne podobieństwo do hemoglobin bakteryjnych. Przypuszcza się, że flawohemoglobina bierze udział w magazynowaniu i transporcie tlenu w komórce [20, 21]. Chelat uroporfiryny z Fe^{++}-sirohem jest grupą prostetyczną reduktazy siarczynowej, enzymu szlaku biosyntezy aminokwasów siarkowych [23].

http://rcin.org.pl

Rodzaj i ilość hemoproteidów w komórce są zmienne i zależą od trzech głównych czynników regulacyjnych: glukozy, tlenu i hemu. Mechanizm regulacji ekspresji genów przez te trzy czynniki jest bardzo skomplikowany i daleki od wyjaśnienia. Indukcja genów kontrolowanych przez hem zachodzi za pośrednictwem zależnych od hemu aktywatorów transkrypcji HAP 1 (CYP 1) i działających w kompleksie HAP 2/3/4 (od ang. ***hem activation protein***). Zidentifikowano konserwowane sekwencje DNA zwane UAS (ang. ***Upstream Activation Sites***) występujące w odcinkach DNA poprzedzających promotory genów, których transkrypcja zależy od obecności hemu w komórce. Hem jest też represorem grupy genów drożdżowych, których ekspresja jest indukowana w warunkach beztlenowych. W tej negatywnej regulacji przez hem pośredniczą represory transkrypcji — produkty genów ROX 1 i REO 1. Transkrypcja tych genów jest kontrolowana przez zależne od hemu aktywatory HAP. Powszechnie przyjmowano, że hem jest efektorem pośredniczącym w oddziaływaniu tlenu na komórki. Najnowsze badania wskazują, że regulacja przez hem i tlen jest w kilku przynajmniej przypadkach od siebie niezależna [23, 24, 25]. W tabeli 1 przedstawiono listę enzymów, których synteza jest regulowana przez hem. Należy podkreślić, że efekt regulacyjny hemu nie jest ograniczony tylko do drożdży, występuje także w bakteriach u roślin i ssaków [26].

IV. Regulacja biosyntezy hemu w dożdżach *S. cerevisiae*

W badaniu przebiegu reakcji biosyntezy hemu wyizolowano i oczyszczono enzymy z różnych organizmów. Scharakteryzowano ich specyficzność substratową, kinetykę (Km, Vmax, inhibitory, aktywatory) i mechanizmy przeprowadzanych reakcji, jednakże klasyczne metody biochemiczne, poza kilkoma niezgodnymi wnioskami, nie dostarczyły danych o regulacji całego szlaku. Wydaje się, że przyczyna tego stanu rzeczy leży w podejściu eksperymentalnym polegającym na pomiarach aktywności enzymów *in vitro*, co nie zawsze odzwierciedla ich rzeczywistą aktywność w komórce. Tak więc w badaniu regulacji syntezy hemu wydaje się uzasadnionym wybór innego układu badawczego, opartego na pomiarach wydajności poszczególnych etapów. W tego rodzaju badaniach nieocenionym wprost organizmem są drożdże, gdyż przez zmianę warunków hodowli można powodować kontrolowane zmiany w metabolizmie komórki. Doświadczeń takich nie można wykonywać z organizmami wyższymi, które są przystosowane do życia w homeostazie. Podstawową przewagą drożdży jako obiektu badań jest unikalna możliwość otrzymywania mutantów całkowicie niezdolnych do syntezy hemu.

Tabela 1.
Regulacja ekspresji genów przez hem

Nazwa genu	Produkt genu	Regulacja	Czynnik transkrypcyjny		Odnośnik ****)
			Aktywator	Represor	
CYC1	izo-1-cytochrom c	+	HAP1, HAP2/3/4		4, 24
CYC7	izo-2-cytochrom c	0/+	HAP1	ROX1	25, 89
CYT1	cytochrom c_1*)	+	HAP1, HAP2		99
CYB2	cytochrom b_2	+	HAP1, HAP2/3/4		
COR1	podjednostka I oksydoreduktazy QH2:cytochrom c	+	?		41
COR2	podjednostka II oksydoreduktazy QH2:cytochrom c	+	HAP1, HAP2/3/4		
COX5A	podjednostka Va oksydazy cytochromu c	+	HAP2/3/4		
COX5B	podjednostka Vb oksydazy cytochromu c**)	–		ROX1	
COX6	podjednostka VI oksydazy cytochromu c**)	+	HAP2/3/4		
CTT1	katalaza T — cytoplazmatyczna***)	+	HAP1		
CTA1	katalaza A — peroksysomalna	+	?		
SOD2	Mn^{++} — dysmutaza ponadtlenkowa	+	HAP1		
HMG1	reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA	+	HAP1		
HMG2	reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA	–		?	
ERG11	cytochrom P-450	–		ROX1	
OLE1	desaturaza kwasów tłuszczowych	–		ROX1	
HEM1	syntaza kwasu 5-aminolewulinowego	0/+	HAP2/3/4		56
HEM3	deaminaza porfobilinogenu	0/+	HAP2/3/4		42
HEM13	oksydaza koproporfirynogenu 3	–	HAP1	ROX1	44
TIF51A	eIF5A — podjednostka kompleksu inicjacji translacji	+	HAP1		
ANB1	eIF4D — podjednostka kompleksu inicjacji translacji	–		ROX1	
ROX1	czynnik regulacyjny — represor	+	HAP1		

\+ — indukcja
– — represja
0 — brak efektu
? — nieznany mechanizm regulacji

*) regulacja przez hem importu apocytochromu c do mitochondriów (100)
**) regulacja przez hem składania podjednostek oksydazy cytochromu c w błonie mitochondrialnej (101)
***) regulacja przez hem na poziomie translacji (102)
****) brak numeru odnośnika oznacza, że zamieszczone dane pochodzą z prac cytowanych w (4) i (24)

http://rcin.org.pl

IV-1. Wydajność szlaku syntezy hemu

Ilość hemu syntetyzowanego w komórkach drożdży nie jest stała, zależy głównie od obecności tlenu i rodzaju źródła węgla w pożywce. Wykazano, że bez względu na warunki hodowli syntetyzowane są wszystkie enzymy szlaku a ich aktywności (mierzone *in vitro* w ekstraktach bezkomórkowych) nie ulegają zasadniczym zmianom. Wyjątek stanowi oksydaza koproporfirynogenu III, której aktywność w komórkach wyhodowanych beztlenowo wzrasta kilku a nawet kilkunastokrotnie w zależności od badanego szczepu [4, 27-29]. W badaniu *in vivo* oznaczano w komórkach zawartość hemu i pośrednich produktów jego syntezy, a miarą produktywności szlaku była ilość syntetyzowanych pierścieni tetrapirolowych wyrażona w nmolach/gram suchej masy (8 cząsteczek ALA = 1 cząsteczka 'tetrapirolu'. Zestawienie wyników uzyskanych w różnych pracach [4, 9, 27, 29-31] wskazuje, że suma wszystkich produktów szlaku biosyntezy hemu, która jest równocześnie miarą produktywności pierwszego enzymu, była około trzykrotnie wyższa dla komórek hodowanych w warunkach derepresji w porównaniu z komórkami hodowanymi na glukozie w warunkach tlenowych i beztlenowych. Głównymi produktami w komórkach hodowanych tlenowo były hem i ALA (odpowiednio 60% i 40%). Zawartość hemu w komórkach zdereprymowanych była 2-3 razy wyższa aniżeli w komórkach hodowanych na glukozie. Podczas wzrostu w obecności tlenu, bez względu na źródło węgla, porfiryny są akumulowane i wydalane do podłoża w znikomych ilościach nie przekraczających 3-5% ogólnej sumy tetrapiroli. Do podłoża wydalana jest głównie uroporfiryna I i produkty jej dekarboksylacji [31]. Mahler i Lin [32] postulowali, że enzymem odpowiedzialnym za efekt represji glukozowej jest ALA-S. Wniosek taki wysunęli na podstawie obserwacji, że po przeniesieniu komórek z podłoża zawierającego glukozę jako źródło węgla do podłoża z etanolem, następuje wzrost aktywności ALA-S. Zdaniem Labbe-Bois i wsp. [28] enzymem podlegającym represji glukozowej jest PBG-S, ponieważ poziom aktywności tego enzymu jest dziesięciokrotnie niższy od poziomu aktywności ALA-S, co w połączeniu z słabym powinowactwem do substratu (Km 1,5-2,6 mM) może tłumaczyć znaczną akumulację ALA i wskazuje na PBG-S jako enzym ograniczający wydajność szlaku.

W drożdżach hodowanych bez dostępu tlenu ALA stanowi 50-70% wszystkich produktów szlaku. Drugim co do ilości wytwarzanym intermediatem były porfiryny, 30-40% ogólnej sumy tetrapiroli. Większość porfiryn była wydalana do podłoża. Niespodziewanie w tych komórkach wykrywa się obecność hemu. Stanowi on 3-7% wszystkich produktów wytwarzanych przez szlak i jest związany z apocytochromami P450, P420 i b_5 [4, 24, 25]. Przypuszcza się, że śladowe ilości tlenu w pożywce są wystarczające aby zaszła synteza hemu. Pomimo iż nie zidentyfikowano akceptora elektronów mogącego zastąpić tlen w komórkach drożdży wyhodowanych beztlenowo nie można wykluczyć, że w *S. cerevisiae*, podobnie jak w *E. coli*, akceptory takie istnieją. O takiej możliwości świadczyć może fakt, iż wyizolowano mutanty posiadające aktywną katalazę w komórkach wyhodowanych beztlenowo [33]. W hodowlach beztlenowych zastąpienie glukozy przez słabiej reprymujące źródło węgla-galaktozę, nie wpływa na wydajność szlaku ani na procentowy skład poszczególnych intermediatów.

Wyniki badań nad regulacją biosyntezy hemu w komórkach zwierzęcych wskazują, że wydajność szlaku jest regulowana przez hem. Granick i wsp. uważali, że hem hamuje syntezę pierwszego enzymu szlaku [34], Ibrachim i wsp. [35] postulowali, iż regulacja przez hem odbywa się na poziomie aktywności ALA-S, natomiast Hayashi i wsp. [36] wskazali na istnienie jeszcze jednej drogi oddziaływania hemu na pierwszy enzym szlaku, a mianowicie hamowanie transportu ALA-S z cytoplazmy do mitochondriów. Biochemiczna analiza bezhemowych mutantów drożdży, zablokowanych w końcowych etapach szlaku, wykazała, iż brak hemu nie prowadzi do obniżenia wydajności reakcji katalizowanej przez ALA-S. W ten sposób udowodniono, iż w drożdżach nie występuje regulacja syntezy hemu na drodze hamowania zwrotnego przez końcowy produkt [29, 37]. Porównanie aktywności poszczególnych enzymów oznaczonych *in vitro* i *in vivo* wskazuje, że reakcje katalizowane przez ALA-S i enzymy zlokalizowane w cytoplazmie, poza COPROX, zachodzą w komórce z wydajnością zbliżoną do Vmax. Dwa ostatnie enzymy szlaku, związane z błonami mitochondrialnymi-PROTOX i FERROC, *in vivo* wykazują aktywność znacznie poniżej Vmax oznaczonej *in vitro*.

Powyższe obserwacje wskazują na istnienie nadrzędnego systemu kontrolującego wydajność szlaku syntezy hemu, ale nie udało się stworzyć spójnej hipotezy wyjaśniającej mechanizm tej kontroli. Obecnie skoncentrowano się na badaniu regulacji ekspresji genów kodujących poszczególne enzymy szlaku.

Osobnym zagadnieniem, jest wewnątrzkomórkowy transport hemu i jego intermediatów. Są to lipofilne, reaktywne cząsteczki, łatwo agregujące, a ich akumulacja prowadzi do fotodestrukcji struktur komórkowych. Uważa się, że ich transportem w komórce kierują interakcje z białkami. W procesie biosyntezy hemu w transporcie tetrapiroli do mitochondriów prawdopodobnie biorą udział enzymy szlaku hemu. Przenoszenie substratu z enzymu na enzym (ang. *substrate channeling*) umożliwia nie tylko transport przez błony mitochondrialne, ale zapobiega utlenianiu porfirynogenów do porfiryn [38]. Końcowy produkt reakcji-hem jest wykorzystywany w mitochondriach przez apocytochromy łańcucha oddechowego, ale musi być dostarczony także do innych przedziałów komórkowych (cytoplazma, mikrosomy, peroksysomy). Me-

http://rcin.org.pl

chanizm wewnątrzkomórkowego transportu hemu jest nieznany, przypuszcza się, że istnieje system receptorów i białek przenoszących hem od miejsca syntezy do miejsca przeznaczenia. Nie wiadomo też w jakiej postaci występuje hem będący czynnikiem regulującym transkrypcję genów. Postuluje się istnienie „puli regulacyjnego hemu" [39].

IV-2. Mutanty *S. cerevisiae* zaburzone w biosyntezie hemu

Wielorakość funkcji, które pełni hem w komórce powoduje plejotropowe efekty mutacji prowadzących do całkowitego zablokowania syntezy hemu:

— mutanty bezhemowe są niekompetentne oddechowo na skutek braku mitochondrialnych cytochromów i rosną wyłącznie na podłożach zawierających cukry ulegające fermentacji;
— wymagają do wzrostu egzogennych nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz ergosterolu na skutek braku cytochromów b_5 i 450;
— nie wykazują aktywności katalazy i peroksydazy;
— mutanty zablokowane we wczesnych etapach biosyntezy hemu wykazują auksotrofię cysteinową i metioninową, gdyż nie posiadają aktywności reduktazy siarczynowej;
— akumulują w komórkach lub wydzielają do podłoża prekursory hemu, których skład zależy od tego, który enzym został uszkodzony;
— mutanty zaburzone w ostatnich czterech etapach biosyntezy hemu gromadzą porfiryny, które powodują czerwoną fluorescencję komórek po wzbudzeniu ich światłem UV.

Większość wymienionych cech fenotypowych była wykorzystana do izolowania mutantów bezhemowych i częściowo zaburzonych w biosyntezie hemu.

W licznych publikacjach opisano mutanty niezdolne do syntezy hemu, ale dopiero Urban-Grimal i Labbe-Bois [37] podjęły systematyczną pracę nad izolacją kolekcji izogenicznych mutantów zablokowanych w kolejnych etapach szlaku. Na podstawie analizy akumulowanych prekursorów hemu i oznaczeń aktywności enzymatycznych w otrzymanych mutantach, autorki zidentyfikowały 7 genów kodujących poszczególne enzymy. Są one zaznaczone na Ryc. 1. Nie znaleziono mutanta, w którym defekt dotyczyłby syntazy uroporfirynogenu. Dostępność mutantów *hem* pozwoliła na sklonowanie przez komplementację funkcjonalną sześciu genów kodujących enzymy szlaku syntezy hemu w *S. cerevisiae*. Są to geny *HEM1*, *HEM2*, *HEM3*, *HEM12*, *HEM13* i *HEM15*. Geny te zsekwencjonowano [40-45], na podstawie sekwencji nukleotydowej ustalono sekwencję aminokwasową enzymów co umożliwia poszukiwanie zależności pomiędzy strukturą białka i jego funkcją.

Otrzymano również cały szereg mutantów obniżonej aktywności dekarboksylazy uroporfirynogenu III, oksydazy koproporfirynogenu i ferrochelatazy [30, 31, 46]. Szczegółowa analiza biochemiczna i genetyczna tych mutantów wykazała, że drożdże mogą być traktowane jako modelowy organizm w badaniu molekularnych podstaw porfirii [31, 47].

Mutanty bezhemowe wykorzystano także w badaniu regulacyjnej roli hemu w metabolizmie komórki (Tab. 1).

V. Charakterystyka enzymów uczestniczących w syntezie hemu i kodujących je genów

V-1. Syntaza kwasu 5-aminolewulinowego — ALA-S

Aktywność syntazy kwasu 5-aminolewulinowego w ekstraktach z komórek drożdży wykryto w 1971 r., niezależnie w trzech laboratoriach [48-50]. Oczyszczony enzym okazał się dimerem, złożonym z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 53 kDa. Koenzymem ALA-S jest fosforan pirydoksalu.

Mutanty *hem1* (*ole3*, *cyd1*, *hemA*) pozbawione aktywności ALA-S w wyniku mutacji w genie struktury tego enzymu zostały wyizolowane w kilku laboratoriach [37, 51-54]. Widma cytochromowe zmutowanych komórek ujawniają brak cytochromów i porfiryn. Dodanie do podłoża kwasu 5-aminolewulinowego przywraca widmo cytochromowe charakterystyczne dla szczepu rodzicielskiego, co wskazuje, że pozostałe enzymy szlaku są syntetyzowane i aktywne, a jedynie brak substratu powoduje brak syntezy hemu. Ta właściwość mutantów *hem1* stanowi o ich roli w badaniu regulacyjnej roli hemu, stwarza bowiem możliwość manipulowania różnymi stężeniami ALA w podłożu.

Gen *HEM1*, kodujący ALA-S, sklonowano przez komplementację funkcjonalną mutacji *hem1*. Zsekwencjonowano część kodującą genu i znaczny odcinek DNA poprzedzający kodon inicjacyjny [40, 55, 56]. Na podstawie sekwencji nukleotydowej ustalono aminokwasową sekwencję enzymu. Gen *HEM1* koduje białko zbudowane z 548 aminokwasów. ALA-S, tak jak większość białek umiejscowionych w mitochondriach, jest syntetyzowana w postaci prekursora, którego N-końcowy odcinek stanowi sygnalny polipeptyd odcinany proteolitycznie w czasie transportu białka przez błony mitochondrialne. Jak już wspomniano w poprzednim rozdziale, w badaniach nad regulacją syntezy hemu w komórkach zwierzęcych postulowano, że ALA-S odgrywa kluczową rolę w regulacji produktywności szlaku [34, 35]. Kiedy sklonowano cDNA kodujący ALA-S w komórkach wątroby i w tkance erytroidalnej człowieka, kurczęcia i szczura okazało się, że u kręgowców występują dwa geny kodujące ALA-S. Jeden z nich jest genem typu "house-keeping", drugi ulega ekspresji w tkance erytroidalnej. Homologia sekwencji enzymów (ALA-S-H i ALA-S-E) wynosi około 80% [57-59]. Odkrycie to pozwoliło na

http://rcin.org.pl

wyjaśnienie odmiennej regulacji syntezy hemu w komórkach wątroby i komórkach erytroidalnych szpiku kostnego. W komórkach wątroby aktywny jest gen typu "house-keeping". Hem powoduje obniżenie transkrypcji tego genu, zmniejszenie stabilności transkryptu i ogranicza transport prekursorowej formy białka do mitochondriów [60].

Regulacja ekspresji drugiego genu, w tkance erytroidalnej, jest słabo poznana. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do hepatocytów zwiększona synteza hemu nie występuje wyłącznie na skutek indukcji syntezy ALA-S-E lecz indukcja obejmuje także pozostałe enzymy szlaku. Następuje ona sekwencyjnie i zachodzi na poziomie transkrypcji odpowiednich genów [61].

Dane opublikowane przez różnych autorów [28, 32, 49, 62, 63] świadczą, że w drożdżach ALA-S nie jest enzymem ograniczającym produktywność szlaku syntezy hemu, ponieważ w komórkach zawsze wykrywa się znaczne ilości ALA. Komórki drożdży, do których wprowadzono na drodze transformacji wiele kopii genu *HEM1* syntetyzowały taką samą ilość hemu jak komórki szczepu biorcy mimo, iż stwierdzano znaczny wzrost aktywności ALA-S i ilości ALA zakumulowanego w komórkach transformantów [4]. Niezmieniona aktywność ALA-S w mutantach bezhemowych *hem12*, *hem13* i *hem15* wskazywała, że ani aktywność ani też synteza tego enzymu nie podlega regulacji przez hem. Tymczasem szczegółowa analiza promotorowego odcinka genu *HEM1* wykazała, iż pozornie konstytutywna synteza enzymu wynika z obecności dwóch sekwencji odpowiedzialnych za „włączanie" i „wyłączanie" genu w odpowiedzi na nie poznane dotychczas sygnały fizjologiczne. Wydaje się, że sekwencja DNA na odcinku: -392 do -368 jest odpowiedzialna za indukcję transkrypcji przez aktywatory HAP2 i HAP3, a sekwencje zawarte w odcinku: -366 do -310 oddziaływują z niezidentyfikowanym dotychczas represorem znoszącym regulacyjny efekt HAP2 i HAP3 [56]. Ten skomplikowany i nie wyjaśniony do końca mechanizm regulacji syntezy ALA-S włącza gen *HEM1* do rodziny genów których ekspresja jest regulowana przez hem.

V-2. Syntaza porfobilinogenu PBG-S

Enzym ten znajduje się w cytoplazmie. Jedyną próbę oczyszczenia drożdżowej PBG-S podjął w 1967 r. D e B a r r e i r o [64]. Enzym drożdżowy tak jak i enzym wyizolowany z komórek bakteryjnych, roślinnych i zwierzęcych jest metaloproteidem i zawiera 4-6 atomów cynku na cząsteczkę białka. Mutanty *hem2* (*ole4*, *olerg4*, *hem10*), pozbawione aktywności PBG-S zostały otrzymane przez kilka grup badaczy zajmujących się nie tylko syntezą hemu, ale również biosyntezą steroli i biogenezą mitochondriów [37, 51, 65, 66]. Gen *HEM2* został zsekwencjonowany [41]. Koduje on białko o masie cząsteczkowej 38 kDa zbudowane z 342 aminokwasów. Sklonowano również geny kodujące PBG-S w *E. coli* [67] i *B. subtilis* [68] oraz cDNA z wątroby człowieka i szczura [69, 70]. Dane uzyskane dzięki zsekwencjonowaniu genów połączone z nagromadzonymi wcześniej danymi biochemicznymi pozwoliły na identyfikację domen decydujących o właściwościach enzymu. Homologia pomiędzy białkiem ludzkim i szczura wynosi 88%, białka ludzkie i drożdżowe są identyczne w 52%. Zidentyfikowano fragment białka, w którym znajduje się reszta lizynowa wiązaca substrat -ALA. Na tej podstawie ustalono przedstawioną poniżej prawdopodobną sekwencję centrum aktywnego.

Zidentyfikowano także domenę wiążącą jony Zn^{++}, które są niezbędne dla aktywności PBG-S. Ma ona następującą strukturę pierwszorzędową:

Domena ta oprócz trzech reszt cysteinowych i jednej histydynowej niezbędnych do oddziaływania z jonami cynkowymi, zawiera dodatkowe reszty histydynowe i cysteinowe. Przypuszcza się, że taka struktura jest odpowiedzialna za bardzo silne powinowactwo enzymu do cynku i ołowiu. Ołów hamuje aktywność enzymu i wpływa na jego stabilność zarówno *in vitro* jak i *in vivo* do tego stopnia, iż aktywność PBG-S w surowicy stanowi miarę poziomu ołowiu przy zatruciach tym metalem [3].

Dotychczas nie opublikowano, żadnych danych o regulacji ekspresji genu *HEM2* w drożdżach potwierdzających hipotezę L a b b e - B o i s i V o l l a n d [28], że to właśnie PBG-S jest enzymem, odpowiedzialnym za niższą zawartość hemu w komórkach hodowanych na podłożu z glukozą. Hipoteza ta została jedynie potwierdzona przez B o r r a l h o i w s p. [71], którzy wykazali, że w mutantancie *hex2*, charakteryzującym się opornością na represję glukozową wielu enzymów, również aktywność PBG-S pozostawała wysoka w komórkach hodowanych w obecności glukozy.

enzym ludzki	G	A	D	M	L	M	V	K	P	G	M	P	Y	L	D	I	V	R	E
enzym szczura	G	A	D	I	L	M	V	K	P	G	L	P	Y	L	D	M	V	Q	E
enzym *E. coli*	G	A	D	C	L	M	V	K	P	A	G	A	Y	L	D	I	V	R	E
enzym *B. subtilis*	G	A	D	F	L	I	V	K	P	S	L	S	Y	M	D	I	M	R	D
enzym *S. cerevisiae*	G	A	D	G	I	I	V	K	P	S	T	F	Y	L	D	I	M	R	D

sekwencja centrum aktywnego

http://rcin.org.pl

enzym ludzki	C	D	V	C	L	C	P	Y	T	S	H	G	H	C	G
enzym szczura	C	D	V	C	L	C	P	Y	T	S	H	G	H	C	G
enzym *E. coli*	S	D	T	C	F	C	E	Y	T	S	H	G	H	C	G
enzym *B. subtilis*	A	D	T	C	L	C	E	Y	T	D	H	G	H	C	G
enzym *S. cerevisiae*	C	D	V	C	L	C	E	Y	T	S	H	G	H	C	G

struktura pierwszorzędowa domeny PBG-S wiążącej jony Zn^{++}

V-3. Deaminaza porfobilinogenu, PBG-D

Do czasu sklonowania i zsekwencjonowania genu *HEM3*, kodującego PBG-D, enzym ten był słabo scharakteryzowany. Z badań przeprowadzonych na innych organizmach było wiadomo, że tworzy on stabilny kompleks z syntazą uroporfirygenu III [1-3]. PBG-D wyizolowano z *E. coli*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Euglena gracillis* i ludzkich erytrocytów [73-76]. Wszystkie oczyszczone enzymy były monomerami o masie cząsteczkowej 35-44 kDa. Gen *HEM3* koduje białko zbudowane z 327 aminokwasów. Porównanie sekwencji aminokwasowych enzymu *S. cerevisiae*, ludzkiego [77], *E. coli* [78] i *E. gracillis* [79] wykazało obecność kilku fragmentów białka o identycznej sekwencji aminokwasowej [42]. PBG-D z *E. coli* otrzymano w formie krystalicznej i na tym białku wykazano, że kofaktorem enzymu jest dwupirometan — produkt kondensacji dwóch cząsteczek PBG. Zidentyfikowano resztę cysteinową tworząca wiązanie kowalencyjne z kofaktorem. Występuje ona w obrębie sekwencji konserwowanej pomiędzy poznanymi dotychczas deaminami PBG. Sekwencje te przedstawiono poniżej:

enzym ludzki	A	E	R	A	F	L	R	H	L	E	G	G	C	S	V	P
enzym *E. coli*	A	E	R	A	M	N	T	R	L	E	G	G	C	Q	V	P
enzym *E. gracillis*	C	E	R	A	M	N	R	R	L	N	G	G	C	Q	V	P
enzym *S. cerevisiae*	S	E	R	A	L	M	R	T	L	F	G	G	C	S	V	P

Wyizolowanie genu *HEM3* umożliwiło zbadanie regulacji jego ekspresji. Obliczony współczynnik użycia kodonów 0.18, wskazywał na niską ekspresję genu. Do podobnych wniosków prowadziły pomiary aktywności PBG-D. Dotychczasowe wyniki wskazywały, że synteza PG-D jest konstytutywna, niezależna od źródła węgla, ani od hemu, nie jest też indukowana przez substrat, jak to sugerowały Urban-Grimal i Labbe-Bois [37]. Niespodziewanie analiza odcinka promotorowego genu *HEM3* wykazała w pozycji -348 do -341 sekwencję ACCAATAA, homologiczną do sekwencji wiążących kompleks transkrypcyjny HAP 2/3/4 [24]. Sekwencję taką wykryto też w odcinku promotorowym genu *HEM1*. Znaczenie tych sekwencji i sposób regulacji przez czynnik HAP2/3/4 genów koujących ALA-S i PBG-D, przy konstytutwnej lub pozornie konstytutywnej ich ekspresji nie zostały dotychczas wyjaśnione, ale można przypuszczać, iż te same czynniki transkrypcyjne mogą w sposób skoordynowany regulować ekspresję genów, których produkty związane są z metabolizmem tlenu i hemu w komórce. Podobną sytuację obserwuje się w komórkach ssaków. Gen ludzki kodujący PBG-D ma dwa promotory oddalone od siebie o 3000 par zasad. Ich wykorzystywanie jest specyficzne tkankowo. Analiza promotora aktywnego w komórkach erytroidalnych wykazała obecność sekwencji występującej również w promotorze genu kodującego ALA-S-E i genu kodującego β-globinę. Dane te wskazują, że te same czynniki transkrypcyjne koordynują ekspresję grupy genów w czasie erytropoezy [80].

V-4. Syntaza uroporfirynogenu III (URO-S)

Jedyne dane o aktywności URO-S w komórkach drożdży pochodzą z pracy Jordana i Berry [47]. Nie otrzymano mutantów w genie kodującym ten enzym. Dotychczas wyizolowano jedynie cDNA URO-S z wątroby człowieka [82] oraz gen *hemD* z *E. coli* [83] i *B. subtilis* [68]. W odróżnieniu od innych enzymów szlaku, homologia sekwencji pomiędzy URO-S z różnych organizmów jest bardzo mała.

V-5. Dekarboksylaza uroporfirynogenu III. UROD

Wprawdzie poziom aktywności UROD oznaczany w komórkach hodowanych w różnych warunkach nie wskazywał, iż enzym ten odgrywa rolę w regulacji wydajności szlaku, to w badaniach nad biosyntezą hemu w drożdżach szczególnie dużo uwagi poświęcono temu enzymowi. Działo się tak z dwóch względów:

a) U ludzi defekt UROD jest powodem najczęściej występującej porfirii tzw. PCT (Porfiria Cutanea Tarda — porfiria skórna późna). W około 20% przypadków wykazano genetyczne podłoże tej choroby. Uzyskanie mutantów drożdżowych o obniżonej aktywności UROD stworzyło atrakcyjną możliwość poznania molekularnych defektów odpowiedzialnych za dziedziczną formę PCT.

b) Na podstawie badań kinetycznych enzymu nie

http://rcin.org.pl

udało się wyjaśnić mechanizmu reakcji dekarboksylacji uroporfirynogenów III i I. Uzyskanie mutantów o zmienionej aktywności UROD na skutek mutacji w genie struktury i sprawdzenie ich biochemicznych następstw tak *in vivo*, jak i *in vitro* w połączeniu z analizą sekwencyjną alleli *hem12* stanowi podejście metodyczne umożliwiające istotne rozszerzenie informacji o domenach białka szczególnie istotnych dla jego funkcji. Genetyczne i biochemiczne dane otrzymywane w wyniku badania mutantów *hem12* jednoznacznie świadczą, że pojedyńczy enzym katalizuje cztery reakcje dekarboksylacji uroporfirynogenu III i I. Sklonowano i zsekwencjonowano gen kodujący UROD i ustalono sekwencję aminokwasową tego enzymu. Jest to pojedyńczy polipeptyd złożony z 362 aminokwasów. Porównanie sekwencji aminokwasowych UROD drożdży człowieka i szczura wykazało ich znaczną homologię, która nie jest ograniczona do określonych domen lecz występuje w obrębie całej cząsteczki. Enzymy ludzki i szczurzy wykazują 90% homologii aminokwasowej, a homologia z białkiem drożdży wynosi 68% [43]. Duże podobieństwo strukturalne między tymi białkami podkreślają profile ukazujące zdolność do wytwarzania struktur drugorzędowych oraz rozmieszczenie obszarów hydrofobowych. Wartość współczynnika preferencyjnego użycia kodonów równa 0.18 wskazuje na niską ekspresję genu i odpowiada poziomowi UROD w komórce drożdży, który oszacowano na około 0.007% całkowitej ilości białka [84, 85].

W 10 mutantach *hem12* posiadających ograniczoną zdolność do syntezy hemu (zależnie od niesionego allelu *hem12* od 10-60% ilości hemu syntetyzowanego w komórkach szczepu dzikiego) zidentyfikowano pojedyńcze podstawienia aminokwasowe w konserwowanych ewolucyjnie obszarach białka. Konsekwencjami tych mutacji były znaczne różnice w kinetyce nagromadzenia się metabolitów pośrednich oznaczone w reakcji *in vitro*. Poziom poszczególnych metabolitów w komórkach świadczył, że mutanty te syntetyzowały stałą ilość tetrapiroli — mniejszej ilości syntetyzowanego hemu odpowiadała większa ilość akumulowanych porfiryn. Fakt, że nie obserwowano nadprodukcji porfiryn świadczy, iż ich akumulacja w mutantach była wynikiem obniżenia aktywności UROD, a nie zmienionej regulacji szlaku. Analiza składu porfiryn akumulowanych w komórkach i wydzielonych do podłoża nie odzwierciedlała reakcji *in vitro*. Na uwagę zasługuje fakt, że stałość wzorów metabolitów akumulowanych w komórkach mutantów przypomina stałość wzorów porfiryn wydalanych z kałem i moczem ludzi chorych na PCT. Zjawisko to nie zostało dotychczas wyjaśnione. Wyizolowano także mutanty drożdży całkowicie pozbawione aktywności UROD, które akumulowały wyłącznie uroporfirynę. Podobne uszkodzenie w komórkach ssaków byłoby letalne.

Analiza właściwości biochemicznych mutantów wskazuje, że enzym posiada jedno centrum wiążące uroporfirynogen i pośrednie produkty reakcji. Jest ono zarazem centrum katalitycznym enzymu. Ponadto analiza właściwości mutantów pozwala przypuszczać, że domena białka zawierająca aminokwasy 59 (seryna) i 62 (treonina) jest istotna dla rozróżnienia pomiędzy izomerami uroporfirynogenu I i III [47, 43, 85, 86]. W badaniu mutantów o obniżonej aktywności UROD szczególnie interesującym było wykazanie, że możliwe jest powstawanie porfirycznego fenotypu *hem12* w wyniku równoczesnego wystąpienia dwóch mutacji w dwóch genach różnych od genu struktury UROD. Zidentyfikowano dotychczas cztery geny, których produkty wpływają na ekspresję genu *HEM12*. Mutacje w locus nazwanym *UDT1* zmniejszają ilość transkryptu genu *HEM12* (ang. *udt*-UROD *diminished transcript*). Drugiego typu mutacji-*ipa* (ang. *increased porphyrin accumulation*) nie udało się powiązać z wystąpieniem dającego się wyróżnić fenotypu. Otrzymano trzy mutanty typu *ipa*. Każda z mutacji mapuje się w innym locus. Wyniki wykazujące udział innych niż *HEM12* genów w powstawaniu drożdżowej „porfirii", rozszerzają możliwość interpretacji ujawniania się ludzkich porfirii. Wskazują na możliwość specyficznego oddziaływania na ekspresję genu kodującego UROD produktów innych genów. Pozwala to przypuszczać, że pozorny brak dziedziczenia choroby wynika z konieczności „spotkania się" kilku mutacji w różnych genach, aby wystąpiły charakterystyczne objawy PCT. Drożdżowy model powstawania porfirycznego fenotypu nie związanego z uszkodzeniem w locus *HEM12* być może stanowi wyjaśnienie występowania u ludzi tzw. „dziedzicznej predyspozycji" do wystąpienia PCT [85].

V-6. Oksydaza koproporfirynogenu III (COPROX)

Enzym oczyszczono do homogenności i wykazano, że jest on homodimerem złożonym z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej 35 kDa każda. Do swojej akywności nie wymaga żadnego koenzymu. C a m a d r o i w s p. [9] jednoznacznie wykazali, iż drożdżowa COPROX jest enzymem cytoplazmatycznym. Aby wytłumaczyć w jaki sposób lipofilna i reaktywna cząsteczka koproporfirynogenu jest przenoszona przez błony mitochondrialne nie ulegając utlenieniu do koproporfiryny wysunięto hipotezę, że przejściowo COPROX reaguje z błoną mitochondrialną, gdzie dochodzi do kontaktu z kolejnym enzymem szlaku. Potwierdzeniem tej hipotezy jest obserwacja, że *in vitro* aktywność COPROX jest stymulowana poprzez dodanie fosfolipidów do mieszaniny reakcyjnej [9].

Wyizolowano cztery mutanty całkowicie pozbawione aktywności COPROX, a zatem nie syntetyzujące hemu i jednego mutanta o resztkowej aktywności tego enzymu [30, 37, 44]. Mutanty całkowicie pozbawione aktywności COPROX wykorzystano do izolacji, na drodze komplementacji funkcjonalnej, genu struktury

http://rcin.org.pl

tego enzymu [44]. Koduje on polipeptyd zbudowany z 328 aminokwasów. Sekwencja genu *HEM13* jest dotychczas jedyną znaną sekwencją kodującą COPROX. Znaczne wahania w ilości białka enzymu w zależności od warunków hodowli (od 0.005 do 4% całkowitego białka w komórce) świadczą, iż jego synteza zależy od stanu metabolicznego komórki. Ilość białka, a co za tym idzie aktywność COPROX jest zwiększona we wszystkich mutantach *hem*, a także w komórkach hodowanych bez dostępu tlenu. Indukcja zachodzi na poziomie transkrypcji i w zależności od tła genetycznego szczepu jest 10-50-krotna [29, 44]. Analiza odcinka DNA poprzedzającego kodon inicjacyjny wykazała obecność dwóch sekwencji, które być może są odpowiedzialne za wiązanie białek regulatorowych. Na odcinku -531 do -514, bogatym w pary AT, wykryto sekwencję TGTG-N_{10}-CACA, jest ona analogiczna do konserwowanej sekwencji znajdującej się w promotorowych odcinkach wielu genów prokariotycznych w miejscach wiążących multimeryczne białka regulatorowe [87]. Sekwencja CCTGGGATTAC-CGTC, rozpoczynająca się w pozycji -440, wykazuje znaczną homologię z sekwencją *UAS1* [88].

Zwiększona synteza COPROX w odpowiedzi na niskie stężenie tlenu i znaczne powinowactwo tego enzymu do O_2 świadczy, że śladowe ilości tlenu wystarczą do tego aby zaszła synteza hemu w komórkach hodowanych w warunkach anaerobowych. Fizjologiczne znaczenie negatywnej regulacji ekspresji genu *HEM13* przez hem w warunkach tlenowych jest nieznane. Wyniki badań nad regulacyjną rolą hemu wskazują na powiązanie syntezy hemu z syntezą apohemoproteidów poprzez wspólny, zależny od obecności hemu i/lub tlenu, aktywator transkrypcji kodowany przez gen *HAP1* (*CYP1*) [25, 89].

V-7. Oksydaza protoporfirynogenu IX PROTOX

Enzym ten jest stosunkow mało poznany. Sekwencja genu kodującego PROTOX nie została ustalona dla żadnego organizmu. W komórkach drożdży, tak jak i w komórkach wyższych eukariontów, enzym jest umiejscowiony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Oczyszczono enzym z drożdży i otrzymano skierowane przeciw niemu przeciwciała. W wyniku translacji *in vitro* wykrywa się białko większe od oczyszczonego o około 3kDa. Wynik ten wskazuje, że PROTOX jest syntetyzowana w formie prekursorowej, która ulega skróceniu w czasie transportu do mitochondrium. Nie ma dotychczas żadnych danych dotyczących regulacji tego enzymu. Wiadomo tylko, że w komórce enzym funkcjonuje znacznie poniżej Vmax. [4].

V-8. Ferrochelataza FERROC

Aktywność ferrochelatazową w komórkach drożdży wykryli Chaix i Labbe w 1965 r. W kolejnych pracach Labbe i wsp. [90, 91] wykazali, że enzym ten znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dostarczanie protoporfiryny do ferrochelatazy wymaga prawdopodobnie jej bezpośredniego kontaktu z oksydazą protoporfirynogenu. FERROC może włączać do tetrapirolowego pierścienia protoporfiryny-Fe^{++} lub Zn^{++}, powinowactwo do obu tych kationów jest identyczne. Komórki drożdży w fazie stacjonarnej lub inkubowane bez źródła węgla akumulują w błonach mitochondrialnych znaczne ilości Zn-protoporfiryny, co prowadzi do zahamowania funkcji oddechowych mitochondriów. Zn-protoporfiryny powstają w reakcji katalizowanej przez FERROC [91]. Dotychczas nie znany jest sposób transportu żelaza do mitochondriów, jak też systemy metaboliczne utrzymujące żelazo w stanie zredukowanym.

Dostępność mutantów pozbawionych aktywności FERROC pozwoliła na izolację genu struktury tego enzymu (*HEM15*). Koduje on białko zbudowane z 393 aminokwasów. Aminokwasy od met 1 do gln 31 stanowią sekwencję liderową kierującą enzym do mitochondriów [45]. Znana jest również sekwencja aminokwasowa ferrochelatazy ludzkiej [92], mysiej [93], *E. coli* [94], *Bradyrhizobium japonicum* [95], *Bacillus subtilis* [96] i *Arabidopsis* [97]. Homologia sekwencji wynosi 88% pomiędzy białkiem ludzkim i mysim, a 46% pomiędzy białkiem drożdży i ludzkim. Znacznie niższa jest homologia pomiędzy tymi białkami a białkami bakteryjnymi (25%). W obszarach białka o znacznej homologii znajduje się 27 aminokwasów wspólnych dla wszystkich sekwencji, prawdopodobnie odgrywają one szczególną rolę w funkcjonowaniu FRROC (Labbe-Bois dane nie publikowane). Ferrochelatazie przypisuje się szczególną rolę w procesie regulacji syntezy hemu, ze względu na powiązanie funkcji tego enzymu z metabolizmem żelaza. Sugeruje się, że to właśnie poziom jonów Fe^{++} w mitochondriach jest czynnikiem decydującym o stanie *red-ox* komórki, któremu przypisuje się rolę sygnału uruchamiającego system regulujący ekspresję genów zależną od obecności lub braku tlenu [4, 97, 98]. Hipoteza ta wskazuje na ścisły związek badań nad biosyntezą hemu z szeroko pojętym problemem regulacji metabolizmu komórki.

Artykuł otrzymano 1 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 7 czerwca 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Bottomly SS, Muller-Eberhard U (1988) *Semin Hematol* **28**: 282-302
2. Grandchamp B, Nordman Y (1988) *Semin Hematol* **28**: 303-311
3. Jordan PM (1990) W: Dailey HA (red), Biosynthesis of heme and chlorophylls, Mc Grow-Hill Book Co., New York, str 55-122
4. Labbe-Bois R, Labbe P, *ibid* str 235-286
5. Beale SJ, Weinstein JD, *ibid* str 287-381
6. Jahn D, Verkamp E, Soll D (1992) *Trends in Biochem Sci* **17**: 215-218

http://rcin.org.pl

7. Luo J, Lim CK (1990) *Biochem J* **268**: 513-515
8. Lash TD (1991) *Biochem J* **278**: 901-903
9. Camadro JM, Chambon H, Jolles J, Labbe P (1986) *Eur J Biochem* **156**: 579-587
10. Tait GH (1969) *Biochem Biophys Res Commun* **37**: 116-122
11. Jacobs NJ, Jacobs JM (1976) *Biochim Biophys Acta* **449**: 1-9
12. Dumont ME, Ernst JF, Hampsey DM, Sherman F (1987) *EMBO J* **6**: 235-241
13. Zollner A, Rodel G, Haid A (1992) *Eur J Biochem* **207**: 1093-1100
14. Daum G, Bohni PC, Schatz G (1982) *J Biol Chem* **257**: 13028-13033
15. Tamura Y, Yoshida Y, Sato R, Komaoka H (1976) *Arch Biochem Biophys* **175**: 284-294
16. Osumi T, Nishino T, Katsuki H (1979) *J Biochem* **85**: 819-826
17. Aoyama Y, Yoshida Y (1978) *Biochem Biophys Res Commun* **82**: 28-38
18. Hata S, Nishino T, Komori M, Katsuki H (1981) *Biochem Biophys Res Commun* **103**: 272-277
19. Skoneczny M, Chełstowska A, Rytka J (1988) *Eur J Biochem* **174**: 297-302
20. Oshino R, Oshino N, Chance B (1973) *Eur J Biochem* **35**: 23-33
21. Zhu H, Riggs A (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5015-5019
22. Yoshimoto A, Sato R (1970) *Biochim Biophys Acta* **220**: 190-205
23. Guarente L (1987) *Ann Rev Genet* **21**: 425-452
24. Zitomer RS, Lowry CV (1992) *Microbiol Rev* **56**: 1-11
25. Verdiere J, Gaisne M, Labbe-Bois R (1991) *Mol Gen Genet* **228**: 300-306
26. Padmanaban G, Venkateswar V, Rangarajan PN (1989) *Trends Biochem Sci* **14**: 492-496
27. Volland C, Labbe-Bois R, Labbe P (1975) *Biochimie* **57**: 117-120
28. Labbe-Bois R, Volland C (1977) *Arch Biochem Biophys* **179**: 565-577
29. Labbe-Bois R, Brouillet N, Camadro JM, Chambon H, Felix F, Labbe P, Rytka J, Simon M, Urban-Grimal D, Volland C, Zagorec M (1986) W: Nordman Y (red.) Porphyrins and Porphyrias, Colloque INSERM/John Libby Eurotext Ltd **134**: 15-24
30. Biliński T, Litwińska J, Łukaszkiewicz J, Rytka J, Simon M, Labbe-Bois R (1981) *J Gen Microbiol* **122**: 79-87
31. Rytka J, Biliński T, Labbe-Bois R (1984) *Biochem J* **218**: 405-413
32. Mahler HR, Lin CC (1974) *Biochem Biophys Res Commun* **61**: 963-970
33. Biliński T, Litwińska J, Śledziewski A, Rytka J (1980) *Acta Microbiol Polon* **29**: 199-212
34. Granick S, Sinclair P, Sassa S, Grieninger G (1975) *J Biol Chem* **250**: 9215-9225
35. Ibrachim NG, Gruenspecht NR, Freedman ML (1978) *Biochem Biophys Res Commun* **80**: 722-728
36. Hayashi N, Watanabe N, Kikuchi C (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **115**: 700-706
37. Urban-Grimal D, Labbe-Bois R (1981) *Mol Gen Genet* **183**: 85-92
38. Tsai SF, Bishop DF, Desnick RJ (1987) *J Biol Chem* **263**: 1256-1265
39. Smith A (1990) W: Dailey HA (red) Biosynthesis of heme and chlorophylls, Mc Grow-Hill Book Co., New York, str 435-484
40. Urban-Grimal D, Volland C, Garnier T, Dehoux P, Labbe-Bois R (1986) *Eur J Biochem* **156**: 511-519
41. Meyers AM, Crivellone MD, Koerner TJ, Tzagaloff A (1987) *J Biol Chem* **262**: 16822-16829
42. Keng T, Richard C, Larocque R (1992) *Mol Gen Genet* **234**: 233-243
43. Garey JR, Labbe-Bois R, Chełstowska A, Rytka J, Harrison L, Kushner J, Labbe P (1992) *Eur J Biochem* **205**: 1011-1016
44. Zagorec M, Buhler J-M, Treich I, Keng T, Guarente L, Labbe-Bois R (1988) *J Biol Chem* **265**: 9718-9724
45. Labbe-Bois R (1990) *J Biol Chem* **265**: 7278-7283
46. Kurlandzka A, Rytka J (1985) *J Gen Microbiol* **131**: 2909-2918
47. Kurlandzka A, Żołądek T, Rytka J, Labbe-Bois R, Urban-Grimal D (1988) *Biochem J* **253**: 109-116
48. Labbe P (1971) *Biochimie* **53**: 1001-1014
49. Jayaraman J, Padmanaban G, Malathi K, Sarma PS (1971) *Biochem J* **121**: 531-535
50. Porra RJ, Irving EA, Tennick AM (1972) *Arch Biochem Biophys* **148**: 37-43
51. Gollub EG, Liu KP, Dayan L, Adlersberg M, Sprinson DB (1977) *J Biol Chem* **252**: 2846-2854
52. Labbe-Bois R, Rytka J, Litwińska J, Biliński T (1977) *Mol Gen Genet* **156**: 177-183
53. Woods RA, Sanders HK, Briquet M, Foury F, Drysdale BE, Matoon JR (1975) *J Biol Chem* **250**: 9090-9098
54. Bard M, Ingolia TD (1984) *Gene* **28**: 195-199
55. Keng T, Alani E, Guarente L (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 355-364
56. Keng T, Guarente L (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 9113-9117
57. Riddle RD, Yamamoto M, Engel JD (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 792-796
58. Cox TC, Bawden MJ, Martin A, May BK (1991) *EMBO J* **10**: 1891-1902
59. Schoenhaut DS, Curtis PJ (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 7013-7027
60. Dierks P (1990) W: Dailey HA (red) Biosynthesis of heme and chlorophylls, Mc Grow-Hill Book Co. New York str 201-234
61. Fujita H, Yamamoto M, Yamagami T, Hayashi N, Bishop TR, de Verneuil H, Yoshinaga T, Shibahara S, Morimoto R, Sassa S (1991) *Biochem Biophys Acta* **1090**: 311-316
62. Labbe-Bois R, Simon M, Rytka J, Litwińska J, Biliński T (1980) *Biochem Biophys Res Commun* **95**: 1357-1363
63. Matoon JR, Malamud DR, Brunner A, Braz G, Carjaval E, Lancashire WE, Panek AD (1978) W: Bacila M, Horecker BL, Stoppani AOM (red) Biochemistry and Genetics of Yeast, Pure and Applied Aspects Academic Press str 317-337
64. De Barreiro OLC (1967) *Biochim Biophys Acta* **139**: 479-486
65. Bard M, Woods RA, Haslam JM (1974) *Biochem Biophys Res Commun* **56**: 324-330
66. Karst F, Lacroute F (1973) *Biochem Biophys Res Commun* **52**: 741-747
67. Echelard Y, Demetryszyn J, Drolet M, Sasarman A (1988) *Mol Gen Genet* **214**: 503-508
68. Hansson M, Rutberg L, Schroeder L, Hederstedt L (1991) *J Bacteriol* **173**: 2590-2599
69. Wetmur JG, Bishop DF, Cantelmo C, Desnick RJ (1991) *Am J Hum Gen* **49**: 757-783
70. Bishop TR, Frelin LP, Boyer SH (1986) *Nucl Acids Res* **14**: 10115
71. Borralho LM, Panek AD, Malmud DR, Sanders HK, Matoon JR (1983) *J Bacteriol* **156**: 141-147
72. Higuchi M, Bogorad L (1975) *Ann NY Acad Sci* **244**: 401-418
73. Jordan PM, Thomas SD, Warren MJ (1988) *Biochem J* **254**: 427-435
74. Jordan PM, Shemin D (1973) *J Biol Chem* **248**: 1019-1024
75. Williams DC, Morgan GS, McDonald E, Battersby R (1981) *Biochem J* **193**: 301-310
76. Anderson PM, Desnick RJ (1980) *J Biol Chem* **255**: 1993-1999
77. Raich N, Romeo PH, Dubart A, Beaupain D, Cohen-Solai M, Goossens M (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 5955-5968
78. Thomas SD, Jordan PM (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 6215-6226

http://rcin.org.pl

79. Sharif AL, Smith AG, Abell C (1989) *Eur J Biochem* **184**: 353-359
80. Felix O, Mignotte V, Wall L, de Boer E, Grosveld F, Romeo PH (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 37-54
81. Jordan PM, Berry A (1980) *FEBS Lett* **112**: 86-88
82. Tsai SF, Bishop DF, Desnick RJ (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7049-7053
83. Sasarman A, Nepveu A, Echelard Y, Demetryszyn J, Drolet M, Goyer C (1987) *J Bacteriol* **169**: 4257-4262
84. Felix F, Brouillet N (1990) *Eur J Biochem* **188**: 393-403
85. Chełstowska A (1993) Praca Doktorska IBB PAN
86. Chełstowska A, Żołądek T, Garey J, Kushner J, Rytka J, Labbe-Bois R (1992) *Biochem J* **288**: 753-757
87. Gicquel-Sanzy B, Cossart P (1982) *EMBO J* **1**: 591-595
88. Lalonde B, Arcangioli B, Guarente L (1987) *Cell* **49**: 9-18
89. Creusot F, Verdiere J, Gaisne M, Słonimski P (1988) *J Mol Biol* **204**: 263-276
90. Labbe P, Volland C, Chaix P (1968) *Biochim Biophys Acta* **159**: 527-559
91. Camadro JM, Labbe P (1982) *Biochim Biophys Acta* **707**: 280-288
92. Nakahashi Y, Taketani S, Sameshima Y, Tokunaga R (1990) *Biochim Biophys Acta* **1037**: 321-327
93. Taketani S, Nakahashi Y, Osumi T, Tokunaga R (1990) *J Biol Chem* **265**: 19377-19380
94. Miyamoto K, Nakahigahi K, Nishimura K, Inokuchi H (1991) *J Mol Biol* **219**: 393-398
95. Frustaci JM, O'Brian MR (1992) *J Bacteriol* **174**: 4223-4229
96. Hansson M, Hederstedt L (1992) *J Bacteriol* **174**: 8081-8093
97. Demple B (1991) *Ann Rev Genet* **25**: 315-337
98. Lin ECC, Iuchi S (1991) *Ann Rev Genet* **25**: 361-387
99. Oeschner U, Hannes H, Zollner A, Haid A, Bandlow W (1992) *Mol Gen Genet* **232**: 447-459
100. Ohashi A, Gibson J, Gregor J, Schatz G (1982) *J Biol Chem* **257**: 13042-13047
101. Saltzgaber-Muller J, Schatz G (1978) *J Biol Chem* **253**: 305-310
102. Hamilton B, Hofbauer R, Ruis H (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 7609-7613

Wykorzystanie mutantów drożdży do badania wspólnego szlaku biosyntezy dolicholi, steroli i ubichinonów

Yeast mutants as a tool in the investigations of common biosynthetic pathway of dolichols, sterols and ubiquinones

ANNA SZKOPIŃSKA*

Spis treści:

I. Wstęp
II. Acetoacetylo-CoA tiolaza
III. Syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA
IV. Reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA
V. Kinaza kwasu mewalonowego
VI. Kinaza fosfomewalonianu
VII. Dekarboksylaza pirofosfomewaloninu
VIII. Izomeraza pirofosforanu izopentenylu
IX. Syntaza pirofosforanu farnezylu
X. Cis-prenyltransferaza
XI. α-saturaza
XII. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. Acetoacetyl-CoA
III. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase
IV. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
V. Mevalonate kinase
VI. Phosphomevalonate kinase
VII. Mevalonate pyrophosphate decarboxylase
VIII. Isopentenyl pyrophosphate isomerase
IX. Farnesyl pyrophosphate synthase
X. Cis-prenyltransferase
XI. α-saturase
XII. Concluding remarks

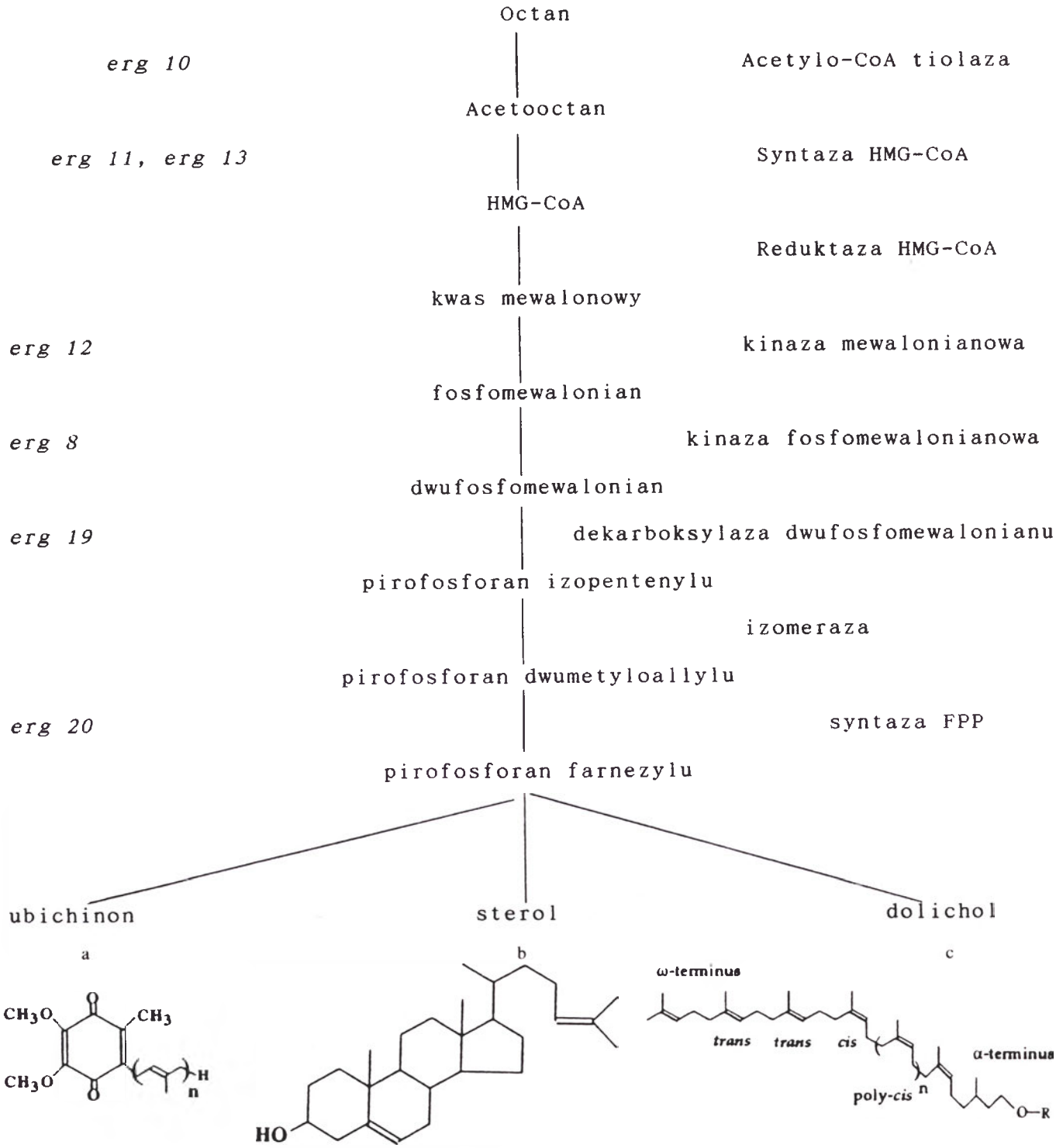
Wykaz stosowanych skrótów: HMG-CoA — 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A; FPP — dwufosforan farnezylu; LDL — lipoproteiny o niskiej gęstości; NADPH — fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma zredukowana); ER — retikulum endoplazmatyczne; ATP — adenozynotrójfosforan; DMAPP — dwufosforan dwumetyloallylu; GPP — dwufosforan geranylu; GGPP — dwufosforan geranylogeranylu; NADH — dwunukleotyd nikotynamidoadenilowy (forma zredukowana)

* dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5A

http://rcin.org.pl

I. Wstęp

Biosynteza pochodnych kwasu mewalonowego (Ryc. 1) stanowi złożony łańcuch reakcji, w wyniku wanymi przez nadtlenki. Sterole stanowią element strukturalny błon biologicznych, regulując ich stabilność i przepuszczalność. W organizmach eukariotycznych są składnikami lipoprotein oraz służą do syntez hormonów steroidowych i kwasów żółciowych. Doli-



Ryc. 1. Wspólny szlak syntezy a) ubichinonu, b) sterolu, c) dolicholu, n — oznacza ilość reszt izoprenowych

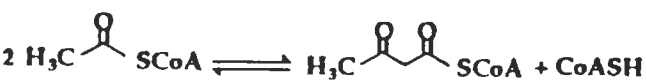
których powstają związki o całkowicie różnych funkcjach fizjologicznych. Głównymi produktami końcowymi są ubichinony, sterole i dolichole. Ubichinony, jako przenośniki elektronów w łańcuchu oddechowym w mitochondriach zaangażowane są w wytwarzanie energii. Są również endogennymi antyoksydantami chroniącymi komórkę przed uszkodzeniami powodochole w swej ufosforylowanej postaci są kofaktorami w biosyntezie glikoprotein oraz kotwic fosfatydyloinozytolowych. W formie wolnej mogą brać udział w fuzji błon. Wymienione tu tylko najważniejsze funkcje poszczególnych produktów końcowych wspólnego ciągu metabolicznego w pełni tłumaczą olbrzymi wysiłek włożony w poznanie struktury, lokalizacji i charak-

http://rcin.org.pl

terystykę poszczególnych związków i enzymów, będących jego strukturalnymi i funkcjonalnymi etapami. Większość badań przeprowadzona była na materiale zwierzęcym (wątroba szczura lub zwierzęce linie komórkowe) [1]. Od pewnego czasu jednak drożdże, a szczególnie *Saccharomyces cerevisiae* stały się obiektem badań. Zadecydowały o tym identyczność szlaków metabolicznych z tymi występującymi w organizmach wyższych, kompartmentalizacja wewnątrzkomórkowa, możliwość izolowania bezwarunkowych i warunkowych mutantów z defektami metabolicznymi omawianego szlaku. W ostatnich latach otrzymano szereg auksotroficznych ergosterolowych mutantów zablokowanych w określonych enzymach tworzących wspólny łańcuch reakcji. Dostarczyły one informacji nie tylko o specyficzności poszczególnych intermediatów izoprenoidowych, ale również pozwoliły określić ich rolę i plejotropowy wpływ na metabolizm komórki.

II. Acetoacetylo-CoA tiolaza

Acetoacetylo-CoA tiolaza katalizuje odwracalną kondensację dwóch cząsteczek acetylo-CoA do acetoacetylo-CoA (Ryc. 2). Stwierdzono różną lokalizację



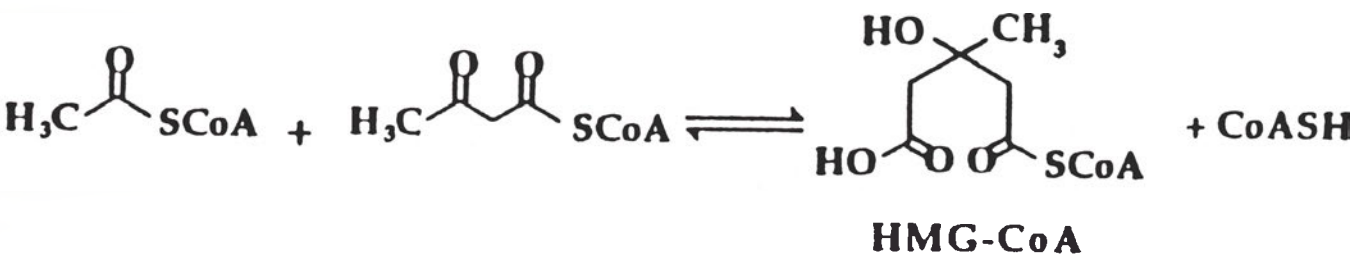
Ryc. 2. Synteza acetoacetylo-CoA z dwóch cząsteczek acetylo-CoA

subkomórkową tego enzymu. Enzym występujący w cytoplazmie bierze udział w syntezie związków izoprenoidowych [2] w mitochondriach, w syntezie intermediatów związków ketonowych [3]. Natomiast tiolaza występująca w peroksysomach jest zaangażowana w β-oksydację kwasów tłuszczowych. Ostatnio wykazano, że enzym peroksysomalny z wątroby szczura może również katalizować reakcje kondensacji, a więc bierze udział w syntezie poliizoprenoidów [4]. Kornblatt i Rudney oczyścili z drożdży dwie formy tiolazy acetylo-CoA. Jedna o masie cząsteczkowej 65000 występuje w mitochondriach druga o masie cząsteczkowej 140000 zlokalizowana została w cytoplazmie [5].

Termowrażliwy mutant o obniżonej aktywności tiolazy acetoacetylo-CoA, *erg 10*, został po raz pierwszy opisany przez Karsta i wsp. [6]. Pozwoliło to na bliższe scharakteryzowanie enzymu. Niezdolność tego mutanta do wzrostu w warunkach niepermisyjnych nawet w obecności wysokich stężeń mewalonianu sugeruje fizjologiczną rolę acetoacetylo-CoA dla wzrostu komórek drożdżowych lub na funkcję tiolazy nie związaną ze szlakiem sterolowym.

III. Syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA

Syntaza HMG-CoA katalizuje reakcje przyłączenia acetoacetylo-CoA do acetylo-CoA tworząc HMG-CoA (Ryc. 3). Enzym ten występuje w mitochondriach i cytoplazmie. Drożdżowa HMG-CoA syntaza oczyszczona przez Middletona i Tubbsa ma masę cząsteczkową 130000 [7]. Wyizlowano drożdżowe mutanty o obniżonej aktywności syntazy HMG-CoA (*erg 11* i *erg 13*). Analiza genetyczna wykazała, że mutacje dotyczą dwóch różnych, niesprzężonych ze sobą genów. Wynik ten sugeruje, że syntaza ma strukturę oligometryczną z przynajmniej dwoma różnymi łańcuchami polipeptydowymi. Fakt, że obniżenie aktywności syntazy prowadzi do auksotrofii ergosterolowej dowodzi, że u drożdży HMG-CoA nie może pochodzić z innych szlaków biosyntetycznych ani z degradacji aminokwasów. W ściśle beztlenowych warunkach wzrostu drożdże wymagają dodania do podłoża ergoserolu i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Tlen jest niezbędny w reakcjach oksydacyjnej desaturacji kwasów tłuszczowych i steroli oraz oksydacyjnej demetylacji lanosterolu. W anaerobiozie obserwowano słaby wzrost mutantów o obniżonej aktywności syntazy HMG-CoA nawet w obecności ergosterolu i nienasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast dodanie do pożywki kwasu mewalonowego przywracało wzrost podobny do wzrostu szczepu dzikiego [6]. Gil i wsp. sklonowali gen kodujący HMG-CoA syntazę w komórkach UT-1 (linia komórek z jajników chomika, o znacznie podwyższonej ilości reduktazy HMG-CoA, co pozwala na wzrost komórek w obecności kompaktyny) [8]. Wykazali oni, że nie podlegający translacji rejon 5' tego genu zawiera dwie kopie sekwencji największej zgodności (consensus sequence) 5'-CACCCCAC-3'. Sekwencja ta określana jest jako element regulacyjny sterol-1 (sterol regulatory element-1) obecna jest w zmiennych ilościach kopii w rejonach promotorów przynajmniej trzech innych białek biorących udział w syntezie izoprenoidów, tj reduktazy HMG-CoA, receptora



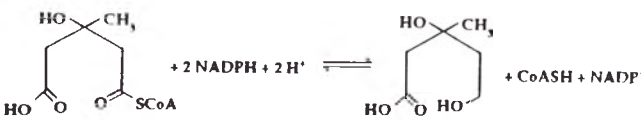
Ryc. 3. Tworzenie 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA przez przyłączenie cząsteczki acetylo-CoA do cząsteczki acetoacetylo CoA

http://rcin.org.pl

LDL i syntazy FPP [9]. Wyniki te wskazują na koordynacyjną regulację enzymów szlaku biosyntezy izoprenoidów.

IV. Reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA

Reduktaza HMG-CoA katalizuje dwustopniową redukcję hydroksymetyloglutarylo-CoA do kwasu mewalonowego (Ryc. 4). Czynnikiem redukującym jest



Ryc. 4. Redukcja HMG-CoA do kwasu mewalonowego

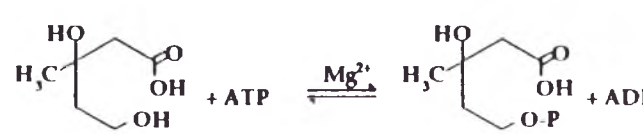
NADPH. Początkowo obecność enzymu stwierdzono u ssaków w endoplazmatycznym retikulum (ER) [10]. Późniejsze prace wykazały jego obecność również w peroksysomach wątroby szczura [11]. Rola HMG-CoA reduktazy jako głównego czynnika regulującego biosyntezę cholesterolu została bardzo dobrze udokumentowana. Jednakże jego wpływ na regulację syntezy nie-sterolowych związków jest mniej jasny [12]. Enzym z komórek linii UT-1 (komórki z jajników chomika) został oczyszczony przez C h i n a i w s p. Wykazali oni, że składa się z 887 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 97000 [13]. Badania komputerowe i dane proteolityczne sugerują obecność trzech domen w HMG-CoA reduktazie: wysoce konserwowanego N-końca, hydrofobowego odcinka składającego się z 8 fragmentów przechodzących przez błonę gładkiego ER [14], mniej konserwowanego odcinka łączącego fragmenty przechodzące przez błonę ER oraz wysoce konserwowanego C-końca, domeny katalitycznej stanowiącej 2/3 białka, znajdującej się po stronie cytoplazmatycznej. Do tej pory nie wiadomo dlaczego reduktaza ma tyle fragmentów przechodzących przez błonę. Przypuszcza się, że odcinki błonowe mają związek z regulacyjną degradacją białka w endoplazmatycznym retikulum [15]. HMG-CoA reduktaza podobnie jak HMG-CoA syntaza i FPP syntaza ma sekwencję najwyższej zgodności (ang. *consensus sequence*) 5'-CACCCCAC-3' o której sądzi się, że jest zaangażowana w zależną od sterolu regulację transkrypcji tych genów (sterol regulatory element-1, SRE-1). Znanym czynnikiem mogącym regulować aktywność HMG-CoA reduktazy *in vitro* jest fosforylacja białka [16] i zmiany płynności błony mikrosomalnej powodowanej przez sterole [17]. Uważa się, że fosforylacja (inaktywacja) i defosforylacja (aktywacja) mogą powodować szybkie, odwracalne zmiany aktywności HMG-CoA reduktazy. Rozważana jest również możliwość, że fosforylacja reduktazy może przyspieszać degradację enzymu przez zwiększenie jego podatności na proteolizę [18].

W drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano dwa strukturalne geny kodujące glikozylowane izomery reduktazy HMG-CoA, zlokalizowane w ER [19]. Krótkie odcinki homologii między białkiem z chomika i drożdży sugerują, że tylko C-końcowa domena katalityczna jest konserwowana. Do tej pory nie jest jasne dlaczego w drożdżach, inaczej niż u chomika, występują dwa geny kodujące HMG-CoA reduktazę. Możliwe, że bardziej złożona regulacja reduktazy u ssaków jest kompensowana u drożdży przez obecność *HMG1* i *HMG2* reagujących na różne zapotrzebowania komórki. Homlogia pomiędzy N-końcowymi fragmentami obu drożdżowych białek jest mała, natomiast sekwencje C-końca odpowiadające za aktywność katalityczną białek są bardzo podobne.

Ciekawe, że produkt każdego z genów, niezależnie od warunków hodowli drożdży, jest wystarczający dla życia komórki drożdżowej [20]. Dopiero delecja obu genów jest dla komórki drożdżowej letalna. Badania R i n e i w s p. wykazały, że ekspresja *HMG1* jest stymulowana przez hem, podczas gdy ekspresja *HMG2* podlega represji hemowej [21]. Różna regulacja obu izoenzymów stwarza możliwość, że sytetyzowany przez nie mewalonian nie jest równocennie dostępny dla kolejnych enzymów szlaku biosyntetycznego. Dwa niesterolowe produkty: ubichinon biorący udział w transporcie elektronów i boczny łańcuch hemu a, kofaktor oksydazy cytochromu c są pochodnymi pirofosforanu farnezylu. Zapotrzebowanie na oba te związki jest większe, gdy drożdże hodowane są w warunkach tlenowych, przy wyższym poziomie hemu. Możliwe, że ekspresja genów *HMG1* i *HMG2* zależna jest od różnego zapotrzebowania na końcowe produkty szlaku biosyntetycznego.

V. Kinaza kwasu mewalonowego

Kinaza kwasu mewalonowego katalizuje reakcję fosforylacji mewalonianu używając ATP jako donora fosforanu w obecności jonów Mg (Ryc. 5). Mutanty



Ryc. 5. Fosforylacja mewalonianu

drożdżowe o zmniejszonej aktywności kinazy kwasu mewalonowego *erg 12* zostały opisane przez K a r s t a i L a c r o u t a już w 1977 roku [22]. Bardziej szczegółowe badania [6] wykazały, że mutanty zablokowane po syntezie kwasu mewalonowego, (patrz schemat) między innymi *erg 12*, *erg 8* w obecności ergosterolu i nienasyconych kwasów tłuszczowych wykazują (w przeciwieństwie do mutantów defektywnych we wcześniejszych etapach szlaku biosyntetycznego *erg 10*, *11*, *13*) wzrost zbliżony do wzrostu szczepu dzikiego. Możliwość zastosowania wymienionych mutantów drożdżowych pozwoliła na wykazanie specyficznej roli

http://rcin.org.pl

niektórych intermediatów izoprenoidowych nie tylko w syntezie steroli ale w ogólnym metabolizmie komórki. Kinaza kwasu mewalonowego została oczyszczona z frakcji cytoplazmatycznej [23] a także wykazano obecność tego enzymu w peroksysomach otrzymanych z wątroby szczura [24].

Tanaka i wsp. otrzymali cDNA kodujące białko o 395 aminokwasach i masie cząsteczkowej 42000 [25], co pozostaje w zgodności z masą cząsteczkową oczyszczonego przez nich białka. Sekwencja aminokwasowa kinnazy mewałonianowej ma motyw charakterystyczny dla miejsca wiążącego ATP występujący w kilku innych kinazach białkowych.

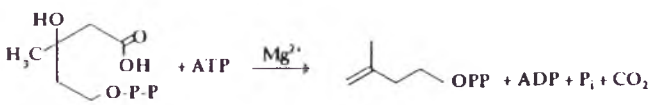
VI. Kinaza fosfomewalonianu

Kinaza fosfomewalonianu katalizuje reakcję fosforylacji fosforanu mewalonianu w obecności jonów Mg (Ryc. 6). Enzym ten podlega tym samym regulacjom co kinaza kwasu mewalonowego. Podobnie jak dla kinazy kwasu mewalonowego Karst i Lacroute otrzymali termowrażliwego, auksotroficznego pod względem ergosterolu mutanta uszkodzonego w kinazie fosfomewalonianu [22].

Ryc. 6. Synteza pirofosfomewalonianu

VII. Dekarboksylaza dwufosfomewalonianu

Dekarboksylaza pirofosfomewalonianu katalizuje przy pomocy ATP dekarboksylację pirofosfomewalonianu do pirofosforanu izopentenylu (Ryc. 7). Po raz

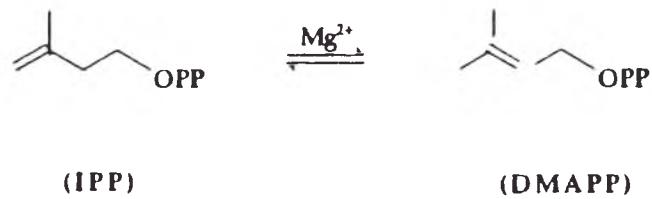


Ryc. 7. Dekarboksylacja pirofosfomewalonianu z utworzeniem pirofosforanu izopentenylu

pierwszy enzym został oczyszczony z drożdży z frakcji cytoplazmatycznej przez Blocha i wsp. w 1959 r. [26]. Badania nad dekarboksylazą otrzymaną z innych źródeł wskazują, że enzym podlega wspólnej regulacji z pozostałymi enzymami szlaku biosyntetycznego. Karst i wsp. otrzymali mutantanta, *erg 19*, wymagającego do wzrostu ergosterolu. Mutant ten charakteryzuje się akumulacją prekursora tj. dwufosforanu mewalonianu i wyraźnie, bo aż 36 krotnie obniżoną aktywnością dekarboksylazy dwufosfomewalonianu [27].

VIII. Izomeraza dwusfosforanu izopentenylu

Izomeraza dwufosforanu izopentenylu katalizuje izomeryzację pirofosforanu izopentenylu do dwumetyloallylopirofosforanu (Ryc. 8). Jest to enzym głównie



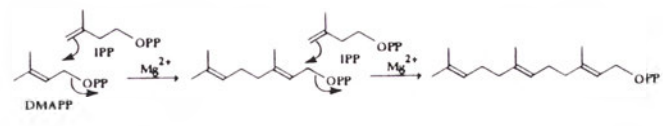
Ryc. 8. Odwracalna izomeryzacja pirofosforanu izopentenylu do pirofosforanu dwumetyloallylu

związany z frakcją cytoplazmatyczną, wymaga obecności jonów Mg i Mn [28]. W najnowszych pracach wykazano obecność enzymu również w mitochondriach i peroksysomach z wątroby szczura [29].

Ze względu na to, że zarówno substrat jak i produkt są używane przez kolejne enzymy szlaku metabolicznego, izomeraza jest centralnym punktem tego szlaku. Mimo to jest niewiele danych dotyczących jej regulacji. DMAPP jest substratem nie tylko w syntezie izoprenoidów lecz również w izopentenylacji tRNA [30]. Uważa się, że izopentenylacja tRNA zawierającego urydynę jako pierwszą zasadę antykodonu stabilizuje oddziaływania kodon-antykodon zmniejszając w ten sposób prawdopodobieństwo błędnego odczytu mRNA [31]. Ponadto wolna izopentenylowana adenozyna działa jako cytokinina w roślinach i drożdżach [32].

IX. Syntaza dwufosforanu farnezylu

Pirofosforan farnezylu jest punktem rozgałęzienia wspólnego szlaku metabolicznego steroli, dolicholi, hemu a, ubichinonów i izoprenylowanych białek. Syntaza FPP katalizuje 1'-4 kondensację dwufosforanu izopentenylu z dwufosforanem dwumetyloallylu oraz dwufosforanem geranylu tworząc pirofosforan farnezylu (Ryc. 9). Przyjmuje się, że naturalnym substratem w formie reszty allylowej jest DMAPP a GPP jest tylko związkiem przejściowym w tej reakcji [33, 34].



Ryc. 9. Synteza pirofosforanu farnezylu przez kondensację DMAPP z IPP z utworzeniem przejściowego związku GPP

Ze względu na swoją centralną pozycję enzym ten był intensywnie badany w wielu laboratoriach. Wyniki tych badań pozwoliły na stwierdzenie, że występuje on głównie w cytoplazmie [28, 33] aczkolwiek ostatnie badania wykazały jego obecność również w mitochondriach i peroksysomach wątroby szczura [35, 36].

http://rcin.org.pl

Fakt, że wszystkie kolejne enzymy biorące udział w syntezie dolicholi (*cis*-prenyltransferaza), steroli (syntetaza skwalenu) i ubichinonów (*trans*-prenyltransferaza) związane są z błonami powoduje, że syntaza FPP, występująca zarówno w cytoplazmie jak i w błonach, jest szczególnie interesującym enzymem pod względem możliwości badań oddziaływań z enzymami związanymi z błonami.

Mechanizm i stereochemia reakcji kondensacji 1'-4 zostały dobrze poznane [28, 33, 38, 39]. Enzym biorący udział w tej reakcji składa się z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej około 39000. Każda podjednostka ma jedno miejsce wiążące resztę allylową i jedno wiążące resztę homoallylową. Reakcja wymaga obecności jonów Mg oraz Mn. Porównanie sekwencji aminokwasowych FPP u szczura, człowieka i drożdży pozwoliło na wykrycie czterech konserwatywnych sekwencji. Dwie z nich charakteryzują się powtórzeniami odcinków bogatych w kwas asparaginowy [40], trzecia zawiera miejsce katalityczne peptydu, czwarta zlokalizowana na C-końcu bogata jest w aminokwasy zasadowe. Jedna z sekwencji o dużej zawartości kwasu asparaginowego (domena II) uważana jest za miejsce wiążące resztę allylową. Spekuluje się, że zasadowa C-końcowa sekwencja zaangażowana jest w oddziaływania z negatywnie naładowaną powierzchnią endoplazmatycznego retikulum.

W 1989 r. Anderson i wsp. podjęli próbę izolacji genu strukturalnego syntazy FPP z *Saccharomyces cerevisiae*. Oczyścili oni syntazę z ekstraktu drożdżowego a następnie na podstawie sekwencji terminalnej N-końca skonstruowali sondę oligonukleotydową przy pomocy której przejrzeli drożdżową bibliotekę DNA znajdując sekwencję komplementarną [41].

Otrzymanie termowrażliwego mutanta ergosterolowego *erg 20-2* pozwoliło na izolację genu *ERG 20*, kodującego syntazę FPP, metodą komplementacji funkcjonalnej [42].

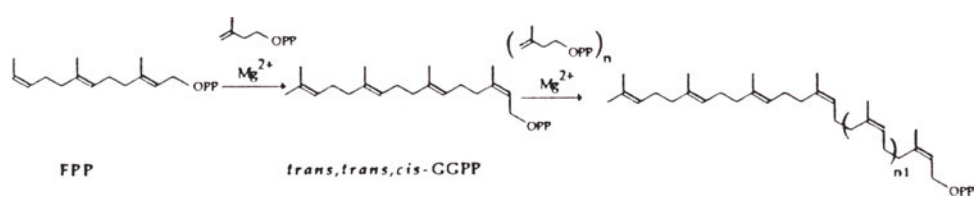
Karst i Blanchard [43] wykazali, że dysrupcja genu *ERG 20* jest letalna dla drożdży. Dodanie egzogennych steroli nie odwraca efektu tej delecji. Pozwoliło to wnioskować, że żadna inna prenyltransferaza nie jest zdolna do syntezy FPP. Wyniki te dokumentują, że produkty syntazy FPP: FPP lub GPP, są niezbędne dla wzrostu drożdży niezależnie od syntezy steroli. Może to być związane z brakiem syntezy dolicholi lub bezpośrednio FPP niezbędnego do prenylacji białek.

X. Cis-prenyltransferaza

Cis-prenyltransferaza katalizuje kondensację 1'-4 dwufosforanu izopentenylu w konfiguracji *cis* z dwufosforanem farnezylu ze wszystkimi resztami izoprenoidowymi w pozycji *trans* (Ryc. 10). Produktem końcowym kolejnych kondenacji jest prawdopodobnie długołańcuchowy pirofosforan poliprenylu [44-46].

Jest rzeczą ciekawą, że dotychczas nawet częściowo nie oczyszczono enzymu (lub grupy enzymów) biorących udział w reakcjach prowadzących do wydłużenia łańcucha poliprenylowego u eukariontów. Co więcej, nie znane są przyczyny powstawania rodziny pirofosoforanów poliprenoli o różnych długościach łańcucha. Subkomórkowa lokalizacja aktywności *cis*-prenyltransferazy wskazuje na obecność enzymu w mikrosomach, we frakcji jądrowej i mitochondrialno-lizosomalnej, ale może również występować w niewielkich ilościach w cytoplazmie. Enzym wykazuje dość szeroką specyficzność substratową rozpoznając GPP, FPP czy *trans*-GGPP jako substrat allylowy. Ciekawe jest również, że niezależnie od badanego obiektu produkt reakcji *in vitro* (poliprenylPP) jest zwykle o jedną-dwie reszty izoprenowe krótszy niż naturalnie występujący w danej komórce. Praca Ericssona i wsp. [47] wykazała, że gdy inkubacje przeprowadzane są w obecności białka przenoszącego sterol, sterol 2 (sterol carrier protein 2, SCP2) długość produktu *cis*-prenyltransferazy jest taka sama jak ta obserwowana dla dolicholowych pochodnych występujących *in vivo*.

Cis-prenyltransferaza z *Saccharomyces cerevisiae* została częściowo scharakteryzowana przez Adaira i Cafmeyer [48]. Wykazali oni, że pod wieloma względami enzym ten nie różni się od *cis*-prenyltransferazy obecnej w wątrobie szczura czy w kurzych jajowodach. Jest głównie związany z błonami lecz około 25% jego aktywności odzyskuje się we frakcji cytoplazmatycznej. Obie formy enzymu mają tą samą specyficzność substratową, produkt syntezy *in vitro* jest o 2 reszty izoprenowe krótszy od naturalnie występujących w pochodnych dolicholowych. Allylowym substratem jest głównie FPP. Cechuje go duża wrażliwość na detergenty, w czym bardzo przypomina swój odpowiednik w peroksysomach wątroby szczura [36]. Jak do tej pory nie wyizolowano mutantów o zmienionej aktywności *cis*-prenyltransferazy w drożdżach.



Ryc. 10. Synteza pirofosforanu poliprenylu przez *cis*-prenyltransferazę

http://rcin.org.pl

XI. α-saturaza

Dolichole służące jako intermediaty w procesie glikozylacji białek mają nasycone wiązanie podwójne w reszcie α. Produktem *cis*-prenyltransferazy jest dwufosforan poliprenylu, posiadający nienasycone wiązanie podwójne w reszcie α. Wobec tego musi istnieć enzym przekształcający poliprenol w dolichol. Jak do tej pory jedynymi badaczami, którym udało się wykazać *in vitro* w wątrobie szczura powstawanie dolicholu są Ekstrom i wsp. [48]. Badania ich wykazały zależność enzymu od NADH. Są sprzeczne doniesienia dotyczące tego, czy substratem α-saturazy musi być wolna czy ufosforylowana forma poliprenolu. Jak dotąd nie ma danych literaturowych charakteryzujących drożdżową α-saturazę.

XII. Uwagi końcowe

Ze względu na łatwość hodowli, podobnie do większości bakterii, *S. cerevisiae* służyły przez dziesięciolecia do badań klasycznej genetyki. Ostatnio, dzięki dynamicznemu rozwojowi inżynierii genetycznej i biologii molekularnej możliwe jest wyizolowanie praktycznie każdego genu zidentyfikowanego wcześniej poprzez mutację. Osiągnięcia te w połączeniu z technikami umożliwiającymi klonowanie genów, których produkty zostały oczyszczone spowodowały lawinowy wzrost ilości wyizolowanych strukturalnych i regulatorowych genów w drożdżach. Biorąc pod uwagę podobieństwo podstawowych szlaków metabolicznych w drożdżach do tych jakie występują w organizmach wyższych i kompartmentalizację wewnątrzkomórkową można stwierdzić, że drożdże są wyjątkowo dogodnym narzędziem do badań dowolnie wybranych szlaków biosyntetycznych.

Artykuł otrzymano 1 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 7 czerwca 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Rothstein R J, (1983) *Methods Enzyol* **101 C**: 202-211
2. Schroepfer G (1981) *Annual Rev Biochem* **50**: 585-621
3. Middelton B (1973) *Biochem J* **132**: 717-730
4. Thompson S, Krisans S (1990) *J Biol Chem* **264**: 5731-5735
5. Kornblatt J, Rudney H (1971) *J Biol Chem* **246**: 4417-4423, 4424-4430
6. Servouse M Mons N, Baillargeat J-L, Karst F (1984) *Bioch Biol Res Com* **123**: 424-430
7. Middleton B, Tubbs P (1972) *Biochem J* **126**: 27-34
8. Gil G, Brown M, Goldstein J (1986) *J Biol Chem* **261**: 3717-3724
9. Spear D, Kutsunai S, Corell C, Edwards P (1992) *J Biol Chem* **267** 14462-14469
10. Liscum L, Cummings R, Anderson R, De Martino G, Goldstein J, Brown M (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 7165-7169
11. Keller G, Barton M, Shapiro D, Singer S (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 770-774
12. Panini S, Rogers D, Rudney H (1985) W: In regulation of HMG-CoA reductase. (B. Preiss, ed) Academic Press. Inc New York, 149-181
13. Chin D, Gil G, Russel D, Liscum L, Luskey K, Basu S, Okayama H, Berg P, Goldstein J, Brown M (1984) *Nature* (Lond) **308**: 613-617
14. Olender H, Simoni R (1992) *J Biol Chem* **267**: 4223-4235
15. Chun K, Simoni R (1992) *J Biol Chem* **267**: 4236-4246
16. Clarke P, Hardie D (1990) *EMBO J* **9**: 2439-2446
17. Orci L, Brown M, Goldstein J, Garcia-Segura L, Anderson R (1984) *Cell* **36**: 835-845
18. Parker R, Miller S, Gibson D (1989) *J Biol Chem* **264**: 4877-4887
19. Bason M, Thorsness M, Rine J (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5563-5567
20. Sengstag Ch, Stirling C, Schekman R, Rine J (1990) *Mol Cel Biol* **10**: 672-680
21. Thorsness M, Schafer W, D'Ari L, Rine J (1989) *Mol Ce Biol* **9**: 5702-5712
22. Karst F, Lacrout F (1977) *Mol Gen Genet* **154**: 269-277
23. Tanaka R, Schafer B, Lee L, Freudenberger J, Mosley S (1990) *J Mol Chem* **265**: 2391-2398
24. Stamellos K, Shackelford J, Tanaka R, Krisans S (1992) *J Biol Chem* **267**: 5560-5568
25. Tanaka R, Lee L, Schafer B, Kratunis V, Mohler W, Robinson G, Mosley S (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2872-2876
26. Bloch K, Chaykin A, Philips A, de Waard A (1959) *J Biol Chem* **234**: 2595-2604
27. Chambon Ch, Ladeveze V, Servouse M, Blancharde L, Javelot C, Vladescu B, Karst F (1991) **26**: 633-636
28. Rilling H, Chayet L (1985) W: In Sterols and Bile Acids (Danielsson H, Sjovall ed) Elsevier Science Publishers 1-39
29. Runquist M, Ericsson J, Thelin A, Chojnacki T, Dallner G (1992) *Bioch Bioph Res Com* **186**: 157-165
30. Faust J, Brown M, Goldstein J (1980) *J Biol Chem* **255**: 6546-6548
31. Wilson R, Roe B (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 409-413
32. Kaminek M (1992) *TIBTECH* **10**: 159-164
33. Poulter C, Rilling H (1981) W: In biosynthesis of isoprenoid compounds (J W Porter, S L Spurgeon eds) John Wiley and Sons, New York, 161-224
34. Rilling H (1985) *Methods Enzymol* **110**: 145-152
35. Runquist M, Ericson J, Thelin A, Dallner G (1992) Biosynthesis of farnesyl pyrophosphate in the matrix of mitochondria from rat liver. (manuscr)
36. Ericson J, Appelkvist E, Thelin A, Chojnacki T, Dallner G (1992) *J Biol Chem* **267**:18707-18714
37. Popjak G, Cornforth J (1966) *Biochem J* **101**:553-568
38. Poulter C, Argyle J, Mash E (1978) *J Biol Chem* **253**: 7227-7233
39. Laskovitcs F, Krafcik J, Poulter C (1979) *J Biol Chem* **254**: 9458-9463
40. Ashby M, Kutsunai S, Ackerman S, Tzagoloff A, Edwards P (1922) *J Biol Chem* **267**: 4128-4136
41. Anderson M, Yarger J, Burck C, Poulter C (1989) *J Biol Chem* **264**: 19176-19184
42. Chambon C, Ladeveze V, Oulmouden A, Srevouse M, Karst F (1990) *Curr Genet* **18**: 41-46
43. Karst, Blanchard (1992) Geneaccepted
44. Hemming F (1983) In Biochemistry of isoprenoid Compounds [Porter J and Spurgeon S eds.] 305-354 John Wiley and Sons, New York
45. Rip J, Rupar C, Ravi K, Carroll K (1985) *Prog Lip Res* **24**: 269-309
46. Chojnacki T, Dallner G (1988) *Biochem J* **251**: 1-9
47. Ericsson J, Scallen T, Chojnacki T, Dallner G (1991) *J Biol Chem* **266**:10602-10607
48. Adair W, Cafmeyer N 1987) *Arch Biochem Biophys* **258**: 491-497
49. Ekstrom T, Chojnacki T, Dallner G (1984) *J Biol Chem* **262**: 4090-4097

http://rcin.org.pl

Genetyczne regulacje N-glikozylacji białek drożdży

Genetic regulation of N-glycosylation in yeast

GRAŻYNA PALAMARCZYK[1]
JOANNA KRUSZEWSKA[2]

Spis treści:

I. **Mutanty drożdży zaburzone w glikozylacji**
II. **Enzymy zależne od dolicholu: charakterystyka, klonowanie genów**
III. **Sekwencje aminokwasowe rozpoznające dolichol**
IV. **Orientacja przestrzenna procesów glikozylacji w błonach endoplazmatycznego retikulum**

Contents:

I. **Yeast mutants impaired in glycosylation**
II. **Dolichol dependent enzymes: characteristic and gene cloning**
III. **Dolichol recognition sequence**
IV. **Topography of gycosylation in endoplasmic reticulum**

Wykaz stosowanych skrótów: DolP — fosforan dolicholu; MPD — mannozylofosfodolichol; MPDS — syntaza mannozylofosfodolicholu; GPD — glukozylofosfodolichol; GPDS — syntaza glukozylofosfodolicholu; ER — endoplazmatyczne retikulum

Kolejne etapy glikozylacji białek, prowadzące do syntezy wiązania N-glikozydowego, w którym reszty cukrowe połączone są z białkiem poprzez grupę amidową asparaginy, zostały opisane w wielu artykułach przeglądowych [np 1, 2], w tym również w *Postępach Biochemii* [3, 4].

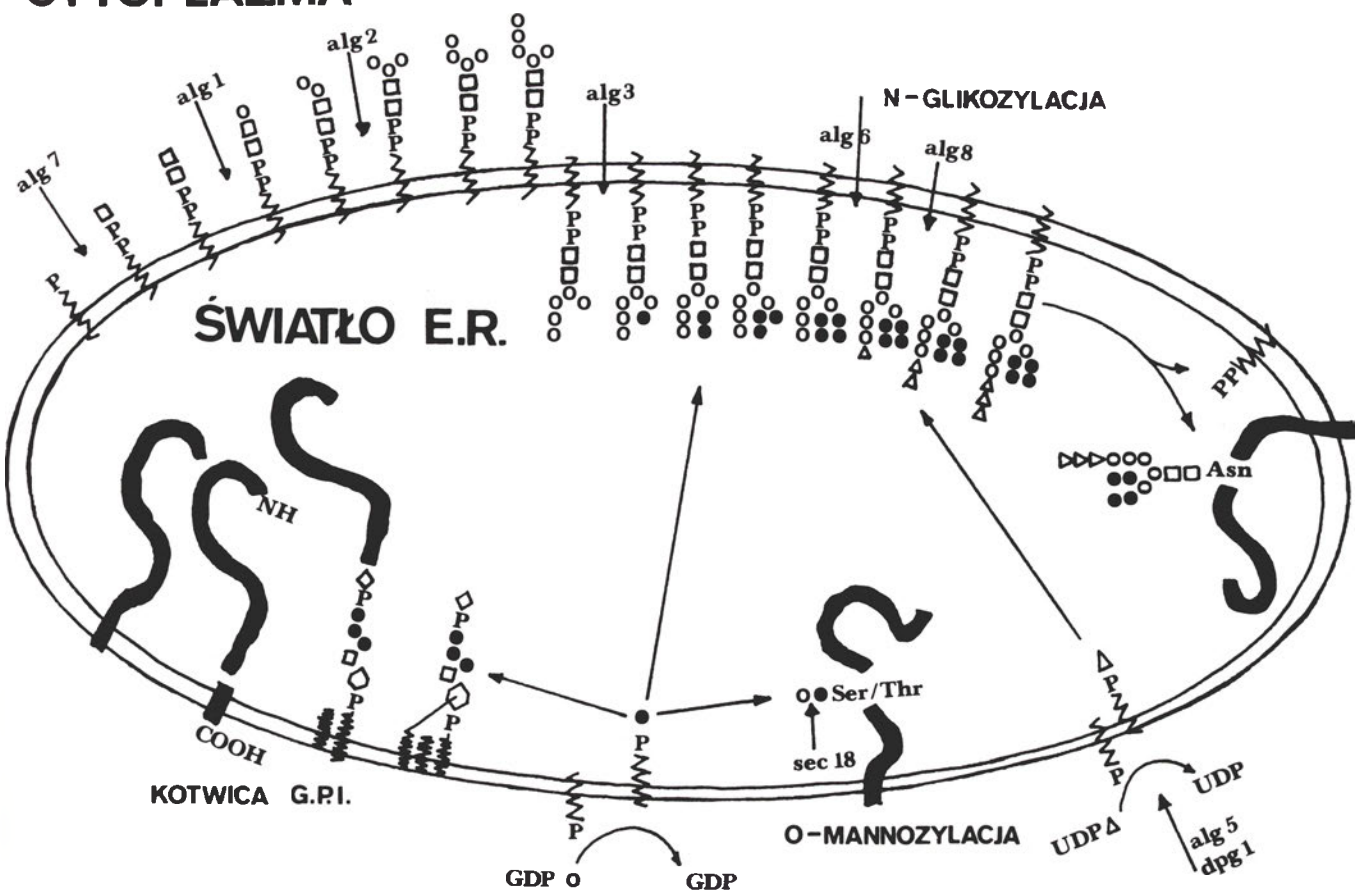
N-glikany drożdży tworzą strukturę wielomannanową (ang. *high mannose type*) składającą się z reszt mannozy i N-acetyloglukozaminy [4]. W drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, N-glikoproteiny wchodzą w skład ściany komórkowej lub ulegają sekrecji bądź to na zewnątrz komórek lub do wewnątrz wakuoli. Glikoproteiny występujące w ścianie komórkowej są jej istotnym elementem strukturalnym, a także zawierają determinanty antygenowe. Reszty cukrowe złożone ze 100-200 cząsteczek mannozy stanowią ok. 80% ich ciężaru cząsteczkowego. Glikoproteiny ulegające sekrecji (np. inwertaza i kwaśna fosfataza) zawierają nieco krótsze reszty cukrowe (ok. 50 cząsteczek mannozy) a ich główną funkcją jest przetwarzanie składników pokarmowych podłoża. Glikoproteiny wakuolarne, np.karboksypeptydaza Y pełnią przede wszystkim funkcje hydrolityczne. Ich reszty cukrowe są stosunkowo krótkie. Drożdże zawierają również glikoproteiny, w których reszty cukrowe są związane z białkiem wiązaniem O-glikozydowym poprzez grupę hydroksylową seryny/treoniny. Ich część cukrowa jest krótka, do 5-ciu mannoz, a funkcja mało poznana. Wiadomo jedynie, że wchodzą w skład ściany komórkowej i w tym przypadku N- i O-glikozydowo związane reszty cukrowe znajdują się na tej samej cząsteczce białka.

Przebieg N-glikozylacji (Ryc. 1), katalizowanej przez enzymy endoplazmatycznego retikulum, jest dalece konserwowany w komórkach eukariontów. Jest to proces wielostopniowy, wymagający udziału przenośnika lipidowego, którym jest fosforan dolicholu. Reszty cukrowe przenoszone są kolejno z odpowiednich nukleozydodwufosfocukrów na fosforan dolicholu, co prowadzi do powstania dolichylo dwufosfo oligosacharydu ($DolPPGlcNac_2Man_5$). Jego część cukrowa jest następnie wydłużana aż do powstania $DolPPGlcNac_2Man_9Glc_3$. Cztery kolejne reszty mannozylowe (Man_{6-9}) i reszty glukozydowe są przenoszone z odpowiednich nukleozydodwufosfocukrów na rosnący łańcuch oligosacharydowy za pośrednictwem DolP (Ryc. 1). Kolejna reakcja to przeniesienie oligosacharydu z DolPP na grupę β-amidową asparaginy glikozylowanego peptydu. Część oligosacharydowa glikopeptydu ulega następnie kolejnym reakcjom przetwarzania (processing) różnym dla różnych organizmów. Proces przetwarzania reszt cukrowych zaczyna się wewnątrz endoplazmatycznego retikulum i trwa podczas transportu glikozylowych białek poprzez aparat Golgiego na zewnątrz komórki lub do błon komórkowych [4].

Informacje otrzymane klasycznymi metodami biochemicznymi pozwoliły na odtworzenie kolejnych etapów prowadzących do syntezy wiązań glikozydowych. Jednakże stosunkowo mało było wiadomo o własnościach białek katalizujących poszczególne reakcje, bowiem oczyszczanie glikozylotransferaz zależnych od

[1] prof. dr hab, [2] dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

http://rcin.org.pl



Ryc. 1. Udział DolP w reakcjach N-glikozylacji, O-glikozylacji i syntezy kotwicy glikozylofosfoinozytolowej (GPI)

dolicholu, stanowi olbrzymi problem metodyczny. Zastosowanie genetyki klasycznej i molekularnej pozwoliło na uzyskanie znacznego postępu w tej dziedzinie, jego przedstawienie jest celem niniejszego artykułu.

I. Mutanty drożdży zaburzone w glikozylacji

I.1. Mutanty typu alg (ang. *asparagine linked glycosylation mutants*). Większość informacji przedstawionych na ryc. 1 była możliwa do otrzymania dzięki wyizolowaniu mutantów drożdży zaburzonych w kolejnych etapach biosyntezy łańcucha oligosacharydowego związanego z fosforanem dolicholu. Mutanty alg, za wyjątkiem *alg 7*, zostały otrzymane metodą "mannose suicide selection". Metoda ta polega na 30 minutowej inkubacji drożdży w temperaturze 36°C z dużą ilością (10mCi/ml) [^{3}H] mannozy a następnie na ich zamrożeniu w temp. −70°C. Przeżywające komórki (ok. 0.2% po 35 dniach przechowywania w −70°) miały ograniczoną zdolnością pobierania radioaktywnej mannozy. Testowane pod względem zdolności syntezy glikozylowanego fosforanu dolicholu wykazywały zmieniony przebieg syntezy łańcucha oligosacharydowego. "Mannose suicide selection" pozwoliła na otrzymanie mutantów należących do 8-miu grup komplementacyjnych reprezentujących różne loci. Analiza biochemiczna potwierdziła, że każdy z mutantów jest zaburzony na innym etapie syntezy łańcucha cukrowego. Mutanty *alg1* i *alg2*, zaburzone we wczesnych etapach syntezy glikozylowanego dolicholu (Ryc. 1), są mutantami termowrażliwymi.

http://rcin.org.pl

Natomiast mutanty *alg3*, *alg5*, *alg6* i *alg8*, zaburzone w późniejszych etapach reakcji, nie mają określonego fenotypu [5] co znacznie utrudnia ewentualne ich wykorzystanie do klonowania odpowiednich genów. Mutant *alg7* został otrzymany na drodze selekcji szczepów opornych na tunikamycynę, antybiotyk o działaniu letalnym dla komórek drożdży i wyższych eukariontów [6].

Mutanty *alg1*, *alg2*, oraz *alg7* wykorzystano do klonowania genów kodujących określone glikozylotransferazy. Metody klonowania i charakterystyka enzymów zostaną opisane w dalszej części artykułu. W tym miejscu należy jednak powiedzieć, że poznanie sekwencji genów pozwoliło na wydedukowanie sekwencji białek enzymatycznych nie dających się jak dotąd oczyścić klasycznymi metodami biochemicznymi. W pozostałych mutantach typu alg scharakteryzowano defekty glikozylacji. Stwierdzono, że mutant *alg3* akumuluje $DolPPGlcNac_2Man_5$ [7], glikozylowany dolichol o podobnej strukturze reszt cukrowych znajdowano w zmutowanych liniach komórkowych białaczki mysiej [8]. Wyjaśniono, że przyczyną syntezy skróconych oligosacharydów był brak w tych komórkach syntazy mannozylofosfodolicholu. Na tej podstawie uznano, że w sekwencji reakcji dodawania kolejnych reszt mannozy do rosnącego na fosforanie dolicholu oligosacharydu, pięć pierwszych reszt mannozy pochodzi z GDPMan, natomiast MPD jest donorem reszt mannozylowych wydłużających $DolPPGlcNac_2Man_5$ aż do powstania $DolPPGlcNac_2Man_9$. Jednakże mutanty typu *alg3*, w przeciwieństwie do zmutowanych linii komórkowych białaczki mysiej, posiadały zdolność syntezy MPD porównywalną z komórkami szczepu dzikiego. Wykazano, że przyczyną obserwowanego defektu glikozylacji fosforanu dolicholu w komórkach mutanta *alg3* jest brak α 1,3 mannozylotransferazy, enzymu przenoszącego mannozę z MPD na $DolPPGcNac_2Man_5$ [9].

Mutant *alg4*, podobnie jak poprzednie, jest niezdolny do syntezy w pełni glikozylowanego dolicholu i akumuluje całe spektrum intermediatów, głównie $DolPPGlcNa_2Man_{5-8}$. Wydaje się, że mutacja *alg4* ma efekt plejotropowy a obserwowany defekt glikozylacji jest spowodowany zmianą składu błon endoplazmatycznego retikulum w komórkach mutanta [10]. Mutant *alg5* nie zawiera białka syntazy GPD a mutant *alg6* nie zawiera glukozylotransferazy przenoszącej glukozę na $DolPPGlcNac_2Man_9$ [11]. Obserwowany defekt glikozylacji polegający na gromadzeniu w komórkach obu mutantów $DolPPGlcNac_2Man_9$ jest taki sam, choć spowodowany mutacjami w dwóch różnych genach. Listę mutantów typu *alg*, kończy *alg8*. Wykazano, że mutant ten akumuluje $DolPPGlcNac_2Man_9Glc_1$ na skutek braku 1,2 glukozylo transferazy przenoszącej glukozę z GPD na częściowo glukozylowany dolichol [12].

I.2. Mutanty zaburzone w biosyntezie glukozylofosfo dolicholu i mannozylofosfo dolicholu (GPD i MPD).

Mutanty zaburzone w biosyntezie GPD, będącego donorem trzech reszt glukozy, dodawanych w ostatnich etapach biosyntezy oligosacharydu związanego z dolicholem (Ryc. 1), to wspomniany wcześniej mutant *alg5* [11] oraz spontaniczny mutant *dpg1* [14]. Wykazano, że obydwie te mutacje komplementują się nawzajem co sugeruje, że syntaza GPD jest białkiem heteropolimerycznym. W tej grupie należy wymienić również termowrażliwe mutanty warunkowe *dpm1*, które otrzymano po chemicznej mutagenezie genu *DPM1* kodującego syntazę MPD drożdży. Sposób klonowania genu opisano w dalszej części artykułu.

3. Mutanty sekrecyjne

Wśród mutantów drożdży, których wyizolowanie miało istotne znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmu glikolizacji, należy wymienić mutanta *sec 59*. Mutant ten należy do grupy termowrażliwych mutantów zaburzonych w sekrecji glikoprotein. W temperaturze niepermisyjnej akumuluje wewnątrz endoplazmatycznego retikulum częściowo glikozylowane formy białek sekrecyjnych, takich jak: inwertaza czy pro-karboksypeptydaza Y [15]. Biochemiczna charakterystyka mutanta oraz klonowanie genu *SEC 59* zostanie opisane w dalszej części artykułu.

Innym mutantem akumulującym w przestrzeni periplazmatycznej, w temperaturze niepermisyjnej, niekompletnie glikozylowane formy białek jest mutant *sec53*. Wykazano, że mutant ten jest defektywny w biosyntezie GDPMan a gen *SEC 53* koduje fosfomannomutazę [16]. Można więc przypuszczać, że obserwowany defekt glikozylacji białek jest wynikiem obniżonej syntezy GDPMan w komórkach mutanta.

Badania przebiegu glikozylacji w opisanych mutantach drożdży dostarczyły wielu interesujących informacji na temat biosyntezy glikozylowanego dolicholu, kluczowego intermediatu w glikozylacji białek. Stwierdzono, że zablokowanie glikozylacji może być dla komórek letalne o ile zachodzi na wczesnych etapach reakcji. Natomiast częściowo glikozylowane formy dolicholu, akumulujące się w mutantach *alg2*, *alg3*, *alg5*, *alg6* i *dpg1* mogą być wykorzystane w glikozylacji białek [17] a defekt genetyczny nie ma wpływu na normalny wzrost komórki.

II. Enzymy zależne od dolicholu; charakterystyka, klonowanie genów

1. Transferaza UDPGlcNac:DolP — gen *ALG7*

Enzym ten katalizuje pierwszy etap syntezy glukozylofosfodolicholu tj. przeniesienie GlcNacP na fosforan dolicholu. *In vitro* reakcja ta jest hamowana przez antybiotyk tunikamycynę [18, 19]. Stosowana *in vivo* tunikamacyna hamuje wzrost komórek drożdży i wyższych eukariontów [6]. Efekt ten wykorzystano do sklonowania genu *ALG7*. Dziki szczep drożdży transformowano drożdżowym bankiem genów na wielokopijnym plazmidzie. Wśród transformantów poszukiwano kolonii opornych na tunikamycynę. Kolonie

http://rcin.org.pl

oporne, w porównaniu z koloniami szczepu dzikiego, wykazywały podwyższoną (ok. 10-cio krotnie) aktywność transferazy. Analiza DNA mutantów opornych na tunikamycynę wykazała wyraźną amplifikację fragmentu wielkości 2250 par zasad. Po zsekwencjonowaniu okazało się, że zawiera on otwartą ramkę odczytu, 1340 par zasad, kodującą białko o ciężarze ok. 52000. Wydedukowana z sekwencji nukleotydowej genu *ALG7*, sekwencja aminokwasowa wskazuje na występowanie dwóch domen transmembranowych i dwóch potencjalnych miejsc N-glikozylacji.
Dysrupcja genu jest letalna.

2. β 1,4 mannozylotransferaza — gen *ALG1*
Enzym katalizuje przeniesienie mannozy z GDPMan na $DolPPGlcNac_2$ i wytworzenie wiązania β 1,4 glikozydowego. Termowrażliwe mutanty *alg1* w temperaturze niepermisyjnej nie mają zdolności syntezy mannozylowanego oligosacharydu połączonego z fosforanem dolicholu. Gen *ALG1*, kodujący mannozylotransferazę został sklonowany na zasadzie komplementacji funkcjonalnej mutacji *alg1* [21]. Otwarta ramka odczytu genu zawiera 1347 par zasad, kodujących białko o ciężarze cząsteczkowym 51900. Analiza wydedukowanej sekwencji białka wskazuje na obecność domeny hydrofobowej przy N-końcu oraz 4-rech potencjalnych miejsc glikozylacji.
Dysrupcja genu jest letalna.

3. α 1,3 mannozylotransferaza — gen *ALG2*
Enzym ten katalizuje przeniesienie mannozy na $DolP\text{-}PGlcNac_2Man_2$.
Termowrażliwe mutanty *alg2* w temperaturze niepermisyjnej akumulują częściowo glikozylowany dolichylo fosforan [17, 22].
Gen *ALG2* podobnie jak gen *ALG1* sklonowano poprzez komplementację funkcjonalną mutacji *alg2* [22]. Otwarta ramka odczytu koduje białko o ciężarze cząsteczkowym ok. 60000. Analiza wydedukowanej sekwencji białka sugeruje występowanie domeny transmembranowej w pobliżu N-końca oraz 4-rech potencjalnych miejsc glikozylacji.
Dysrupcja genu jest letalna.

4. Syntaza mannozofosfodolicholu (MPDS) — gen *DPM1*
MPDS katalizuje reakcję syntezy MPD poprzez przeniesienie mannozy z GDPMan na DolP.
Gen kodujący syntazę sklonowano po transformacji mutantów drożdży o obniżonej aktywności MPDS drożdżowym bankiem genów szczepu dzikiego na plazmidzie wielokopijnym. Wśród otrzymanych transformantów poszukiwano kolonii o podwyższonej aktywności enzymu [23]. Otrzymano 7 transformantów, w których aktywność MPDS była od 7-do 14 razy wyższa niż w szczepie rodzicielskim.
Plazmidowe DNA z wybranych transformantów użyto do transformacji *E. coli* i stwierdzono, że drożdżowa MPDS ulega ekspresji w komórkach bakterii. Po subklonowaniu DNA wyizolowano gen *DPM1* kodujący drożdżową MPDS.
Analiza sekwencji genu *DPM1* wykazała obecność otwartej ramki odczytu o wielkości 801 zasad, kodującej białko o ciężarze cząsteczkowym 30000. Wydedukowana sekwencja białka wskazuje na obecność domeny transmembranowej w pobliżu C-końca. Natomiast struktura N-końca posiada charakterystyczną dla drożdży sekwencję sygnałową, inicjującą transport białka przez błonę ER. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała ponadto brak potencjalnego miejsca N-glikozylacji oraz występowanie potencjalnego miejsca fosforylacji dla kinazy białkowej zależnej od cAMP czyli Ser/Thr sąsiadujące z 2-3 resztami hydrofobowymi (sekwencja otaczająca serynę 141) [23]. Jak dotąd udało się sklonować jedynie drożdżowy gen kodujący MPDS i na podstawie sekwencji nukleotydowej wydedukować sekwencję białka syntazy drożdży. Jednakże badania biochemiczne wykazały, że aktywność syntazy MPD w komórkach wątroby i grzyba nitkowatego *Trichoderma reesei* jest regulowana kinazą białkową zależną od cAMP [24, 25]. Wynik ten pozwala przypuszczać, że istnieją fragmenty struktury enzymu konserwowane w komórkach różnych eukariontów. Na podobieństwo strukturalne enzymu drożdżowego do enzymu występującego w komórkach zwierzęcych wskazuje również fakt, że defekt glikozylacji występujący w zmutowanych liniach komórek chomika (ang. *Chinese hamster ovary cells*), spowodowany brakiem aktywnej MPDS w tych komórkach, jest korygowany po ich transfekcji drożdżowym genem *DPM1* [26].
Dysrupcja genu kodującego MPDS dość nieoczekiwanie okazała się dla drożdży letalna [23]. Wynik ten był nieoczekiwany ponieważ wiadomo było, że MPD produkt reakcji katalizowanej przez MPDS jest donorem 4-rech zewnętrznych reszt mannozylowych w biosyntezie glikozylowanego dolicholu. Jednocześnie wiadomo, że mutanty typu *alg2* i *alg 3* syntetyzujące niekompletnie glikozylowane dolichole ($DolPPGlcNac_2Man_{2\text{-}3}$ i $DolPPGlcNac_2Man_5$) mają zdolność przenoszenia skróconych łańcuchów oligosacharydowych na białka akceptorowe. Tak więc można było przypuszczać, że wydłużanie łańcucha cukrowego w procesie N-glikozylacji białek nie jest jedyną funkcją MPD. Odpowiedź udało się otrzymać dzięki otrzymaniu mutantów warunkowych *dpm1* [13]. Wykazano, że produkt genu *DPM1*, MPD bierze również udział w biosyntezie glikozylo fosfoinozytolu (GPI) zakotwiczającego wiele białek w błonach komórkowych (Ryc. 1). Lipid gromadzący się w termowrażliwych mutantach *dpm1* hodowanych w temperaturze niepermisyjnej, ma strukturę $PI\text{-}GlcNH_2$ (lub GlcNac) i nie jest transportowany do białek. Defekt ten jest korygowany po transformacji komórek drożdży genem *DPM1* [13]. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych *in vitro* wiadomo było, że MPD jest również donorem pierwszej reszty mannozylowej w reakcji 0-glikozylacji białek [26]. Otrzymanie mutanta *dpm1* pozwoliło stwierdzić, że również *in vivo* synteza

http://rcin.org.pl

wiązania 0-glikozydowego zachodzi według podanego schematu (Ryc. 1). Do badań użyto chitynazę drożdżową jako modelowe, 0-glikozylowane białko. W temperaturze permisyjnej obserwowano w komórkach mutanta syntezę białka chitynazy o masie cząsteczkowej 150 000. Po przeniesieniu do temperatury niepermisyjnej stwierdzono sekrecję nieglikozylowanych form inwertazy o masie 60 000. Znakując komórki mutanta radioaktywną mannozą stwierdzono, że synteza glikozylowanej chitynazy zachodzi jedynie w temperaturze permisyjnej [13].

5. Syntaza glukozylofosfodolicholu (GPD); geny *DPG1* i *ALG5*

Glukozylofosfodolichol, będący produktem reakcji katalizowanej przez syntazę, jest donorem trzech reszt glukozy przenoszonych z GPD na nieredukujący koniec oligosacharydu związanego z fosforanem dolicholu (Ryc. 1).

Wyizolowanie opisanych wcześniej mutantów *alg5* i *dpg1* i stwierdzenie, że obydwie mutacje komplementują się nawzajem [14] pozwoliło przypuszczać, że białko syntazy jest heteropolimerem składającym się z podjednostek kodowanych przez dwa różne geny. Białko to udało się bliżej scharakteryzować dzięki zastosowaniu metody znakowania światłoczułym analogiem substratu (ang. *photoaffinity labeling*) zawierającym izotopowy marker (5-azydo [32-P] UDPGlc). Wykazano, że frakcja błon endoplazmatycznego retikulum drożdży szczepu dzikiego zawiera białko o ciężarze cząsteczkowym ok. 35 000 będące podjednostką syntazy wiążącą UDPGlc. Białka tego nie znajdowano w mutantach *alg5* pozbawionych aktywności syntazy GPD a jego ilość w mutantach *dpg1* była znacznie zmniejszona w porównaniu w komórkami szczepu dzikiego. Natomiast heterozygotyczne diploidy *alg*$_5$ *DPG1/ALG5 dpg1* zawierały znakujące się białko syntazy w ilości porównywalnej ze szczepem dzikim co potwierdza przypuszczenie, że białko syntazy GPD jest heteropolimerem. Preparaty błon komórkowych mutanta *alg6* zawierające aktywną syntazę GPD ale pozbawione aktywności glukozylotransferazy przenoszącej glukozę z GPD na oligosacharyd związany z dolicholem, zawierały zwiększone ilości białka syntazy GPD. Wynikiem mutacji *alg6* jest zatem nie tylko akumulacja GPD, spowodowana brakiem transferazy dla której GPD jest substratem, lecz również jego zwiększona synteza.

We wszystkich badanych przypadkach obserwowano dokładną korelację pomiędzy aktywnością syntazy mierzoną *in vitro* a ilością białka o masie 35 000 znakowanego światłoczułym analogiem substratu [27]. Niestety, jak dotąd nie udało się sklonować, żadnego z genów kodujących syntazę, głównie dlatego, że występowanie mutacji *alg5* i *dpg1* nie jest związane ze zmianą cech fenotypowych komórki drożdży a więc komplementacja mutacji drożdżowym bankiem genów szczepu dzikiego jest bardzo trudna do znalezienia typowymi metodami selekcji transformantów.

6. Kinaza dolicholu; gen *SEC 59*

Kinaza dolicholu przenosi resztę γ fosforanową z CTP na grupę hydroksylową dolicholu. Enzym ten podobnie jak enzymy biorące udział w glikozylacji dolicholu związany jest z błonami endoplazmatycznego retikulum. Jego występowanie stwierdzono po raz pierwszy w komórkach wątroby [28] a także w hodowlanych liniach komórek mysich i chomika. Zaobserwowano również występowanie CTP zależnej kinazy dolicholu w drożdżach [29, 30]. Stwierdzono, że specyficzna aktywność kinazy dolicholu zależy od fazy podziału komórek i tak np. w liniach hodowlanych komórek mysich L1210 aktywność kinazy zaczyna rosnąć podczas fazy G_1 osiągając maksimum w fazie S [31]. Stymulację aktywności kinazy dolicholowej obserwowano również w dzielących się jajach jeżowca w fazie późnej blastuli [32, 33] a także podczas różnicowania się komórek jajowodów kurczęcia zaindukowanego podaniem estrogenów [34], w dojrzewających erytrocytach [35] i podczas rozwoju centralnego układu nerwowego [36]. Obserwacje te doprowadziły do powstania w latach 80-dziesiątych dość atrakcyjnej hipotezy, zgodnie z którą kinaza dolicholu pełni funkcje regulacyjne w procesach glikozylacji, poprzez regulację poziomu fosforanu dolicholu w komórce. W późniejszym okresie powszechne zastosowanie HPLC do oznaczania poziomu fosforanu dolicholu oraz oznaczenie aktywności cis^2-prenyl transferazy, enzymu odpowiedzialnego za syntezę fosforanu dolicholu poprzez cykl kwasu mewalonowego (por. artykuł A. Szkopińskiej w tym numerze) spowodowało pewne modyfikacje w sformułowaniu tej hipotezy. Obecnie uważa się, że jedynie w tych tkankach, w których poziom syntezy fosforanu dolicholu *de novo* poprzez cykl kwasu mewalonowego jest z jakiś powodów obniżony, kinaza dolicholu może pełnić istotną rolę w utrzymywaniu stałego poziomu DolP poprzez fosforylację wolnego dolicholu dostępnego w komórce.

Stwierdzono, że termowrażliwy mutant drożdży *sec 59* akumuluje, w temperaturze niepermisyjnej, w endoplazmatycznym retikulum, niekompletnie glikozylowane prekursory białek sekrecyjnych. W tych warunkach obserwuje się również zahamowanie 0-glikozylacji białek i syntezy kotwicy glukozylofosfoinozytolowej. Tak więc mutant *sec 59* zachowuje się podobnie jak termowrażliwy mutant *dpm1* z uszkodzoną syntazą MPD. Jednakże w badaniach *in vitro* błony komórkowe mutanta *sec 59* mają zdolność syntezy MPD w obecności egzogennego fosforanu dolicholu. Pomiary ilościowe DolP w komórkach mutanta pozwoliły stwierdzić, że jego ilość w temperaturze permisyjnej stanowi 48%, a w temperaturze niepermisyjnej mniej niż 10% ilości oznaczanej w komórkach szczepu dzikiego. Transformacja mutanta dziką kopią genu *SEC59* powodowała wzrost aktywności kinazy w komórkach mutanta [37].

Wyniki te sugerują, że gen *SEC 59* jest istotnie genem

http://rcin.org.pl

kodującym kinazę dolicholu, białko o masie cząsteczkowej 59 000. Analiza sekwencji aminokwasowej wydedukowana na podstawie sekwencji nukleotydowej wskazuje na występowanie w cząsteczce dwóch potencjalnych miejsc N-glikozylacji oraz domeny hydrofobowej, zaczynającej się od 55 aminokwasu począwszy od N-końca, stanowiącej ok. 90% cząsteczki [38].

III. Sekwencje aminokwasowe rozpoznające dolichol

Porównanie sekwencji aminokwasowych, wydedukowanych na podstawie sekwencji nukleotydowej sklonowanych genów, pozwoliło na znalezienie powtarzającej się sekwencji hydrofobowej złożonej z 13-tu aminokwasów. Sekwencja ta, choć nieco różna dla poszczególnych enzymów, jest na tyle podobna, że można ustalić obszary najwyższej zgodności (ang. *consensus sequence*). Uznano, że jest ona odpowiedzialna za rozpoznawanie dolicholu (ang. *Dolichol recognition sequence*) [39] z następujących powodów:

a) sekwencja znajduje się w obszarze transmembranowym białka. Wiadomo, że białka ALG7 i DPM1, a także SEC 59 rozpoznają określone struktury dolicholu [40, 41] i można przyjąć, że rozpoznanie struktury odbywa się w obszarze transmembranowym ze względu na hydrofobowe własności dolicholu.

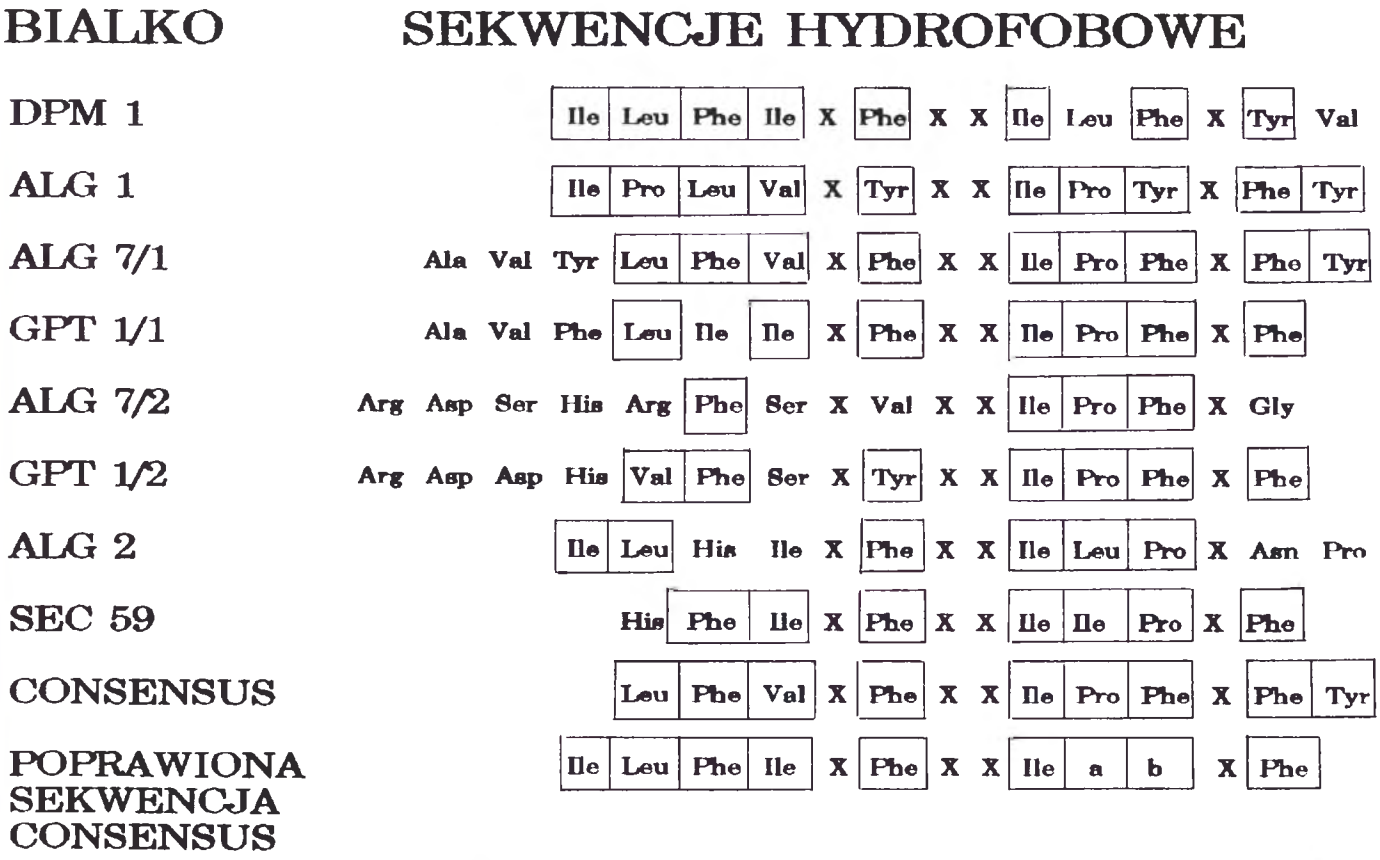
b) jeśli sekwencję aminokwasową rozpoznającą dolichol przedstawić w postaci α heliksu, struktury typowej dla obszarów transmembranowych białek, to obszary najwyższej zgodności znajdą się na zewnętrznej powierzchni α heliksu [39].

Powtarzające się we wszystkich porównywanych sekwencjach aminokwasy to izoleucyna w pozycji 8 i aromatyczne reszty aminokwasów w pozycjach 2, 5 i 12. Charakterystyczne jest występowanie proliny w sekwencji rozpoznającej dolichol, gdyż prolina pojawia się rzadko w obszarach transmembranowych białek, jedynie w białkach transportujących [40]. Jest to interesujące z punktu widzenia lokalizacji komórkowej procesów glikozylacji o czym będzie mowa w dalszej części artykułu.

Sekwencja aminokwasowa odpowiedzialna za rozpoznawanie dolicholu została przedstawiona na rycinie 2 [wg. 22, 45].

Początkowo porównywano strukturę białek kodowanych przez geny *ALG 7*, *ALG1* i *DPM 1* oraz *SEC 59*. Po sklonowaniu genu *ALG 2* [22] wniesiono do tej struktury pewne poprawki (Ryc. 2).

Poprawiona struktura sekwencji rozpoznającej dolichol uwzględnia zależności pomiędzy występowaniem określonych reszt aminokwasów hydrofobowych i proliny. Wydaje się, że konserwowanie struktury nazwanej „dolichol recognition sequence" we wszystkich sklonowanych dotąd genach kodujących enzymy zależne od dolicholu sugeruje jej istotne znaczenie dla funkcji tych enzymów.



Ryc. 2. Sekwencje hydrofobowe białek rozpoznające dolichol. Sekwencje najwyższej zgodności (consensus) zaznaczone kwadratami.

http://rcin.org.pl

IV. Orientacja przestrzenna procesów glikozylacji w błonach endoplazmatycznego retikulum

Synteza glikozylowanego dolicholu, będącego donorem reszt cukrowych w syntezie wiązania N- i 0-glikozydowego oraz kotwicy GPI odbywa się w świetle endoplazmatycznego retikulum, natomiast biosynteza nukleotydodwufosfocukrów (NDPS), donorów reszt cukrowych, wewnątrz cytoplazmy. Powstaje więc pytanie w jaki sposób NDPS są transportowane do wewnątrz ER. Na pytanie to ciągle jeszcze nie możemy odpowiedzieć jednoznacznie. Posługując się przede wszystkim metodami biochemicznymi polegającymi na badaniu poszczególnych reakcji glikozylacji w nienaruszonych pęcherzykach endoplazmatycznego retikulum, a także po ich trawieniu enzymami proteolitycznymi lub traktowaniu niskimi stężeniami detergentów ustalono, że przeniesienie dwóch pierwszych reszt GcNacP i GlcNac na fosforan dolicholu, odbywa się na cytoplazmatycznej stronie błony ER [42]. Wyniki badania sekwencji genu *ALG7*, kodującego transferazę GlcNac1P wskazują na występowanie w cząsteczce enzymu dwóch domen transmembranowych, informacja ta nie pozwala jednak na wyciągnięcie bardziej precyzyjnych wniosków dotyczących orientacji transferazy w błonie endoplazmatycznego retikulum.

Dodanie kolejnych reszt mannozy aż do powstania $DolPPGlcNac_2Man_5$ odbywa się najpewniej również na cytoplazmatycznej stronie błony ER, gdyż jak wykazano metodami biochemicznymi nie ma w komórce systemu transportującego GDPMan do wnętrza ER [42]. Analiza sekwencji aminokwasowej transferazy mannozy, kodowanej przez gen *ALG1*, wskazuje na występowanie domeny hydrofobowej w pobliżu N-końca. Można więc sobie wyobrazić, że białko jest zakotwiczone w błonie od końca N, a pozostała część cząsteczki jest zwrócona w stronę cytoplazmy.

Badanie aktywności syntazy MPD, kodowanej przez gen *DPM1* w nieuszkodzonych pęcherzykach endoplazmatycznego retikulum i po trawieniu enzymami proteolitycznymi, wskazują na cytoplazmatyczną orientację syntazy MPD [43, 44]. Przypuszczenie to potwierdza brak występowania systemu transportującego GDPMan do wnętrza ER [42]. Sekwencja aminokwasowa syntazy wskazuje na obecność domeny hydrofobowej na C-końcu enzymu i obecność sekwencji sygnałowej, kierującej białko do wnętrza endoplazmatycznego retikulum, na N-końcu. Jednakże sekwencja sygnałowa enzymu nie zawiera, występującego w podobnych sekwencjach innych białek, miejsca wiązania peptadazy w ER odcinającej sekwencję sygnałową. Na tej podstawie są możliwe do wyobrażenia dwie orientacje enzymu w błonie ER: syntaza jest zaczepiona domeną hydrofobową na C-końcu i odwrócona w stronę cytoplazmy lub istniejąca na N-końcu sekwencja sygnałowa, pomimo, że nie jest odcinana przez peptydazę ER, funkcjonuje normalnie, a zatem znajdzie się na wewnętrznej stronie błony ER. Ostatnie badania Orleana [46] wykonane na białkach hybrydowych DPM1-tPA (tkankowy aktywator plazminogenu) eksprymowanych w komórkach COS 1 wskazują na cytoplazmatyczną orientację syntazy MPD. Przeprowadzono fuzję N-końcowej części DPM 1 z białkiem t-PA pozbawionym sekwencji sygnałowej. W tym przypadku sekwencja AsnXSer tPA nie była glikozylowana. Jeśli natomiast dodano sekwencję sygnałową t-PA do hybrydowego białka to ulegało ono glikozylacji. Wynik ten świadczy pośrednio, że sekwencja sygnałowa na N-końcu białka DPM1, nie jest w istocie sekwencją skierowującą je do wnętrza ER, tak więc można uznać, że z dwóch możliwych teoretycznie orientacji enzymu prawdziwą jest orientacja cytoplazmatyczna. Obecnie uważa się, że wszystkie kolejne reakcje prowadzące do syntezy $DolPPGlcNac_2Man_5$ zachodzą na cytoplazmatycznej powierzchni błony endoplazmatycznego retikulum. Następnie syntetyzowany oligosacharyd jest translokowany do wnętrza ER, gdzie zachodzi wydłużanie łańcucha oligosacharydowego aż do powstania $DolPPGlcNac_2Man_9Glc_3$. Jednocześnie synteza MPD i prawdopodobnie również GPD, będących donorami reszt mannozy i glukozy w kolejnych reakcjach glikozylacji zachodzi po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. W tej sytuacji MPD i GPD muszą być transportowane do wnętrza ER. Badania nad rekonstrukcją częściowo oczyszczonej syntazy MPD w pęcherzykach fosfolipidowych zawierających również fosforan dolicholu wykazały, że mannoza może być transportowana z GDPMan do wnętrza pęcherzyka a fosforan dolicholu jest niezbędny do zajścia transportu [26]. Wynik ten sugeruje w sposób pośredni, że syntaza może odgrywać również rolę translokazy. Podobny wniosek nasuwa fakt występowania proliny w sekwencji transmembranowej rozpoznającej dolichol, co jak już wspomniano jest charakterystyczne dla białek transportujących.

Końcowym etapem syntezy oligosacharydu związanego z fosforanem dolicholu jest jego glukozylacja, poprzedzona syntezą GPD, działającego jako donor reszty glukozy (Ryc. 1). W błonach ER znaleziono białko transportujące UDPGlc do wnętrza ER. Nie wydaje się jednak, aby transport ten był konieczny do zajścia syntezy GPD [42]. Znakowanie syntazy GPD światłoczułą sondą [27] wykazało, że podjednostka wiążąca UDPGlc znajduje się po cytoplazmatycznej stronie ER i może być znakowana w nieuszkodzonych pęcherzykach ER. Ewentualne sekwencjonowanie białka GPDS lub sklonowanie i zsekwencjonowanie genu kodującego enzym powinno wykazać występowanie sekwencji rozpoznającej dolichol z charakterystyczną dla białek transportujących proliną znajdującą się w obszarze transmembranowym również i w tej cząsteczce.

http://rcin.org.pl

Podsumowując należy powiedzieć, że dzięki otrzymaniu mutantów drożdży zaburzonych na różnych etapach glikozylacji możliwe było sklonowanie genów kodujących niektóre glikozylotransferazy, a w konsekwencji określenie struktury białek biorących udział w tym procesie. Tak więc przynajmniej na niektóre pytania, na które nie można było otrzymać odpowiedzi klasycznymi metodami biochemicznymi odpowiedziano metodami genetyki i biologii molekularnej.

Artykuł otrzymano 1 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 7 czerwca 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Kornfeld R, Kornfeld S (1985) *Ann Rev Biochem* **56**: 631-644
2. Kukuruzińska MA, Bergh MLE, Jackson BJ (1987) *Ann Rev Biochem* **56**: 915-944
3. Palamarczyk G (1987) *Post Bioch* **24**: 443-460
4. Palamarczyk G (1987) *Post Biochem* **33**: 297-307
5. Huffaker TC, Robbins PW (1982) *J Biol Chem* **257**: 3203-3210
6. Barnes G, Hansen WJ, Holkomb CJ, Rine J (1984) *Mol cell Biol* **4**: 2381-2388
7. Hufaker TC, Robbins PW (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 7466-7470
8. Chapman A, Fujimoto K, Kornfeld S (1980) *J Biol Chem* **255**: 4441-4414
9. Verostek MF, Atkinson PH, Trimble RB (1991) *J Biol Chem* **266**: 5547-5551
10. Runge KW, Robbins PW (1986) *Microbiol* 312-316
11. Runge KW, Huffaker TC, Robbins PW (1984) *J Biol Chem* **259**: 412-417
12. Runge KW, Robbins PW (1986) *J Biol Chem* **261**: 15582-15590
13. Orlean P (1990) *Moll Cell Biol* **10**: 5796-5805
14. Ballou L, Gopal P, Krummel B, Tammi H, Ballou CE (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3081-3085
15. Ferro-Novick S, Novick P, Field E, Scheckman R (1984) *J Cell Biol* **98**: 35-43
16. Kepes F, Scheckman R (1988) *J Biol Chem* **263**: 9155-9161
17. Jackson BJ, Warren CD, Bugge B, Robbins PW (1989) *Arch Biochem Biophys* **272**: 203-209
18. Kuo SC, Lampen JO (1974) *Biochem Biophys Res Commun* **58**: 287-295
19. Lehle L, Tanner W (1976) *FEBS Lett* **71**: 167-170
20. Rine JW, Hansen W, Haroleman E, Davis RW (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 6750-6754
21. Albright CF, Robbins PW (1990) *J Biol Chem* **265**: 7042-7049
22. Jackson BJ, Kukuruzińska MA, Robbins PW (1993) *Glycobiology* w druku
23. Orlean P, Albright C, Robbins PW (1988) *J Biol Chem* **263**:17499-17507
24. Banerjee DK, Kousvelari EE, Baum BJ (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6389-6393
25. Kruszewska J, Palmarczyk G, Kubicek CP (1991) *FEMS Microbiol Lett* **80**: 81-86
26. Tanner W, Lehle L (1987) *Biochem Biophys Acta* **906**: 81-99
27. Palamarczyk G, Drake R, Halcy B, Lennarz WJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2666-2670
28. Allen CM, Kalin JR, Sack J, Verizio D (1987) *Biochemistry* **17**: 5020-5026
29. Palamarczyk G, Szkopińska A, Nowak L (1987) *Chem Scri* **27**: 55-56
30. Szkopińska A, Nowak L, Świeżewska E (1988) *Arch Biochem Biophys* **266**: 124-131
31. Adair WL, Caffmayer N (1987) *Chem Scri* **27**: 19-23
32. Rossignol DP, Lennarz WJ, Waechter CJ (1981) *J Biol Chem* **256**: 10538-10542
33. Rossignol DP, Sher M, Waechter CJ, Lennarz WJ (1983) *J Biol Chem* **258**: 9122-9127
34. Burton A, Lukas JJ, Waechter CJ (1981) *J Biol Chem* **256**: 632-635
35. Lucas JJ, Nevar C(1987) *Biochim Biophys Acta* **528**: 475-482
36. Harford JB, Waechter CJ, Earl FL (1977) *Biochem Biophys Commun* **76**:1036-1043
37. Heller L, Orlean P, Adair WlJr (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7013-7016
38. Bernstein M, Kepes F, Schekman R (1989) *Moll Cell Biol* **9**: 1191-1199
39. Albright CF, Orlean P, Robbins PW (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7366-7369
40. Palamarczyk G, Lehle L, Mańkowski T, Chojnacki T, Tanner W (1980) *Eur J Biochem* **105**: 517-523
41. Jankowski WA, Palamarczyk G, Krajewska I, Vogtman T(1989) *Chem Phys Lipids* **51**: 249-259
42. Abeijon C, Hirschberg C (1992) *TIBS* **17**: 32-36
43. Sneider MD, Sultzman LA, Robbins PW (1980) *Cell* **36**: 385-392
44. Lennarz WJ (1987) *Biochemistry* **26**: 7205-7210
45. Orlean P (1991) *Biochem Cell Biol* **70**: 438-447.

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".

http://rcin.org.pl

Książka przedłożona Redakcji

Principles of Environmental Toxicology

Sigmund F. Zakszewski
Department of Pharmacology
Roswell Park Graduate Division
State University of New York at Buffalo

ACS Professional Reference Book

American Chemical Society, Washington, DC, 1991

Książka przedstawia podstawowe koncepcje toksykologii środowiskowej, a przeznaczona jest dla studiujących ten przedmiot i zawodowo pracujących w tej dziedzinie. Dane o toksyczności omawianych substancji poparto rozważaniem ich właściwości farmakologicznych i fizjologicznych z uwzględnieniem oddziaływań metabolicznych, także z odniesieniem do procesów towarzyszących karcynogenezie. Zastosowanie testów toksykologicznych z użyciem zwierząt oceniono birác pod uwagę wiele czynników różnicujących stopień toksyczności. Zanieczyszczenie środowiska omówiono w rozdziałach: powietrze, woda, gleba, radiacja i ryzyko zawodowe. Dyskusja metod kontroli zanieczyszczenia środowiska oraz odnośne zasady prawne, podnoszą praktyczną wartość książki.

http://rcin.org.pl

Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm
W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii" w 1993 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie imienia , nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu wraz z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszytkich trzech odcinkach przekazu.

Prenumerata krajowa dla instytucji:
340 000 zł.

Premumerata krajowa indywidualna:
160 000 zł, (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

Prenumerując „Postępy Biochemii" wspierasz swoje czasopismo!

http://rcin.org.pl

i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji nr telefonu i ewentualnie fax, adresy prywatne autorów, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrót tytułu pracy (do 25 znaków).

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

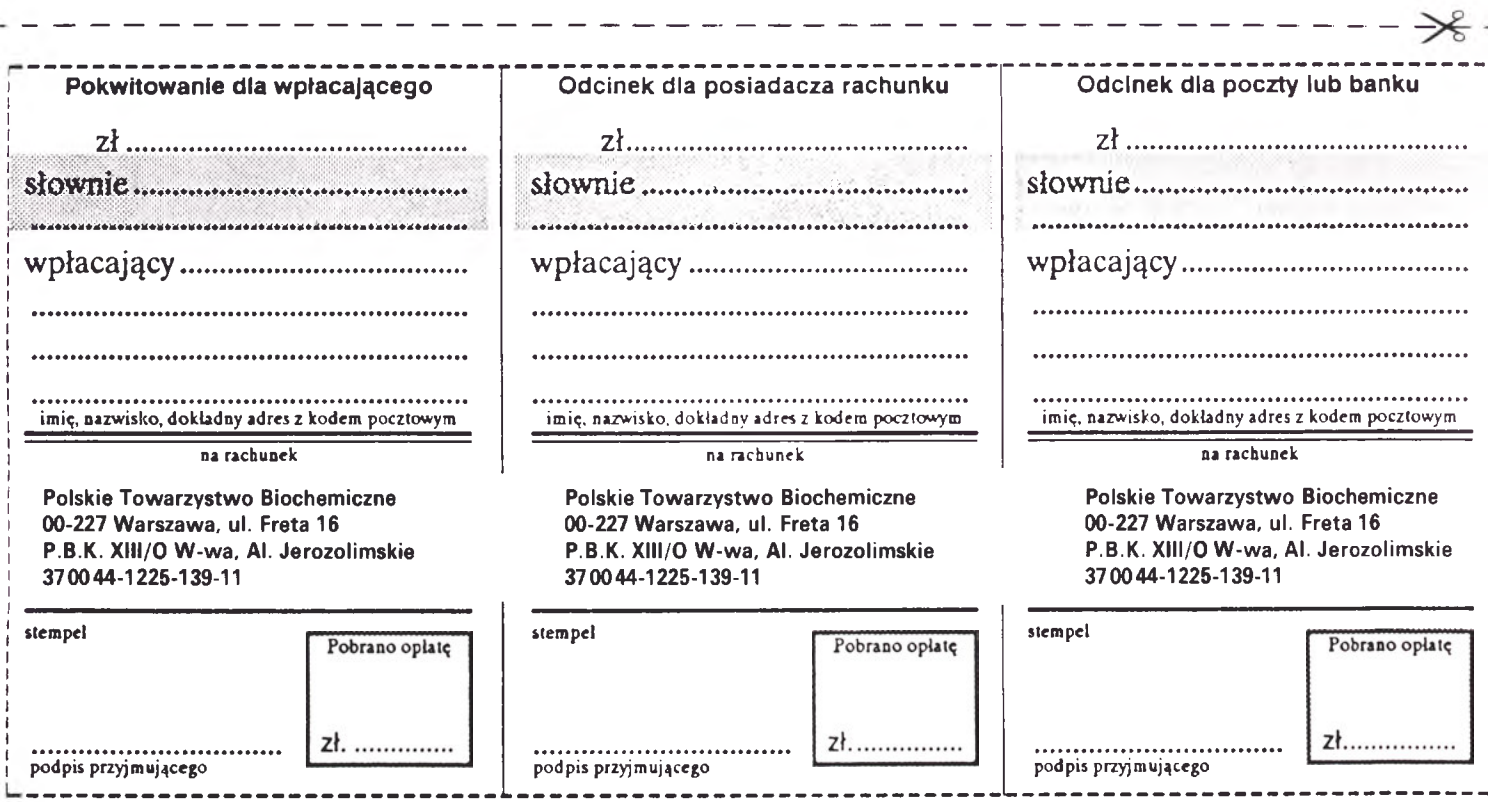
PIŚMIENNICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9,—26]. Odnośniki bibliograficzne winny mieć nową uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek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

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

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

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

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



http://rcin.org.pl

Komunikat Zarządu Głównego
z dnia 13.07.1993 r.

W dniu 30.06.1993 r. odbyła się sesja wykładowa rozstrzygająca konkurs na najlepszy wykład akademicki w roku 1993. Po ocenie nadesłanych materiałów i wysłuchaniu zakwalifikowanych do wygłoszenia wykładów Komisja Konkursowa w składzie:
prof. Z. Porembska (przewodnicząca), doc. J. Barańska,
prof. M. Fikus, prof. L. Konarska, doc. M. Turkiewicz
i dr E. Turska, przyznała następujące nagrody:

Nagrodę I dr Katarzynie Nałęcz z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, ul. Pasteura 3, za wykład p.t. **„Mechanizmy transportu związków niskocząsteczkowych przez błony biologiczne"**

Nagrodę II ex equo
mgr Małgorzacie Giel z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, ul. Noskowskiego 12/14 za wykład p.t. **„Strukturalne aspekty oddziaływania białek z DNA"** i
mgr Maciejowi Szymańskiemu z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, ul. Noskowskiego 12/14 za wykład p.t. **„Mechanizm inicjacji odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1"**

Nagrodę III dr Lucynie Pawłowskiej-Ćwiek z Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie, ul. Podbrzezie 3, za wykład p.t. **„Mechanizmy detoksykacji So_2 i skutki niewydolności jego unieszkodliwiania"**

Liliana Konarska
Prezes PTBioch.

http://rcin.org.pl

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER
UNION INTERNATIONALE CONTRE LE CANCER

INTERNATIONAL CANCER FELLOWSHIPS

UICC offers long, medium, and short-term fellowships to qualified professionals who are actively engaged in cancer research, clinical oncology or oncology nursing:

AMERICAN CANCER SOCIETY INTERNATIONAL CANCER RESEARCH FELLOWSHIPS (ACS)
(funded by the American Cancer Society)

Number: About 15 a year for original research abroad by recognised senior investigators who have been active in cancer research for at least 5 years. **Duration:** 6 - 12 months. Average award **value:** US$ 30,000. Application **closing date:** 1 October. Selection **results:** mid-April of the following year.

YAMAGIWA-YOSHIDA MEMORIAL INTERNATIONAL CANCER STUDY GRANTS (YY)
(funded by the Olympus Optical Company, Tokyo, and the Japan National Committee for UICC)

Number: About 15 a year for establishing bilateral research projects abroad which exploit complementary materials or skills, including advanced training in experimental methods. **Duration:** 1 - 3 months. Average grant **value:** US$ 8,000. Application **closing dates:** 1 January or 1 July. Selection **results:** mid-April and mid-October, respectively.

INTERNATIONAL CANCER TECHNOLOGY TRANSFER FELLOWSHIPS (ICRETT)
(funded by a group of 14 North American and European cancer institutes and societies - see attached list)

Number: About 120 a year for qualified investigators and experienced clinicians to learn or teach up-to-date research techniques, transfer appropriate technology, or acquire advanced clinical management, diagnostic and therapeutic skills. **Duration:** up to 3 months, with stipend support for 1 month. Average award **value:** US$ 2,800. Application **closing date:** None, applications are received at any time and **selection results** are usually notified within 60 days of registration.

INTERNATIONAL ONCOLOGY NURSING FELLOWSHIPS (IONF)
(funded by the Oncology Nursing Society, USA)

Number: About 5 a year for registered, English speaking nurses who are actively engaged in the care of cancer patients in their home institutes and who come from developing or Eastern European countries where specialist cancer nursing training is not yet widely available. **Duration:** 1 to 3 months, with stipend support for 1 month. Average award **value:** US$ 2,800. Application **closing date:** 15 November. Selection **results:** mid-February of the following year.

Travel awards contribute to cheapest international return fare. Contributions towards living expenses are limited for IONF and ICRETT to 1 month. Candidates need to secure funds for longer periods from their home or host institutes. **Dependents:** Allowances only for ACS grants for spouse and up to 2 children under 18 if they accompany the Fellow for a minimum of 6 months. **Extensions:** only for ACS and YY grants by original project duration and at no additional cost to UICC.

FOR APPLICATION FORMS: Write to the UICC Fellowships Department.

3, rue du Conseil-Général · 1205 Geneva · Switzerland
tel: (41 22) 320 18 11 · tx: 429 724 · tgr: Cancerunion Geneva · fax: (41 22) 320 18 10

http://rcin.org.pl

List z USA do Redakcji:

SOS dla polskich czasopism naukowych

Jacek Kuźnicki, Bathesda

Szanowna Pani Redaktor,

Opublikowano (CCs 36 (32), 9 sierpnia 1993) nową listę czasopism naukowych z dziedziny „Nauk o Życiu", których spis treści pojawiać się będzie w Current Contents. Na liście tej po raz pierwszy nie ma Acta Biochimica Polonica (w CC od połowy lat pięćdziesiątych), nie ma też Acta Neurobiologiae Experimentalis i Acta Protozoologica. Na ogólną liczbę 1293 czasopism uwzględnionych w spisie — obecne jest tylko jedno polskie pismo naukowe wydawane po angielsku (Folia Histochemica et Cytobiologica), podczas gdy w połowie lat osiemdziesiątych było ich kilkanaście. Niektóre miały stosunkowo dobry współczynnik liczby cytowań (Impact Factor). Niestety, od tego czasu obserwować można gwałtowny spadek popularności większości z tych czasopism, co objawiało się między innymi coraz niższą ich pozycją w rankingu. Dzieje się tak, mimo że ostatnio niektóre czasopisma zaczęły być wydawane regularnie i poprawiły szatę graficzną — na efekty tych zmian trzeba jednak długo czekać. Jednak bez życzliwego poparcia środowiska polskich uczonych oraz przezwyciężenia oporów środowisk związanych z konkurencyjnymi czasopismami — polskie pisma mogą nie przetrwać. Niemożność prezentowania treści na łamach Curent Contents pozbawia bowiem szans w konkurencji z innymi, zagranicznymi wydawnictwami. Czy my, polskie środowisko naukowe, chcemy i potrafimy uczynić z naszych czasopism pisma międzynarodowe, tak, by znalazły się ponownie w Current Contents? Czy też pozwolimy, by stały się one lokalnymi pismami drukowanymi w obcym języku dla tradycji jedynie i ... snobizmu?

Jestem zwolennikiem tezy, że warto podjąć starania, by niektóre polskie pisma wróciły do Current Contents. Przemawiają bowiem za tym względy pragmatyczne: nasze czasopisma mogą być też dochodowe, i co przede wszystkim, pisma te były i mogą być nadal sposobem reklamowania i popularyzowania polskiej nauki.

Czy nie należy zatem ogłosić **„SOS"** dla polskich czasopism naukowych i rozpocząć działania na rzecz radykalnej poprawy ich prestiżu? Jeśli tak, to niech apel **„SOS"** oznacza też Szybkie, Odważne i ... Skuteczne działania w tej sprawie.

Z wyrazami szacunku

Jacek Kuźnicki

Zainteresowanych sprawą poruszoną przez prof. J. Kuźnickiego prosimy o kontakt korespondencyjny z Redakcją.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl